



“Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio em *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae)”

Rejane Yuriko Ouchi



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Sistemática
Evolução

DOUTORADO



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

REJANE YURIKO OUCHI

“Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio em
Drosophila melanogaster (Diptera-
Drosophilidae)”

Tese apresentada para a
obtenção do Grau de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

*São José do Rio Preto – SP
Outubro de 2011*

Ouchi, Rejane Yuriko.

Avaliação dos efeitos do brometo de etídio em *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae) / Rejane Yuriko Ouchi. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

119 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientador: Carlos Roberto Ceron

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Genética. 3. Biomonitoramento. 4. Brometo de etídio – Toxicologia. 5. *Drosophila melanogaster*. I. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Ceron, Carlos Roberto. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.1:595.77

O presente trabalho foi realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Química e Ciências Ambientais e no Laboratório de Populações de *Drosophila*, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e co-orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, com auxílio financeiro da **FAPESP** e colaboração do Laboratório de Toxicologia Bioquímica do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e do Laboratório de Evolução Molecular de Insetos da Prof^a Dr^a Claudia Marcia Aparecida Carareto.

Rejane Yuriko Ouchi

“Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio
em *Drosophila melanogaster* (Diptera-
Drosophilidae)”

Banca Examinadora para Obtenção do Grau de Doutor:

- *Presidente e Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez*
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de
Química e Ciências Ambientais, Câmpus de São José do Rio Preto - SP
- *2º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Alves Almeida*
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de
Biologia, Câmpus de São José do Rio Preto - SP
- *3º Examinador: Drª. Lucilene Regina Maschio*
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de
Química e Ciências Ambientais, Câmpus de São José do Rio Preto - SP
- *4º Examinador: Profª Drª Lillian Castiglione*
UNIRP – Departamento de Biologia, de São José do Rio Preto - SP
- *5º Examinador: Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus*
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Departamento de Biologia de
Guarapuava - PR

Rejane Yuriko Ouchi

“Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio
em *Drosophila melanogaster* (Diptera-
Drosophilidae).”

Banca Examinadora para Obtenção do Grau de Doutor:

- Presidente e Orientador: _____

- 2º Examinador: _____

- 3º Examinador: _____

- 4º Examinador: _____

- 5º Examinador: _____

São José do Rio Preto
Outubro de 2011.

Dedico:

Aos meus pais, Aguirra e Claudice, e ao meu marido, Eduardo. Vocês, meus queridos, formam o tesouro mais precioso e, também, o alicerce e a mola propulsora que me conduziram até aqui. Dedico também ao meu mais novo presente, concedido por Deus, outro tesouro em minha vida, ao meu bebê que estou esperando com muito amor e carinho. É impossível expressar em palavras o imenso amor, carinho, respeito e orgulho que sinto de vocês... Amo-os de todo meu coração e obrigada por tudo.

Rejane Yuriço Ouchi Oliveira

Dedico:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron pela dedicação, incentivo, paciência, disponibilidade, orientações e profissionalismo. Obrigada por confiarem em meu trabalho, investirem desde a graduação em minha formação e, por me auxiliarem diariamente durante o curso de mestrado e de doutorado, além do convívio agradável. Impossível encontrar palavras para agradecer tudo que fizeram e fazem para meu aprimoramento pessoal e profissional.

Rejane Yuriço Ouchi Oliveira

Agradecimentos

Após o término deste trabalho, tentarei expressar com palavras a minha eterna gratidão, ao permanente apoio e incentivo das pessoas que convivem e conviveram comigo, e que tornaram o ambiente mais agradável, cheio de calor humano e que, de alguma forma colaboraram para concretização deste trabalho.

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela dádiva da minha vida e do meu bebê (presente enviado por Deus a mim após o término desse trabalho), pelas pessoas que fazem parte dela e pela oportunidade maravilhosa de ter realizado esse trabalho.

Agradeço ainda, pelas forças que recebi quando eu estava cansada, pelas pessoas certas que colocastes em meu caminho quando precisei e, paciência quando alguns experimentos não deram certo.

Ao meu querido orientador, grande pesquisador e amigo, Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, por me proporcionar crescimento e amadurecimento científico. Admiro-o muito por seu profissionalismo e inteligência. Agradeço-te, ainda, por estar sempre presente, durante esses dez anos de convivência, acompanhando-me na realização deste trabalho com muita paciência, incentivando e oferecendo todo apoio necessário.

Ao meu querido co-orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, que muito admiro desde a graduação, quando foi meu professor de bioquímica. Mesmo sem muito tempo disponível, em razão do cargo que ocupava, tentou sempre que possível estar presente e contribuiu satisfatoriamente com este trabalho. Agradeço-te pelo incentivo, pela confiança, apoio em todas as etapas.

À minha querida amiga e técnica do laboratório a qual, chamo, carinhosamente de “mãe japonesa”, Eliane Nobuco Ikeguchi Ohira pelo incentivo do dia-a-dia, amizade e pelos valiosos conselhos. Admiro-te muito pelo que você é como pessoa e como profissional.

À equipe do laboratório de Bioquímica de Proteínas, pela convivência harmoniosa e frutífera.

Aos meus amigos Lilian Medeiro, Adriana Granzotto, Elaine Dias, Elias e a Prof^a Dr^a Claudia Márcia Carareto, todos integrantes do Laboratório de Evolução Genética, pela amizade e pelo agradável convívio diário. Obrigada por me acolherem com tanto carinho durante algumas etapas do meu trabalho.

Ao meu amigo Hamilton Cabral, que me co-orientou durante meu estágio básico e iniciação científica, por ter contribuído com minha formação acadêmica.

Às minhas queridas e grandes amigas, Adriana Granzotto e Leliane Silva Commar, pela sua amizade verdadeira e sincera, pelo seu companheirismo e incentivo. Agradeço por estarem comigo

sempre que preciso, com uma palavra de carinho e conforto, nos momentos difíceis e pelas suas risadas nos momentos de alegria. Agradeço a Deus por tê-las como minhas grandes amigas e, em especial agradeço a você Adriana, por tudo que me ensinou e me ajudou durante a realização desse trabalho. Somos desde a graduação amigas-irmãs!

À minha querida amiga, Bruna Villas-Boas, pelo incentivo diário, por estar sempre ao meu lado me guiando e por ser minha grande amiga-irmã!

À Prof^a Dr^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo por ter aceito meu convite para compor a minha banca de qualificação do doutorado e pelas críticas construtivas, que muito contribuíram para a redação final deste trabalho.

A todos meus professores da graduação e da pós-graduação pelos ensinamentos transmitidos.

Ao técnico e amigo Sebastião Dias Barbosa, pela colaboração na parte prática deste trabalho, quando realizaram com muito zelo a preparação dos meios de cultura.

Às funcionárias Dulce Teresinha Campos Trevisan, Marta da Rocha Câmara Carvalho, Damaris dos Santos Martins pela limpeza dos corredores e do laboratório, proporcionando um ambiente de trabalho agradável.

À Rita Beatriz de Seixas, pela eficiência nos momentos em que precisei de vossa ajuda e pela amizade sincera que construímos.

Ao Departamento de Biologia pela manutenção das linhagens.

Ao Prof. Antônio José Manzato pela contribuição na parte estatística.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida e Dr^a Lucilene Regina Maschio, pela contribuição com protocolos e parte experimental da atividade enzimática. Além disso, agradeço a você Lú (Lucilene), minha querida e amada amiga, que sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos, sempre me incentivando, me guiando, me ajudando e estando ao meu lado em todos os momentos (não me deixando desistir quando algo dava errado na parte experimental...), inclusive no meu casamento, momento marcante em minha vida.

À Patricia Raquel Kharfan Prato, que além de amiga e incentivadora deste trabalho, ajudou nos momentos finais difíceis do meu equilíbrio emocional. Além disso, és minha eterna professora de biologia, figura na qual sempre me espelhei para ser a profissional que sou hoje.

Aos amigos de pós-graduação em biologia animal pela amizade.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À direção do IBILCE pelas condições materiais que proporcionaram a realização deste trabalho.

A querida amiga Adenir da Silveira Muniz, que trabalha em minha casa desde os meus 6 anos de idade, e que diariamente torce e ora por mim.

Às minhas queridas amigas Christiane Marie Mattar Xavier Leal, Andréia Cristina Fidélis, Fernanda Mauro Bottari e Denise Silva Zardini pela compreensão de minhas ausências.

Aos meus queridos amigos do Colégio Santo André, Flávia, Denise, Totô (Luís), Ana Claudia, Thatá e Samir pelo constante incentivo, amor, paciência, carinho e compreensão.

Ao Misso e o Miu, meus lindos e amados gatinhos, que tornam meus dias mais felizes e dão à minha vida, um brilho especial.

Aos meus primos Ed Carlos, Elaine, Ewandro, Rafaela, Raphael, Ricardo, Lílian Sayuri Ouchi de Melo, Ingrid Rey Coelho e Joemir Rey Coelho (*in memorian*); e aos meus tios Jorge Ouchi, Meire Jacob Ouchi, Aia Ouchi, Sumie Ouchi, Alice Maria Rey Coelho, Dirce Aparecida Rey Moura, Alicio Maganha Rey (*in memorian*), Manoel Maganha Cabrera (*in memorian*) e Deolindo Moura, pelo carinho e incentivo. Aos meus avós Izabel Maganha Rey Jute e Shimi Takaki Ouchi, pelo amor e carinho. E aos meus avôs Siker Ouchi (*in memorian*) e Emílio Rey Jute (*in memorian*), pelo eterno amor, sei que olham por mim e sentiriam grande orgulho de minha conquista.

Aos meus pais, Aguirra Ouchi e Claudice de Lourdes Maganha Rey Ouchi por tudo, inclusive pelo incentivo no dia-a-dia, pelo amor constante e incondicional, pelas palavras de carinho e afeto que são o alicerce de minha vida. São para mim um exemplo de ser humano, de bondade, amor, luta, e dedicação a serem seguidos. Os ensinamentos que recebi, e ainda recebo me tornaram o que sou hoje, por dentro (em sentimentos) e por fora (em atitudes); ensinaram-me à importância da vida, e despertaram em mim a vontade de crescer e progredir. Esse trabalho é uma pequena forma de retribuir tudo o que investiram em mim, sendo que essa vitória também é mérito de vocês. Amo muito vocês...

Ao meu sogro Fernando, minha sogra Maria Inês, minha cunhada Maria Fernanda e meu sobrinho Bernardo, pelo constante incentivo e por alegrarem meus finais de semana.

Ao meu amado marido, Eduardo Petrolini de Oliveira, pelo seu incentivo, amor e carinho. És, além de meu marido, meu amigo e companheiro. Sempre que preciso você está ao meu lado disposto a me ouvir, compreender e dar bons conselhos. Amo-te de todo meu coração.

Sem minha família, meus familiares e amigos nada disso teria sentido.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

(Fernando Pessoa)

AMIZADE

*Pela amizade que você me devota,
por meus defeitos que você nem nota...*

*Por meus valores que você aumenta,
por minha fé que você alimenta...*

*Por esta paz que nós nos transmitimos,
por este pão de amor que repartimos...*

*Pelo silêncio que diz quase tudo,
por este olhar que me reprova mudo...*

*Pela pureza dos seus sentimentos,
pela presença em todos os momentos...*

*Por ser presente, mesmo quando ausente,
por ser feliz quando me vê contente...*

*Por este olhar que diz:
"Amigo, vá em frente!"*

*Por ficar triste, quando estou tristonho,
por rir comigo quando estou risonho...*

*Por repreender-me, quando estou errado,
por meu segredo, sempre bem guardado...*

*Por seu segredo, que só eu conheço,
e por achar que apenas eu mereço...*

*Por me apontar pra DEUS a todo o instante,
por esse amor fraterno tão constante...*

Por tudo isso e muito mais eu digo:

*Deus te abençoe
meus queridos amigos!!!!*

Rejane Yuriço Ouchi Oliveira

A amizade

*A amizade
é o mais belo afluente do amor,
ela ajuda a resolver,
com paciência,
as complicadas equações
da convivência humana.*

*A amizade
é tão forte quanto o amor,
ela educa o amor,
sinalizando o caminho da coerência,
apontando as veredas da justiça,
controlando os excessos da paixão.*

*A amizade
é um forte elo que une pessoas
na corrente do querer.*

*Amizade
é cola divina,
cola demais,
pode doer.*

*A amizade
tem muito mais juízo que o amor,
quando ele se esgota
e cisma de ir embora,
ela se propõe a ficar,
vigiando o sentimento que sobrou.*

Ivone Boechat

Sumário

Capítulo I: Breve Introdução

I. Resumo	1
II. Introdução Geral	5
III. Justificativa	16
IV. Objetivos	17
V. Referências	19

Capítulo II: Manuscrito I: Review: *Drosophila melanogaster* as a Model of Environmental Biomonitoring

Abstract	25
Introduction	26
<u>I) Aromatic/Polycyclic chemicals</u>	32
<u>II) Endocrine Disruptors chemicals</u>	34
<u>III) Insecticides and herbicides chemicals</u>	36
<u>IV) Metals chemicals</u>	39
<u>V) Dyes chemicals</u>	40
<u>VI) Others classes of chemicals</u>	44
Conclusions	47
References	48

Capítulo III: Manuscrito II: “Evaluation of Ethidium Bromide effects in longevity and daily productivity throughout six generations (1st, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th) of *Drosophila melanogaster* (DIPTERA – DROSOPHILIDAE)”

Abstract	55
Introduction	56
Materials and Methods	58
Results and Discussion	60
References	76
Supplement Material	80
Annex	84

Capítulo IV: Manuscrito III: “Análise Preliminar da Expressão Gênica da *Hsp70*, *Sod2* e *Est-6* e atividade de enzimas de detoxificação, *CAT*, *SOD*, *GST* e *GR*, de *Drosophila melanogaster* expostas ao Brometo de etídio”

Resumo	96
Introdução	97
Materiais e Métodos	100
Resultados e Discussão	104
Conclusões Gerais	112
Referências	112

Capítulo V: Conclusão Geral do Trabalho

117

“Breve Introdução”

Capítulo I

I. Resumo

Resumo

A cada ano, milhares de novos compostos químicos entram no mercado, e um volume enorme de resíduos é gerado pela atividade humana, existindo uma grande preocupação com relação aos seus efeitos a curto e longo prazo sobre a saúde e o ambiente. Um grande número dessas substâncias químicas é potencialmente perigoso e pode acarretar efeitos biológicos deletérios, sendo que mudanças a nível molecular são usualmente as primeiras respostas detectáveis da perturbação ambiental. Para avaliar os efeitos em sistemas biológicos, são utilizados bioindicadores, organismos sensíveis a agentes tóxicos. O presente trabalho teve por objetivo analisar os efeitos do Brometo de Etídio (BE), substância potencialmente mutagênica, na mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), realizando-se sempre comparações com o controle positivo, etilmetanosulfonato (EMS). Escolhemos o brometo de etídio por se tratar de uma substância usada frequentemente em métodos de biologia molecular, sendo tida como mutagênica, apesar de não constar como carcinogênico nas listagens da Agência Internacional para Pesquisa de Câncer (IARC). A pesquisa foi feita ao longo de 25 gerações, e em seis gerações (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a gerações) foram analisados: (1) os efeitos sobre padrões morfológicos, (2) a produtividade diária ao longo de 15 dias. Além disso, foram analisadas também: (3) alterações bioquímicas em enzimas do sistema oxidativo, acarretadas pela exposição a diferentes concentrações de brometo de etídio e EMS, (4) alterações gênicas: em nível de transposição do elemento transponível *Bari-1* e na expressão dos genes que codificam as proteínas catalase, hsp 70 (*heat shock protein*), superóxido dismutase 1 e esterase-6 e (5) longevidade. Com relação à produtividade diária, foram feitas cinco réplicas, envolvendo controles negativo (sem exposição a nenhum agente mutagênico) e positivo (com EMS), além de três grupos, expostos a 1, 5 e 30 μM de BE. Os resultados revelam que houve diferenças nas produtividades diárias da maioria dos dias analisados, até mesmo na menor concentração de BE. Além disso, uma análise comparativa dos efeitos do BE no número total de fêmeas e machos revela que a na 1^a e na 25^a gerações não houve diferenças estatisticamente significantes, mas nas demais gerações houve diferenças, como na 10^a geração, em que todos os machos e fêmeas tratados com EB apresentaram diferenças com relação ao controle negativo, sendo que até mesmo o EMS, em alguns casos, não mostrou diferença. Cabe ressaltar que os machos apresentaram-se mais sensíveis aos efeitos do BE do que as fêmeas, e a presença do BE alterou as proporções de 1:1 entre machos e fêmeas. A longevidade das moscas analisadas também sofreu alteração quando expostas ao EB, mostrando-se menor para o grupo tratado. A análise do polimorfismo de inserção do elemento transponível *Bari-1* mostrou que não há diferença entre tratados e controle. A análise enzimática revelou que houve diferenças para os grupos expostos para todos os sistemas analisados, com exceção da catalase. No caso da glutatona redutase e da superóxido dismutase a atividade aumentou proporcionalmente à concentração de BE, enquanto a glutatona S transferase mostrou o comportamento contrário, e a catalase não mostrou diferenças significantes. Para a expressão gênica, foi possível verificar algumas alterações no gene *Sod 1*, *hsp70* e *est-6*. Dessa forma, os resultados coletados e analisados revelam a importância de executar pesquisas na área de biomonitoramento, pois mostram que, mesmo em concentrações muito baixas, agentes tóxicos podem desencadear alterações morfológicas, no ciclo de vida e moleculares, em organismos expostos. Em vários aspectos, a pesquisa tem mostrado resultados inéditos e que não tem equivalência na literatura

disponível. Este projeto contou com auxílio financeiro da FAPESP (bolsa de doutorado - 2008/02927-6).

Summary

Each year thousands of new chemicals enter the market, and an enormous volume of waste is generated by human activity. Accordingly, there is a great concern regarding their short and long term health and environmental effects. A large number of these chemicals is potentially dangerous and can cause harmful biological effects, and changes at the molecular level are usually the first detectable responses of environmental disturbance. To evaluate the effects on biological systems, are used bioindicators, organisms sensitive to toxic agents.

This study aimed to analyze the effects of Ethidium Bromide (EB), a potentially mutagenic substance, in the fruit fly (*Drosophila melanogaster*), comparing with a positive control, ethylmethanesulfonate (EMS). We chose ethidium bromide because it is a chemical frequently used in molecular biology techniques, and considered as a mutagenic although it is not included in the lists of the International Agency for Research on Cancer (IARC). The survey was conducted over 25 generations, and in six generations (1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th generations) were analyzed: (1) the effects on morphological patterns, (2) the daily productivity over 15 days. In addition, we also analyzed: (3) biochemical changes in enzymes of the oxidative system brought about by exposure to different concentrations of ethidium bromide and EMS, (4) genetic alterations: level of transposition of the transposable element Bari-1 and expression genes that encode proteins catalase, hsp 70 (heat shock protein), superoxide dismutase 1 and esterase-6 and (5) longevity.

Concerning daily productivity, five replicates were done, involving negative and positive controls (not exposed to any mutagen and with EMS, respectively), and three groups exposed to 1, 5 and 30 μM of EB. The results show that there were differences in daily yields of most analyzed days, even for the lowest EB concentration. Besides, a comparative analysis of the effects of EB in the total number of females and males produced shows that for the 1st and 25th generations there were no statistically significant differences, but in other generations they occurred, for example at the 10th generation, in which all males and females treated with EB showed differences compared to the negative control. Even EMS, in some cases, showed no difference.

Remarkably, males were more sensitive to the effects of EB than females, and the presence of EB altered the proportions of 1:1 between males and females. The flies' longevity was altered when exposed to EB, decreasing for the treated group. The analysis of polymorphism of the transposable element Bari-1 showed no difference between the treated and control groups. The enzymatic analysis revealed that there were differences between for the exposed groups for all systems analyzed, with the exception of catalase. For glutathione reductase and superoxide dismutase the activity increased proportionally to the concentration of EB, whereas glutathione S transferase showed the opposite behavior, and catalase showed no significant differences. Concerning gene expression, we observed some changes in the SOD 1, hsp70 and est-6 genes.

Thus, the collected and analyzed results reveal the importance of performing research on biomonitoring, because they show that even at very low concentrations, toxic agents can trigger morphological changes in the molecular life cycle in exposed organisms. In many ways, research has shown unprecedented results that do not have equivalent in the available literature.

This project had financial support from FAPESP (Ph.D. scholarship - 2008/02927-6).

II. Introdução

II. Introdução:

A relevância do monitoramento da contaminação ambiental cresce a cada ano, na medida em que as consequências da atividade humana assumem dimensões globais, não circunscritas ao sítio de alteração. A modificação no meio ambiente habitual configura-se em um impacto biológico a curto ou longo prazo (BONILLA-RODRIGUEZ, 1989). Neste contexto ecológico, o biomonitoramento trata-se do uso sistemático das respostas de organismos vivos (também denominados “sentinelas”) para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópico (OEHLMANN et al., 1996, MATHEWS et al., 1982).

A resposta biológica refere-se ao conjunto de reações de um indivíduo ou comunidade em relação a um ou a vários estímulos (ARMITAGE, 1995). Bioindicadores ou organismos sentinelas são espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes (WASHINGTON, 1984). Além disso, o estresse abiótico atua como um fator importante determinando a distribuição e abundância das espécies.

A utilização de espécies como uma forma de se avaliar as condições ambientais tem sido verificada com bastante frequência ao longo da história. Durante a Revolução Industrial (século XIX), canários foram colocados dentro das minas para monitorar a qualidade do ar. Quando esses apresentavam algum sintoma decorrente das elevadas concentrações de monóxido de carbono, as pessoas eram retiradas do local, evitando possíveis danos à saúde (CAIRNS JR. e PRATT, 1993).

Dentre os indicadores podem-se utilizar as respostas bioquímicas (enzimáticas e genéticas), fisiológicas, metabólicas e do ciclo de vida (BOUDOU e RIBEYRE, 1997; CALOW, 1993; PIVETTA et al., 2001; ROSENBERG e RESH, 1993). O uso das respostas fisiológicas é conhecido como teste toxicológico e, com a análise da

exposição crônica, podem ser verificados os efeitos deletérios como genotoxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (REYNOLDSON e METCALFE-SMITH, 1992).

Os efeitos biológicos em nível de organismo se manifestam depois de eventos bioquímicos e celulares e, dessa forma, esses parâmetros podem ser utilizados como indicadores de estresse para avaliar as condições fisiológicas de um organismo (STEGMAN et al., 1990), em virtude dos organismos responderem a condições estressantes pela indução da expressão de genes para produzir proteínas específicas (NAZIR et al., 2003), que atuam como forma de minimizar o índice de estresse (ATKINSON et al., 1985).

Mudanças no ambiente natural gera estresse, o qual pode afetar a homeostase celular. A condição fisiológica de um organismo sob estresse pode ser verificada utilizando diferentes marcadores moleculares e bioquímicos como a expressão de proteínas de estresse e atividade de enzimas antioxidantes (AIT-AISSA et al., 2000; WILCZEK, 2005). Dessa forma, apenas uma combinação de muitas classes de proteínas que respondam ao estresse fornece bioensaios suficientemente sensitivos para a maioria das classes de poluentes ambientais (BIERKENS, 2000).

Dentre os mecanismos de defesa celular envolvem a indução de proteínas adequadas denominadas de *heat shock proteins* (HSPs) ou proteínas de estresse (ATKINSON et al, 1985). O aumento na expressão destas proteínas está relacionado tanto com as funções de proteção como de reparo para reduzir tanto a agregação protéica como conformações não ativas tridimensionais causadas por perturbações ambientais.

Três aspectos caracterizam as HSPs como um biomarcador de poluição: elas são parte da resposta celular de proteção da conformação nativa de proteínas; sua síntese é provavelmente induzida, entre vários fatores, por um grande número de substâncias

químicas. Também, muitos estudos mostraram que a resposta a um estresse pode ocorrer em pequenas concentrações de poluentes que são comumente encontradas no ambiente (BIERKENS, 2000).

Entretanto, essas proteínas também estão presentes nas células sob condições perfeitamente normais, atuando como chaperonas, certificando que as proteínas da célula estejam na forma correta, no local certo e na hora apropriada.

De acordo com peso molecular, Hsps podem ser classificadas em seis grandes famílias, sendo elas: HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, HSP 40 e pequenas *heat shock proteins*. Cada família de HSPs é constitutivamente expressa e/ou induzida sob certas condições e provavelmente em certos compartimentos subcelulares.

As proteínas da família HSP 70 (de 70kDa), exibem um complexo de genes de regulação do crescimento e estresse, e são marcadas de acordo com os diferentes compartimentos subcelulares (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Estão relacionadas com funções tais como: estabilizar precursores protéicos não enovelados antes de se enovelar e se reunir nas organelas (BECKER et al., 1994), ligar-se a superfícies hidrofóbicas de proteínas desnaturadas, ATPases, estabilidade de proteínas para o dobramento completo, transporte através da membrana e proteólise (www.antigenics.com/whitepapers/hsp_potential.html). Além de todas essas funções primárias, realizam também importante papel na defesa celular sob condições de estresse.

Estudos demonstraram a imensa potencialidade da hsp70 no monitoramento da poluição utilizando a abordagem transgênica tanto *in vivo* como *in vitro* (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Elevados níveis de hsp70 foram encontrados em células de organismos expostos a pesticidas (CHOWDHURI et al., 1999; NAZIR et al., 2001), comidas adulteradas (MUKHOPADHYAY et al., 2002), solventes (NAZIR et

al., 2002), e aumento da temperatura (KREBS et al., 1997). Isto é responsável pela expressão Hsps 70 que se torna um importante indicador molecular dos efeitos biológicos adversos. A eficiência da expressão da hsp70, como um biomarcador da poluição ambiental, foi utilizada por vários pesquisadores (VARO et al., 2002; POMERAI, 1996). Assim, muitas pesquisas foram focalizadas na Hsp como biomarcador da agressão por poluentes ambientais (revisado por SANDERS, 1993; BIERKENS, 1998).

- Metabolismo oxidativo:

Pelo mesmo no funcionamento celular normal são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radicais hidroxilas (OH), radical íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO). Entre 0.4 e 4% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em ROS (GOLDEN et al., 2002). Estas são espécies transitórias devido a sua elevada reatividade química que leva a peroxidação de lipídios, oxidação de algumas enzimas, uma oxidação e degradação massiva de proteínas (MATÉS et al., 2000).

Esses metabólitos derivados de oxigênio podem causar danos ou morte celular pelos radicais superóxidos e hidroxilas, por estarem envolvidos em um grande número de mudanças degenerativas, que estão frequentemente associadas com o aumento dos processos peroxidativos e ligados com a baixa concentração de antioxidante (TAMAGNO et al., 1998).

Existem substâncias, denominadas antioxidantes, que protegem direta ou indiretamente as células contra os efeitos adversos de xenobióticos, drogas, carcinógenos e reações com radicais tóxicos (HALLIWELL, 1995). A variedade de antioxidantes, como glutathiona peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD),

catalase dentre outras, realizam sua função pela eliminação de radicais superóxidos, ou pela ativação de uma bateria de proteínas desintoxicantes/defensivas.

A atividade dessas enzimas foi influenciada por muitas mudanças químicas ambientais capazes de aumentar a produção das ROS (VALKO et al., 2006).

A prevenção da oxidação é essencial para organismos aeróbios, pois o decréscimo da proteção antioxidante e um aumento no estresse oxidativo, poderá acarretar em uma redução do tempo de vida, decorrente da citotoxicidade, mutagenicidade e/ou carcinogenicidade.

- Uso de *Drosophila* no monitoramento ambiental:

O uso de *Drosophila*, organismo modelo para estudos toxicológicos, é uma recomendação do *European Center for Validation of Alternative Methods* (ECVAM), que tem por finalidade promover a aceitação científica e regularizar os métodos alternativos que reduzem, refinam e substituem o uso de animais em laboratórios (MUKHOPADHYAY et al., 2004). Espécies deste gênero são frequentemente utilizadas por serem bem estudadas geneticamente, possuir rápido desenvolvimento biológico (MUKHOPADHYAY et al., 2004) e pela sua elevada sensibilidade em detectar a presença de substâncias tóxicas. Além disso, são insetos de fácil criação e manutenção em condições de laboratório para a realização de bioensaios (ALMEIDA et al., 2001).

Sua utilização no monitoramento de danos genéticos causados por agentes químicos tem tradicionalmente mais de 50 anos. Entretanto, somente nos últimos anos vem sendo utilizada com o objetivo de identificar carcinógenos e compreender os mecanismos de ação de produtos químicos mutagênicos (VOGEL et al., 1999).

Dentre os agentes de alta genotoxicidade em *Drosophila melanogaster* estão o dietilestilbestrol, difenil-hidantoína, imipramina, testosterona e tolbutamida que demonstraram um potencial teratogênico elevado, nos músculos e neurônios

(BOURNAIS-VARDIABASIS et al., 1983). Propriedades carcinogênicas foram expressas após exposição a acetamida, acrilamida, benzopireno, ciclofosfamida, dietilestilbestrol, propilenoimina, tiouréia e o-toluidina (BATISTEALENTORN et al., 1995).

- Exposição a agentes químicos tóxicos:

Trabalhar em um ambiente de laboratório de biologia molecular implica na exposição regular a uma grande variedade de substâncias químicas (como por exemplo, solventes e reagentes para coloração), agentes físicos (como radioisótopos) e agentes biológicos (como vírus e bactérias). Muitas dessas substâncias são perigosas (tóxicas, irritantes, infecciosas, alergênicas, carcinogênicas, etc.), enquanto que algumas dessas têm suas propriedades toxicológicas desconhecidas, sendo, portanto, suspeitas.

Chapot et al. (2009) listaram alguns produtos muito utilizados em laboratórios, sendo que dentre eles está o etanol, como o produto mais usado em laboratórios atingindo a proporção de 70%, seguido pelo brometo de etídio, com 55%. Dentre os agentes conhecidos ou suspeitos como carcinogênicos pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) os mais frequentemente utilizados incluem o formaldeído (17%), vírus oncogênicos (4%) e acrilamida (32%).

O tipo de exposição encontrado nos laboratórios de pesquisa é extremamente diversificado, em virtude das pesquisas envolverem métodos muito variados. Poucos agentes carcinogênicos são utilizados com frequência, mas muitos pesquisadores podem ser expostos ocasionalmente a carcinógenos humanos.

Dessa forma, o processamento de substâncias com alto potencial tóxico ou mutagênico, tem sido um grande desafio da maioria dos laboratórios de pesquisa. Dentre os milhares de resíduos gerados por laboratórios de pesquisa, foi decidido analisar os efeitos tóxicos do brometo de etídio (BE), como é comumente conhecido o

brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio, um composto que se intercala reversivelmente entre as bases nitrogenadas, afetando muito de suas funções, incluindo a síntese de DNA e RNA e atividades mitóticas. Devido a sua capacidade de intercalação, o EB é um corante utilizado para ácidos nucleicos (SAMBROOK et al., 1989), mas também tem sido relatada sua capacidade de possuir efeitos anticancerígenos (NISHIWAKI et al, 1974). Por essa razão é muito utilizado em métodos de biologia molecular e estudos estruturais de DNA e cromatina.

Heinen (1978) demonstrou que o BE inibe o crescimento celular em cultura de tecidos, até mesmo em baixas concentrações, mas apesar disso, sua aplicação potencial na saúde humana é evitada devido a efeitos mutagênicos em organismos modelo. As alterações na estrutura do DNA poderiam ser perpetuadas durante o processo de duplicação (Figura 1).

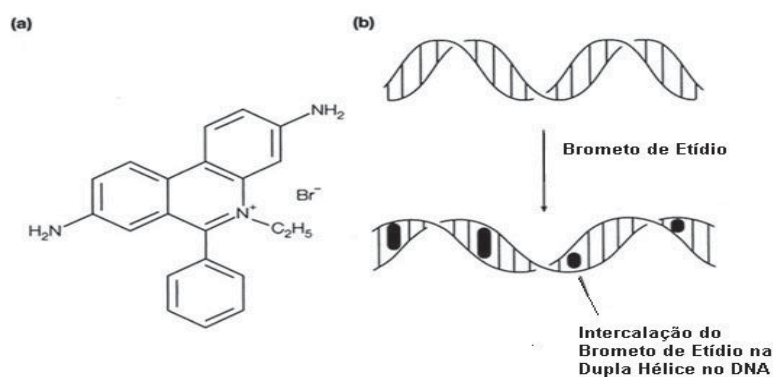


Figura 1: (a) estrutura molecular do Brometo de Etídio; (b) Processo de intercalação *in vitro* do BE na dupla hélice do DNA.

Experimentos reportados por Nass (1972) indicam que concentrações entre 0,3 e 1,3 μM de BE inibem a síntese de DNA mitocondrial e não do nuclear, e como consequência, também é inibido o crescimento tanto de fibroblastos de ratos como células do rim de hamster. Outro estudo demonstrou que o BE acumula-se em mitocôndrias isoladas de ratos e, isto interfere com a atividade metabólica relacionada

com a respiração (PEÑA et al., 1977). Ovos de ouriço-do-mar expostos à água contendo 50 μM de EB desenvolveram anormalidades cromossômicas e falhas no processo de divisão (VACQUIER e BRACHET, 1969).

Resultados em bactérias demonstraram que o BE é um efetivo mutágeno *frameshift* quando são ativados metabolicamente por microsossomos (MCCANN et al., 1975). Em *Saccaromyces cerevisiae* atua como um forte indutor de mutantes *petites* (SLONIMSKI et al., 1968). Sua ação é baseada na inibição do ácido nucleico mitocondrial e síntese de proteínas e, provavelmente, intercala-se entre os pares de base do DNA mitocondrial (PERLMAN e MAHLER, 1971).

Em ratos, o EB aparentemente tem pouco ou nenhum acesso ao DNA *in vivo*, enquanto que ocorre intercalação perfeita no DNA isolado nuclear, *in vitro* (PACK e LOEW, 1978). Até a década de 80, não consta na literatura nenhum estudo avaliando a atividade mutagênica do BE em *Drosophila*. Marcos et al. (1981) testaram a ação mutagênica deste composto em duas espécies do gênero *Drosophila*, *D. melanogaster* e *D. simulans* estabelecendo a LC_{50} para as duas espécies, revelando ser a *D. melanogaster* mais sensível aos efeitos genotóxicos do BE do que *D. simulans*.

BE também é um intercalante inibidor da topoisomerase II (topo II). A topo II é uma enzima encontrada em todos organismos, que regula a interconversão topológica durante a replicação, transcrição e recombinação genética diminuindo o stress torsional no DNA pela introdução de proteínas ligadas à quebra do DNA em ambas as cadeias. Através desta função, topo II possui um papel essencial na manutenção da integridade do material genético (GODARD et al., 2002).

Vários inibidores de topo II, tais como doxorrubicina e etoposida têm sido extensivamente utilizados como agentes quimioterápicos em tratamentos contra o câncer. Além de inibir a atividade catalítica da enzima topo II, eles atuam devido ao

aumento dos níveis de topo II mediada pela quebra do DNA. Este mecanismo converte esta enzima a uma toxina celular, induzindo a apoptose, perda do ciclo celular e genotoxicidade (ATTIA et al., 2002). De fato, os efeitos adversos dessas classes de quimioterápicos podem levar à infertilidade e aumento da incidência de malignidades secundárias (TIBURI et al., 2002).

A ligação covalente do BE ao DNA em concentrações nanomolares envolve a mediação da topoisomerase II clivando uma fita simples ou dupla do DNA. Posteriormente, a conversão do complexo reversível BE-DNA forma adutos irreversíveis que se transformam em inibidores catalíticos da topoisomerase II (SNYDER AND ARNONE, 2002).

As quebras de DNA causadas pelo BE são estáveis e associadas à inibição da topoisomerase II, tornando favoráveis os eventos de recombinação, sendo potencialmente capazes de induzir malignidades secundárias mediadas pelo *crossing-over* mitótico. Esses efeitos foram observados por Becker et al. (2003), quando analisaram o aumento da recombinação mitótica em células diploides de *Aspergillus nidulans* em resposta à exposição ao BE.

Em decorrência de sua toxicidade potencial, existem alguns métodos que visam uma descontaminação do BE. A mais simples e de mais fácil aplicação é baseada no tratamento de soluções de BE com permanganato de potássio em condições de acidez, que pode reduzir a atividade mutagênica em até 3.000 vezes. Entretanto, em se tratando de soluções usadas no descoramento dos géis, onde existe uma baixa concentração de BE (cerca de 1 μ M), utiliza-se o hipoclorito de sódio (água sanitária comercial), na proporção de 1:2, antes do descarte em pia (TEIXEIRA et al. 1998), mas essa técnica faz-se ineficiente já que produz novas substâncias mutagênicas (FONSECA, 2006).

Preocupadas com os possíveis efeitos deletérios do BE, algumas empresas estão trabalhando no desenvolvimento de produtos não tóxicos para a utilização no meio acadêmico, como é o caso das empresas: Biologia Molecular Brasil Ltda. e BioAmerica Inc., cujo lema de sua campanha é: “Não corra mais risco em laboratório” para divulgar os seus produtos GelRed e GelGreen (como não-citotóxico, não-mutagênico e não-perigoso) para substituir, respectivamente, o Brometo de Etídio (BE) e o Syber Green (SYBR - utilizado em PCR em tempo real).

Ao contrário do brometo de etídio, alguns mutágenos não são incorporados ao DNA, mas sim são capazes de provocar alterações químicas diretamente nas bases nitrogenadas, causando um mal pareamento específico, como é o caso de alguns agentes alquilantes, como Etilmetanossulfonato (EMS) e o nitrosoguanidina (NG). Embora tais agentes adicionem grupos alquila (etila, no caso do EMS) em muitas posições de todas as bases nitrogenadas, a mutagenicidade é mais bem relacionada a uma adição de oxigênio, na posição seis, da guanina para criar uma O-6-alquilguanina. Esse evento acarreta em um pareamento incorreto com timina e resultaria em transições GC→AT na próxima rodada de replicação (GRIFFITHS, 1998).

Alguns segmentos lineares de DNA são capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente de homologia entre a região genômica (onde estão inseridos) e o local ao qual se destinam. Esses elementos genéticos móveis são os elementos transponíveis ou transposons (ZAHA, 1996). O deslocamento dessas sequências de DNA gera alterações na organização estrutural do genoma e, além disso, pode modificar a expressão dos genes de seu hospedeiro dependendo do local de sua inserção (CAPY et al., 1998). Pode ainda ocorrer uma recombinação entre eventuais cópias que ocupem um mesmo cromossomo, causando, possivelmente, uma deleção ou inversão da região intermediária. Com isso, uma determinada sequência eliminada pode

se inserir em qualquer outra parte do genoma, juntamente com o elemento que a carrega (LEWIN, 1994).

Espécies do gênero *Drosophila* são consideradas sistemas modelos para estudos de elementos de transposição. Em *Drosophila melanogaster* já foram descritos vários elementos; dentre eles pode-se citar o elemento *Bari-1*, que possui uma sequência de leitura com capacidade de codificar um polipeptídeo com 339 aminoácidos.

A taxa de transposição é geralmente muito baixa em ambientes estáveis, da ordem de 10^{-4} a 10^{-6} para a maior parte dos elementos (BIÉMONT, 1992); entretanto, altas taxas podem ser induzidas por fatores ambientais (ARNAULT & DUFOURNEL, 1994) ou por cruzamentos entre diferentes linhagens (LABRADOR & FONTDEVILA, 1994).

Alguns trabalhos, já mencionados anteriormente, analisam os efeitos do BE em *Drosophila*, entretanto, esses não enfocam as alterações que são o alvo deste trabalho; dessa forma, nossa abordagem é inédita. Um trabalho prévio (OUCHI et al., 2007), revelou alterações em nível morfológico (deformidade de asas e tergitos e, diferenças de coloração), bioquímico (padrão de proteínas totais e esterases), além de alterações na produtividade e na viabilidade de ovos e larvas, assim como também mudanças comportamentais no tempo de cópula e pré-cópula.

O efeito das mutações sobre alterações fenotípicas varia enormemente. Substituições silenciosas, bem como outros tipos podem não ter efeitos perceptíveis, embora códons sinônimos possam ter efeitos diversos sobre a taxa de tradução de mRNA em proteínas (FUTUYMA, 2002). Assim, testes bioquímicos refinados e avaliações em nível de DNA são uma forma de avaliar-se os efeitos de mutágenos sobre o genoma dos indivíduos.

III. Justificativa

III. Justificativa:

Muitas substâncias químicas, centenas delas de uso comum na rotina laboratorial, têm suas propriedades toxicológicas desconhecidas, principalmente no que se refere aos efeitos devidos à exposição crônica.

Organismos biomonitores e biomarcadores combinados oferecem uma forma pela qual se pode avaliar a toxicidade. A utilização de invertebrados, neste caso *Drosophila melanogaster*, traz algumas vantagens nas investigações ecotoxicológicas que podem aprofundar o conhecimento e eventualmente elucidar os mecanismos vinculados aos efeitos que ocorrerão a nível individual, assim como também suas consequências em outros níveis estruturais de organização biológica, como, por exemplo, a bioacumulação específica de produtos químicos poluentes e seus efeitos tóxicos em um indivíduo, em uma população e na comunidade (LAGADIC E CACQUET, 1998).

O brometo de etídio, um reagente comum em laboratórios de Biologia Molecular, teria o potencial de alterar o processo de leitura durante a transcrição devido à sua capacidade intercalante no DNA. Apesar da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) não considerar até hoje o brometo de etídio como cancerígeno, há dúvidas e receios na comunidade científica que lida com essa substância no seu dia a dia em relação aos seus efeitos tóxicos potenciais. A avaliação dos efeitos do brometo de etídio através do uso da *Drosophila melanogaster* como organismo sentinela procurou aprofundar uma pesquisa iniciada durante o Mestrado, na qual observamos alterações morfológicas, bioquímicas, comportamentais, fases do ciclo de vida e produtividade.

IV. Objetivos

IV. Objetivos:

- **Gerais:**

Neste trabalho os objetivos foram:

- Determinar a toxicidade do brometo de etídio (EB), a níveis de parâmetros biológicos, gênicos e bioquímicos, utilizando a *Drosophila melanogaster* como bioindicador.

- **Específicos:**

- Avaliar os efeitos sobre os parâmetros biológicos ao longo de 25 gerações, para verificar a produtividade (Número de moscas adultas que emergem das pupas diariamente, a cada cinco gerações), longevidade (de indivíduos separados por sexo e casais) e alterações morfológicas (deformações, alteração no padrão de coloração, de posicionamento de estruturas corpóreas), levando-se em consideração os indivíduos adultos recém-emergidos das pupas.

- Analisar bioquimicamente, através de ensaios enzimáticos para a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e Glutathione S Transferase (GST), de forma a verificar se o BE causa estresse oxidativo.

- Em nível gênico, realizar um estudo da transposição do elemento *Bari-1* e o nível de expressão gênica para os genes que codificam: CAT, SOD I, SOD II, Est-6, e HSP 70.

- Correlacionar o nível de expressão gênica com a atividade das enzimas sintetizadas.

Todos estes experimentos foram realizados em comparação com grupos controles, um negativo não submetido a nenhum produto químico e outro controle

positivo, exposto ao EMS (Etil metanosulfonato), agente comprovadamente mutagênico em *D. melanogaster*.

Os resultados obtidos foram organizados na forma de capítulos que correspondem a uma breve introdução (capítulo I), a uma revisão de *Drosophila* como bioindicador da poluição ambiental (capítulo II), aos efeitos do EB em parâmetros biológicos de *Drosophila melanogaster* (capítulo III) e aos efeitos do EB sobre parâmetros gênicos e bioquímicos de *Drosophila melanogaster* (capítulo IV) e a uma conclusão geral (capítulo V).

V. Referências Bibliográficas

IV. REFERÊNCIAS

- AIT-AISSA, S.; PORCHER, J.M.; ARRIGO, A.P.; LAMBRE, C. Activation of the *hsp 70* promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. **Toxicology**, 145, pp. 147-157, 2000.
- ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. *Drosophila melanogaster meigen*: 3. Sensibilidade ao Carbofuran e Biomonitoramento de seus Resíduos em Repolho. **Quim. Nova**, vol. 24, nº6, pp.768-772, 2001.
- ARNAULT, C.; BUFOURNEL, I. Genome and stresses: reactions against aggressions behavior of transposable elements. **Genetica**, vol. 93, p. 149 – 160, 1994.
- ARMITAGE, P.D., Behaviour and ecology of adults. In: *The Chiromidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges* (P. D. Armitage, P. S. Cranston & L. C. V. Pinder, ed.), pp. 1994-224, London: Chapman & Hall.
- ATTIA, S.M.; SCHMID, T.E.; BADARY, A.O.; HAMADA, F.M.; ADLER, I.D. Moleular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. **Mutat Res**, vol. 520, pp. 1-13, 2002.
- ATKINSON, B.G.; WALDEN, D. B. Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Enviromental Stress. **Academic Press, Orlando, FL**, 1985.
- BATISTEALENTORN, M.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic Evaluation of 10 carcinogens in the *Drosophila melanogaster* wing spot-test. **Experientia**, vol. 51(1), pp. 73-76, 1995.
- BECKER, T.C.A.; CHIUECHETTAS.J.R.; BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M.A. Increase in mitotic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulas* in response to ethidium bromide. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 26, pp. 381-385, 1994.
- BIERKENS, J. G. E. A. Heat shock proteins in ecotoxicological risk assessent. **Advances in Molecular Toxicology**, Utrecht, pp. 531-544, 1998.
- BIERKENS, J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology**, vol. 153, pp. 61-72, 2000.
- BIÉMONT, C. Populations genetics of transposable DNA elements. **Genetica**, vol. 86, p. 67-84, 1992.
- BOUDOU, A.; RIBEYRE, E. Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular level. **Environmental Health Perspectives**, vol. 105, pp. 21-35, 1997.
- BOURNAIS-VARDIABASIS, N.; TEPLITZ, R. L.; CHERNOFF, G. F.; SEECOF, R.L. Detection of Teratogens in the *Drosophila* Embryonic Cell Culture Test: Assay of 100 Chemicals. **Teratology**, vol.28(1), pp. 109-122, 1983.

- BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. **Acumulação de Metais Tóxicos em Glândula Digestiva-Gônada de *Ampullaria canaliculata* (Gastropoda: Prosobranchia) e Efeitos sobre a Delta-Aminolevulinato Desidratase.** 1989. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Bioquímica) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1989.
- CALOW, P. General principles and overview. **Handbook of Ecotoxicology**, pp. 1-5, 1993.
- CAIRNS JR., J; PRATT, J.R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**, pp. 10-27, 1993.
- CAPY, P.; BAZIN, C.; HIGUET, D.; LANGIN, T. **Dynamics and Evolution of Transposable Elements.** 1st France: Landes Bioscience, 1998.
- CHAPOT, B.; SECRETAN, B.; ROBERT, A.; HAINAUT, P. Exposure to hazardous substances in standard molecular biology laboratory environment: evaluation of exposures in IARC laboratories. **Ann Occup Hyg**, vol 53, pp. 485-490, 2009.
- CHOWDHURI, D. K.; SAXENA, D. K.; VISHWANATHAN, P. N. Effect of hexachlorocyclohexane (HCH), its isomers, and metabolites on Hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, vol.63, pp.15-25, 1999.
- FONSECA, J.C.L. Avaliação de Métodos para o Tratamento e a Eliminação de Resíduos Químicos. **Tese de doutorado em Química Analítica**, UNESP, 2006.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva.** Editora Funpec, 2002.
- GRIFFITHS, A.J.F. **Genética Moderna.** Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by alkaline comer assay. **Cytol**, vol. 62, pp. 39-45, 2002.
- GOLDEN, T.R.; HINERFIELD, D.A.; MELOV, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. **Aging Cell**, vol. 1, pp. 117-123, 2002.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. **Biochem. Pharm.**, vol.49, pp. 1341-1348, 1995.
- HEINEN E. Effects of antimetabolic agents either free or bound to DNA on mouse peritoneal macrophages cultivated in vitro. **Virchows Arch B Cell Pathol** vol. 27, pp. 79-87, 1978.

- KREBS, R.A.; FEDER, M.E. Tissue-specific variation in HSP70 expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae. **J. Exp. Biol.**, vol. 200, pp.2007-2015, 1997.
- LEWIN, B. **Genes V**. New York: Oxford University Press, 1994.
- MACCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 72, pp.5135-9, 1975.
- MARCOS, R.; CREUS, A.; XAMENA, N., LÓPES DE SEPÚLVEDA, J. Effect of ethidium bromide on *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Experientia**, vol. 37, pp. 559-560, 1981.
- MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, vol. 53, pp. 83-104, 2000.
- MATTHEWS, R.A.; BUIKEMA, A.L.; CAIRNS JR., J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. **Water Research**, vol. 16, pp. 129-139, 1982.
- MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Toxicity of cypermethrin: hsp70 as a biomarker of response in transgenic *Drosophila*. **Biomarkers**, vol. 7(6), pp. 501-510, 2002.
- MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, vol. 17(5), pp. 249-254, 2003.
- MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D.K.; BAJPAI, V.K.; CHOWDHURI, D.K. Argemone oil induced cellular damage in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: Protective role of 70kDa heat shock protein. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, vol. 17(4), pp. 223-234, 2003.
- MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, vol. 19, n°2, pp.85-90, 2004.
- NASS, M.M.K. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. **Exp. Cell. Res.**, vol. 72, pp. 522, 1972.
- NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; KAR CHOWDHURI, D. Chlorpyrifos induced *hsp70* expression in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*) Bg⁹. **Arch. Environ. Toxicol.**, vol. 41, pp. 443-449, 2001.

- NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; MADMOOD, K.; SAXENA, D.K.; KHANNA, S.K.; CHOWDHURI, D.K. Toxicity of argemone oil, effect on hsp70 expression and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Cell Biol Toxicol**, vol. 18(1), pp. 1-11, 2002.
- NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; KAR CHOWDHURI, D. Induction of *hsp70* in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta** , v.1621, pp.218-225, 2003.
- NISHIWAKI, H.; MIURA, M.; IMAI, K.; OHMO, R.. KASWASHUMA, K.; EZAKI, K.; UCEDA, R.; YOSHIKAWA, H.; NAGATA, K.; TAKEYAMA, H.; YAMADA, K. **Cancer Research**, v.34, p. 2699, 1974.
- OEHLMANN, J.; MARKERT, B.; STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI, P. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. **Anal Bioanal Chem.**, 354(5-6), pp. 540-545, 1996
- OUCHI, R.Y.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). **Bull of Environ Contam Toxicol**, v. 78, p. 489-493, 2007.
- PACK, G.R.; LOEW, G. Origins of the specificity in the intercalation of ethidium into nucleic acids. A theoretical analysis. **Biochim Biophys Acta**, vol. 519, pp. 163-172, 1978.
- PEÑA, A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A.; DE GÓMEZ-PUYOU, M.T. The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. **Arch. Biochem Biophys**, vol. 180, pp. 522, 1977.
- PERLMAN, P.S.; MAHLER, H.R. Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis. **Nature New Biol**, vol. 231, pp. 12-16, 1971.
- PIVETTA, F.; MACHADO, J.M.; ARAÚJO, U.C.; MOREIRA, M.F.R.; APOSTOLI, P. Monitoramento biológico: Conceitos e aplicações em saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, vol. 17, pp. 545-554.
- POMERAI, D. de. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. **Hum Exp Toxicol.**, vol. 15(4), pp. 279-85, 1996.
- REYNOLDSON, T.B.; METCALFE-SMITH, J.L. An overview of the assessment of aquatic ecosystem health using benthic invertebrates. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, vol. 1, pp. 295-308, 1992.
- ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1989.
- SANDERS, B. M.; MARTIN L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. **Sci Total Environ**, vol. 139/141, pp. 459-70, 1993.
- SNYDER, D.R.; ARNONE, M.R. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. **Mutat Res**, vol. 503, pp. 21-35.
- SLONISMSKI, P.P.; PERRODIN, G.; GROFTH, J.H. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". **Biochem Biophys Res Comm**, vol. 30, pp. 232-239, 1968.
- STEGMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.; FORLIN,L.; FOWLER, B.; SANDERS, B.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: proteins and enzymes as indicators of contaminant exposure and effect. **SETAC**, 1990.
- TAMAGNO, E.; ARAGNO, M.; BOCCURI,G.; GALLO, M.; PAROLA, S.; FUBINI,B.; POLI, G., DANNI, O. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. **Cell Biochem. Funct.**, vol. 16, pp. 57-63, 1998.
- TEIXEIRA, K.R.S.; PIRES, W.O.; BALDANI, J.I. Descontaminação de Substâncias Tóxicas: Fenol e Brometo de Etídio. *Embrapa – Comunicado Técnico*, nº25, pp. 1-3, 1998.
- TIBURI, M.; REGULY, M.L. SCHWATSMANN, G.; CUNHA, K.S.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat res**, vol. 519, pp. 141-149.
- VACQUIER, V.D.; BRACHET, J. Chromosomal abnormalities resulting from ethidium bromide treatment. **Nature**, vol. 222, pp. 193-195, 1969.
- VALKO, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 160, pp. 1–40, 2006.
- VARO, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F.J.; NAVARRO, J.C. Bioaccumulation of chlorpyrifos through na experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. **Arch Environ Contam Toxicol**, vol. 42(2), pp. 229-35, 2002.
- VOGEL, E.W.; GRAF, U.; FREI, H.J.; NIVARD, M.M. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. **Iarc Sci Publ.**, vol.146, pp. 146, 1999.

WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, vol. 18, pp. 653-694, 1984.

WILCZEK, G. Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders of Ait-Aissa from industrially polluted áreas exposed to high temperature and Dimethoate. **Comp. Biochem. Physiol.** 141, pp. 194-206, 2005.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Alberto, 1996.

Manuscrito I:
**Review: “*Drosophila*
melanogaster as a Sentinel
Organism of Environmental
Biomonitoring”**

Capítulo II

Manuscrito I:

Review: *Drosophila melanogaster* as a sentinel model for environmental biomonitoring

Ouchi, RY; Granzotto, A.; Ceron, CR; Bonilla-Rodriguez, GO*

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto SP, Brazil

(*) correspondence author: Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, Depto. de Química e Ciências Ambientais, IBILCE-UNESP, Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP Brazil 15054-000. E-mail bonilla@ibilce.unesp.br, Tel (+5517) 3221-2361, Fax 3221-2356.

ABSTRACT

Drosophila has been an ideal system used to define pathways involved in development, in part because of the powerful genetic approaches that are possible. Many of the molecules and pathways important for *Drosophila's* development are evolutionarily conserved between flies and humans. With its evolved nervous system, amenability to genetic analysis, and the full genomic sequence available, *Drosophila* is a valuable tool for investigating and understanding the molecular mechanisms underneath many processes, such as neurodegenerative diseases. Among many *Drosophila* species, *D. melanogaster* is a model species used to investigate potential environmental hazards, because in a brief time many specimens emerge, its short life cycle allows to analyze the effects of one chemical along many generations, and also is very easy to manipulate in laboratories. Furthermore, the *D. melanogaster* model would present significant advantages in time efficiency and cost-effectiveness compared with mammalian models. Using this species as a bioindicator, numerous chemicals were tested and their effects evaluated by several biological parameters including for example morphology, productivity, viability, longevity, enzyme activity and behavior. This review compiles a number of research approaches and data showing the importance of *D. melanogaster* for evaluation of potential environmental chemical hazards.

Key words: *Drosophila melanogaster*, bioindicator, genotoxicity, biological effects.

INTRODUCTION

The continuous exposure of organisms to environmental stressors, among them toxic chemicals, poses a great risk of generating adverse health aftermaths. Accordingly, environmental monitoring is essential to identify health hazards for humans and other species. Since biological effects at the organismal level in response to a stressor always occur after biochemical and cellular events, biochemical and cellular parameters have potential to be used as stress indicators to evaluate the physiological condition of an organism (STEGMAN et al., 1990; NAZIR et al., 2003). Since organisms attempt to withstand the onslaughts of stressful conditions by activating specific genes (NAZIR et al., 2003), their expression may provide an index of stress (ATKINSON ; WALDEN, 1985).

Environmental abiotic stresses such as those induced by chemicals or physical agents play an important role as factors determining the distribution and abundance of species. Evaluating drug-induced developmental and reproductive toxicities represent a major step in the process of drug development, since any reproductive system impairments may result in infertility, teratogenicity, mutagenicity and carcinogenicity effects (BUBLIY ; LOESCHCKE, 2005).

The integrity of the genome, its transmission to subsequent generations and homeostasis are affected by the processes involved in DNA metabolism, like replication, recombination, repair, and cell cycle controls (SEKELSKY et al., 1998). Many environmental factors are capable to exert influence at the genetic level by causing DNA damage. This could be induced, for example, by metals, pesticides, cigarette smoke, radiation, and alkylating substances (WILSON et al., 2003).

However, in order to minimize those consequences, the organisms possess a number of DNA repair pathways capable of mitigating the effects of different types of

DNA damage. A chronic exposure associated to a defect or loss in a DNA repair pathway may accumulate DNA damage such as mutations and chromosomal aberrations that may influence normal life conditions. Genetic disorders may rise in a single organism or in several specimens of a population. Moreover, deleterious consequences from these events could interfere not only in a punctual population but over, the whole ecosystem could be affected, including non-live factors as environmental contamination. (WILSON et al., 2003; DENVER et al., 2006).

Animal modeling is supported by functional similarity that spans the phylogenetic classes. The effects of drugs have been analyzed in several organisms including bacteria, yeast, plants and animals, besides man, whenever it is possible.

Indeed, the degree of biological conservation from yeast to humans has surprised many investigators and is one of the most impressive findings to emerge from comparative genomics. Whereas in the pre-genomic era the challenge was to find similarities between organisms, now the biologist's burden is to define how such genetically similar organisms turn out so differently.

Currently, a significant number of research projects dealing with Biomonitoring are carried out with non-mammalian species. For example, the most commonly used model systems during early stages of drug discovery and development are *Caenorhabditis elegans* (a nematode), *Drosophila melanogaster* (fruit fly), and *Danio rerio* (zebrafish). Although worms and flies are increasingly used in disease-oriented screening of compound libraries, their use in the screening of drug induced adverse effects is not fully explored.

C. elegans have been used as a model organism in biological research for 40 years, since they are approximately 1 mm long, have a life span of about 3 days and they are easy to handle in the laboratory . On the other side, zebrafish are small, 3 cm

vertebrate freshwater fish commonly used to study development and have recently been used to study drug-induced developmental toxicity. The embryos of this organism are transparent allowing for developmental changes to be observed without disturbing the embryo. Developmental toxicity studies in zebrafish are performed by adding compounds directly into the water in which the embryo is developing and then evaluating abnormal morphological changes in the embryo (KWO et al., 2006)

Insects can also be used as model organisms. Among these models, *Drosophila* is the most studied with respect to neurobiology, embryology and developmental genetics. Significant similarity in structure and function of the genes involved in differentiation of different organisms suggests that they are extremely conserved and therefore the principal mechanisms of *Drosophila* development can be extrapolated to vertebrates (MUTSUDDI ; NAMBU, 1998).

In this review we emphasize the importance of the utilization of the *Drosophila* model for the detection of environmental alterations by some chemical pollutants. We present supporting data on the use of *Drosophila* for the analysis of drug-induced adverse reactions in cellular, reproductive, genetic and biological levels. The results obtained by this approach would contribute to evaluate the real environmental risk of those chemicals and help to establish the need of their neutralization or segregation before being discarded in the environment.

Bioindicators refer to organisms that show a sensibility when exposed to chemicals, and all the parameters that are used to analyze the effects are called indicators. Bioindicators/biomarkers systems include a range of endpoints in a variety of laboratory and sentinel organisms and systems exhibiting high reliability short turn-around-time and low cost. Some indicators of environment alterations are physiological, genetic and biochemical (OEHLMANN et al., 1996)

Drosophila melanogaster has been used during the past century as a powerful tool in genetic, behavioral and molecular biology research programs. The reason for this is their conserved physiological, biological and pharmacological pathways, and has also been used in recent years in disease-oriented molecule screens (RUBIN et al., 2000; JAFARI, 2006). The similarity of human and *Drosophila* disease genes has contributed to the use of this animal to identify and target for the treatment of some pathways that are involved to some pathologic symptoms like cancer, neurologic, endocrine, renal, cardiac and the consequences to the exposition to toxic compounds (REITER et al., 2001).

So, an important contribution of *Drosophila* is related to its use to evaluate and validate across a wide spectrum of medical conditions, not only related to diseases but including seizures, aggression, sleep, pain, and psychoactive drug addiction (SONG ; TANOUYE, 2008; MANEV ; DIMITRIJEVIC, 2005). In this context, some recent works describe the biological reaction to the exposure to some exogens compounds. Some of them include behavioral effects (OUCHI et al., 2011; OKAMOTO et al., 2010).

Taking the number of genes as a crude measure of complexity, then *Drosophila*, with 13,767 genes (RUBIN et.al, 2000), is only slightly less complex than humans, who would possess about 19,599 genes (GOODSTADT ; PONTING, 2006; PENNISI, 2007). Bioinformatic approaches yield a critical core of biological similarity, and at the top of the list are the transcription factors and their target, non-coding DNA sequences (COPLEY, 2008). These genes and DNA sequences are profoundly conserved across multicellular organisms; it has been said that at this level there has been precious little evolution since the appearance of bilateral symmetry (DAVIDSON, 2006).

Other gene families are also highly conserved across evolutionary time, including potential pharmaceutical targets such as the protein kinases and the homeobox domain proteins that play key roles in multicellular organisms. This core of functionally essential genes is shared by both vertebrates and invertebrates, thus providing an explanation for why nearly 70% of human disease-causing genes have orthologues in *D. melanogaster*, and a similar proportion can be found in another invertebrate model system, the nematode worm, *Caenorhabditis elegans* (LAI et al., 2000). It is likely that such conserved networks of interacting proteins and genes will respond in a similar way to a particular insult whether in a human or an invertebrate context.

A major concern in using *Drosophila* for any pharmacological study is to evaluate drug uptake by the insect through food consumption. To verify adequate drug intake, a variety of methods can be employed: the addition of food dye to the food and drug mixture, administration of radiolabeled drugs, and measurement of drug concentration in fruit flies. However, some biochemical tests must be employed to verify the presence of the chemicals in the insects, such as mass spectrometry and enzymatic assays. However, these methods are not widely validated for measuring drug concentrations quantitatively. Hence, currently there are no standardized techniques to check drug concentrations in target tissues in adult fruit flies. Although it is not easy to quantify the amount of drug ingested by the flies, it is possible to observe if there are dose-dependent increases in the severity of adverse drug reactions, suggesting that the fruit fly does indeed consume the added compounds while feeding. Using this approach some biological analysis could be done related to longevity, productivity, fertility, time for copulation and pre-copulation and morphological alterations to infer some consequences due to chemical exposition. Despite the challenges with drug uptake, the *Drosophila* model has several advantages that make it a valid approach to screening

adverse drug reactions before the testing of vertebrate model systems (AVANESIAN et al., 2009).

When the use of live organisms in laboratory, mainly in toxicology testing and research, is required, two aspects become conflictive: Science and Ethics. In this context, *in vitro* systems and alternate animal models like those using invertebrates or lower vertebrates that have similarities to higher organisms, such as *Xenopus*, *Drosophila*, *Danio rerio* (Zebrafish), *Oryzias latipes* (Japanese medaka fish), have been proposed for use in reproductive toxicity studies. In this way, new information about xenobiotic induced reproductive adversities could be collected and extrapolated to other biological parameters (ACKERMAN ; EAGLES-SMITH, 2009; BOYD et al., 2010; FORT et al., 2001; HOLDWAY, 2005; ISHIBASHI et al., 2006; JENSEN et al., 2008; SPITSBERGEN ; KENT, 2003).

The use of *Drosophila* is recommended by *ECVAM* (*European Center Validation of Alternate Methods*) for minimizing the use of the “classic” laboratory animal models for biological research and toxicological testing (Festing et al., 1998). *Drosophila* has a high sensibility to detect toxic substances in the environment and these insects are easily manipulated and maintained in laboratories. These characteristics are valuable when compared to other organisms used to perform bioassays.

A variety of parameters can be evaluated: developmental phases, behavior, fertility, productivity, longevity, viability, malformations, gene expression, enzyme activity, genetic effects, chromosomal abnormalities, etc. Accordingly, all of these parameters could be effective tools to screen the environment to which the organisms are exposed and do not involve expensive or sophisticated methods nor equipments (AVANESIAN et al., 2009).

The extensive knowledge of the genetics of *Drosophila melanogaster* and the long experimental experience with this organism has made it useful in mutation research and genetic toxicology (ÇAKIR ; SARIKAYA 2005).

With the completion of the *Drosophila* genome sequence, the next great challenge is to extract its biological information by systematic expression and functional analysis of the genes. The entire protein complement expressed by a genome or by a cell or tissue type is called the proteome (WASINGER et al., 1995). The study of the proteome or proteomics is recognized as one of the main directions of science in the post-genomic era.

Currently, protein analysis is coming back into focus because it has become clear that if one wants to comprehend what is happening in a cell, we must study the cell proteins themselves. In fact, there is a disparity between the amount of mRNA and the amount of proteins produced by a cell (ANDERSON ; SEILHAMER, 1997). For the analysis of tissue samples mRNA as well as proteomic studies can be performed. However, the analysis of body fluids (e.g., serum, urine, cerebrospinal fluid, and hemolymph) is restricted to proteomics since most proteins in these fluids are secreted from other tissues. Furthermore, proteins experience chemical modifications like phosphorylations and glycosylations influencing their activity.

Toxic effects, when evident in *Drosophila* specimens exposed to pollutants, should raise concerns about the possibility of occurring similar events in other species. This review will focus on the use of *Drosophila* for evaluation of toxicity induced by different chemicals: aromatic/polycyclic, hormonal disruptors, insecticides, metals, dyes and other types.

I) **Aromatic/Polycyclic chemicals**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are well-known ubiquitous environmental contaminants. Cells could efflux out lipophilic xenobiotics, such as PAHs, by a transmembrane detoxification efflux pump, permeability P-glycoprotein (P-gp). This mechanism was investigated by Western blot in *D. melanogaster* showing that a 140-kDa P-gp in S12 cells, embryos, and adult flies were expressed. In adult flies, permeability glycoprotein was expressed in the head, abdomen, and thorax and sublocalized in the sexual and olfactory organs. In *Drosophila* exposed to benzopyrene or to ambient air polluted by higher or lower PAH concentrations, P-gp expression showed a dose-dependent increase response. Vaché et al. (2006) demonstrated that *Drosophila* P-gp acts as a barrier against PAH pollutants.

Delgado-Rodriguez et al. (1995) investigated the genotoxicity of three PAHs: anthracene, phenanthrene and naphthalene, and their nitro derivatives by the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *D. melanogaster*. The results demonstrate that these PAHs and their nitro derivative compounds have a genotoxicity activity detected with somatic cells of wing imaginal discs of larvae with high bioactivation capacity.

Benzene, toluene and xylene are monocyclic aromatic hydrocarbon compounds, used both individually and as mixtures, in industry as well as household. Exposure to these hydrocarbons, occupationally or not, is harmful to several species, including humans. Studies involving exposures to these compounds, individually, have shown that benzene was more toxic compared to toluene or xylene. Mudiam et al. (2010) tested a working hypothesis that toluene and/or xylene in a mixture containing benzene affect benzene induced toxicity in a non-target organism, *Drosophila melanogaster*. The authors showed the modulation of toluene toxicity by xylene. Results suggest antagonistic effect of xylene and toluene on benzene toxicity and additive/synergistic

effect of xylene on toluene induced toxicity. Thus, expression of stress genes may be used as an assay for detection of early cellular toxicity. Further, their study supports the use of *Drosophila* as an alternative animal model for first tier screening of adverse effects of chemical mixtures. Singh et al (2010) verified the effects of the co-exposure to 25.0-100.0 mM benzene, 25.0-100.0 mM toluene and 25.0-100 mM xylene using as model organism *D. melanogaster*. They observed alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26 (proteins that are involved to cellular integrity) and generation of Reactive Oxygen Species (ROS). Moreover, based in their results expression of stress genes may be used as an assay for detection of early cellular toxicity. So, this study supports the use of *Drosophila* as an alternative animal model for first tier screening of adverse effects of chemical mixtures.

Singh et al. (2011) used *Drosophila* as a model to test the genotoxic and apoptotic potential of benzene, toluene and xylene and subsequently evaluated the efficiency of two phytochemicals: quercetin and curcumin in attenuating chemical induced toxicity. The concentration range was 1.0-100.0 mM of each compound, showing significantly increased apoptotic markers and genotoxicity in a concentration and time-dependent manner in organisms exposed. The authors observed a significant reduction in cytochrome P450 activity, GST levels, oxidative stress parameters, genotoxic and apoptotic endpoints when organisms were exposed simultaneously to test quercetin or curcumin, suggesting a protective role.

II) **Endocrine Disruptors chemicals**

Genotoxic substances such as diethylestilbestrol, diphenylhydantoin, imipramine, testosterone and tolbutamide have shown a high teratogenic potential,

whose effects were evident in muscles and neurons in *D. melanogaster* (Bournais-Vardiabasis et al., 1983).

Dinan et al. (2001) presented in their paper results concerning a screening of 80 potential environmental contaminants, including industrial chemicals, pesticides, pharmaceuticals, phytoestrogens and vertebrate steroids, including a comparison of the data for known (ant)agonists. The B(II) bioassay was developed as a rapid and reliable tool for detecting potential insect growth regulators acting as ecdysteroid (ant)agonists. Based on an ecdysysteroid-responsive cell line from *D. melanogaster*, was an ideal suited to the evaluation of environmental contaminants as potential endocrine disrupters. The vast majority of xenobiotics also showed no (ant)agonist activity. Among the industrial chemicals, antagonistic activity was observed for bisphenol A median effective concentration (EC₅₀) of 0.1mM and diethylphthalate (EC 50 of 2.0mM). Some organochlorine compounds also showed weak antagonistic activity, including o,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), p,p'-DDE, dieldrin, and lindane (EC50 0.03mM). For lindane, bisphenol A, and diethylphthalate, activity is not associated with impurities in samples and, for lindane and bisphenol A at least, the compounds are able to compete with ecdysteroids for the ligand binding site on the receptor complex, albeit at concentrations very much higher than those found in environment. So, the B (II) assay has a potentially valuable role to play in distinguishing between endocrine-mediated, which occurs at submicromolar concentrations, and pharmacological effects.

Oehlmann et al. (2009) reviewed the biological effects of the most widely used plasticizers, including dibutyl phthalate, diethylhexyl phthalate, dimethyl phthalate, butyl benzyl phthalate and bisphenol A (BPA), on wildlife, with focus on annelids, molluscs, crustaceans, insects, fish and amphibians. Phthalates and BPA have been

shown to affect reproduction in all studied animal groups, to impair development in crustaceans and amphibians and to induce genetic aberrations. Most plasticizers appear to act by interfering with the functioning of various hormone systems, but some phthalates have wider pathways of disruption. Effect concentrations of plasticizers in laboratory experiments coincide with measured environmental concentrations, and thus there is a very real potential for effects of these chemicals on some wildlife populations. The most striking gaps in their current knowledge on the impacts of plasticizers on wildlife are the lack of data for long-term exposures to environmentally relevant concentrations and their ecotoxicity when part of complex mixtures.

III) Insecticides and herbicides

The insecticide/herbicides, although formulated to specific targets, often have toxic effects on nontarget organisms, including humans. When people are exposed to insecticides, they may have simple irritation of the skin and eyes, and long term exposure can result in severe effects such as affecting the nervous system, reproductive problems, and also cancer (Alavanja et al., 2004; Bassil et al., 2007). Commonly the health effects depend on the type of insecticide/herbicides. Insecticides are often subclassified by chemical type as organophosphates, organochlorines, carbamates, and pyrethroids. The organophosphates and carbamates kill insects by inactivating the enzyme acetylcholinesterase, causing a disruption of the nervous system (FUKUTO, 1990). Organochlorines interfere the axonic transmission of nerve impulses, by prolonging the opening of the sodium channel or by acting at presynaptic terminals (ZLOTKIN, 1999). Similar to DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane, an organochlorine) pyrethroids affect channel gating and ion permeability (VIJVERBERG et al., 1982).

Studies in *Drosophila* with cypermethrin, a potent synthetic pyrethroid, showed that this insecticide promoted a significant increase in DNA damage in the cells of the medium and previous cerebral ganglia and anterior mid gut of larvae. These results were obtained by the alkaline Comet Assay. Larvae of first instar were exposed to different concentrations of cypermethrin (0.0004, 0.0008, 0.002, 0.2 and 0.5 p.p.m.) mixed in a standard *Drosophila* food and allowed to grow. Even in low concentrations the authors reported a significant dose-dependent increase in DNA damage of the tissues mentioned before, proving that *D. melanogaster* is a model for *in vivo* genotoxicity assessment by the technique of the Comet Assay (MUKHOPADHYAY et al., 2004).

Recently some works focused on proteomic analysis, in order to verify the harmful effects of chemical exposition. Thornton et al. (2010) verified that the exposition of *D. melanogaster* to atrazine (a common herbicide) promoted a differential expression of 28 proteins associated to energy production, involving glycolysis and the electron transport chain. Moreover, some changes were verified in nine proteins associated to detoxification and oxidative stress. Surprisingly, the proteins were identified as belonging to the class of glutathione transferases.

The high bioactivation strains contain chromosomes 1 and 2 from DDT-resistant strain Oregon R(R) which has a high constitutive level of cytochromes P450 (GRAF et al., 1991). Saner et al (1996) have shown that the OR(R) larvae express high levels of CYP6A2. In addition, in the SMART test of *D. melanogaster*, high bioactivation crosses have been developed which are characterized by an increased sensitivity to a number of promutagens and procarcinogens (GRAF ; VAN SCHAİK, 1992).

Tiwari et al. (2011) emphasized that *Drosophila* offered tools for understanding the mechanisms underlying male reproductive toxicity when the flies were exposed to environmental chemicals. They based their review in environmental factors that include

various metals, pesticides and their metabolites. Infertility was probably linked to those chemicals by their presence in the semen at levels that could be correlated to infertility. The authors discuss the contribution of this species as an alternative animal model for quick screening of toxicants due to their reproductive toxicity potential, mainly in males.

Kaya et al. (2000) tested the genotoxicity of five herbicides: four were triazine herbicides (amitrole, metribuzin, prometryn and terbutryn) and the bipyridal compound diquat dibromide. The toxic effects were evaluated by the wing somatic mutation and recombination test of *D. melanogaster*, following standard procedures. Point mutation, chromosome breakage and mitotic recombination produced single spots, while twin spots were produced only by mitotic recombination. Exposure to 0.5 and 1 mM of amitrole clearly increased the frequency of small single, large single and total spots. Terbutryn, at concentration of 5 mM, induced a slight increase in the frequency of small single and total spots, but this result could be a false positive. The three other herbicides tested did not show any genotoxic effect.

In a different point, we could mention the use of insecticides to combat this model insect: *D. suzukii* is an invasive pest of small-fruit crops, because this insect is able to oviposit into and damage ripe and ripening fruit, making them unmarketable. Bruck et al. (2011) have done laboratory bioassays and field trials, and identified a number of insecticides representing various modes of action that are effective in controlling this species. Field application of pyrethroids, organophosphates or spinosyns provided 5-14 days of residual control. The efficacy of the neonicotinoids as adulticides was not satisfactory compared with the other contact-mode-of-action chemicals. So, neonicotinoids are not currently recommended for *D. suzukii* management.

The evaluation of toxicity and genotoxicity effects of spinosad and deltamethrin were analyzed in two species: *D. melanogaster* and *Bactrocera oleae*, using the somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster*. The insecticides were found to be more effective against *Bactrocera* than against *Drosophila* adults. However, spinosad was significantly more toxic than deltamethrin to *D. melanogaster*. The results showed a lack of genotoxic activity of both insecticides under the *in vivo* experimental procedure employed, at least at the applied doses.

Gupta et al. (2010) showed that third instar larvae of *Drosophila* when submitted to a treatment of chlorpyrifos, in a different concentrations (0.015-15.0 µg/L) for 2-48h presented reactive oxygen species (ROS) generation, oxidative stress markers, DNA damage and apoptotic cell death end points. Moreover, depolarization in mitochondrial membrane potential and increased caspase-3 and caspase-9 activities in these organisms indicated both as potential targets of chlorpyrifos. A significant positive correlation was observed among ROS generation, apoptosis and DNA damage.

IV) Metals

Exposure to nickel, a heavy metal, induces adversal health effects at different targets at the immunologic, neural, and reproductive systems. Moreover, this metal is classified by IARC (International Agency of Research on Cancer) as a potent human carcinogen. In *D. melanogaster* no significant effect were seen in wing spot test, but it induced a dose-dependent increase in DNA damage, verified by the comet assay (MARCOS et al., 2011).

Mishra et al. (2011) verified in *Drosophila* whether both pre-and post-replication pathways are affected by Cr (VI) leading to genotoxicity, which may have as a consequence metal-induced carcinogenesis.

Cerium sulfate is a lanthanide, one of a group of Rare Earth Elements (REEs) used to make lighters, catalysts, ceramics, and magnets. The amount and diversity of their use is increasing annually. In particular, cerium compounds are used by Chinese farmers to increase the yield and quality of crops (XU, 1997; WEN et al., 2000). With the widespread application of rare-earths, multi-element compound fertilizers in China, REEs have entered both in soil and aquatic systems. Early reports (ZHANG et al., 2002) demonstrated that REEs can accumulate in different parts of plants and the concentrations in roots, leaves, and stems may increase remarkably where REE fertilizers are applied (Wen et al., 2000). These may lead to the transfer of REEs through the food chain to humans. Huang et al. (2010) verified that this compound in *D. melanogaster* caused life span shortening and generated oxidative toxicity by the decrease of CAT and SOD activity (enzymes involved in detoxification process) and an increase of lipid peroxidation.

The exposition to mercury, on the other side, causes neurodevelopmental disorders and neurological pathologies in infants, causing microcephaly and mental retardation. Attia et al. (2002) investigated mercury effects on purified γ -secretase activity, both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, it was verified that mercury strongly inhibits γ -secretase in a dose-dependent manner, with IC (50) values of 50-125 nM. *In vivo*, immunoblot analysis of embryonic protein extracts showed that this enzyme was inhibited by mercury. Moreover, induced several neurodevelopmental abnormalities in embryos and adults wing-notching phenotypes. So, they suggest that inhibition of γ -secretase and the disruption of Notch developmental pathway potentially contribute to mercury-induced toxicity in the nervous system. Carmona et al. (2008) tested two mercurial compounds, mercury chloride and methyl mercury, in order to evaluate the genotoxic effects in the *Drosophila* wing spot test. Several concentrations were tested

but the results suggest that the mercury compounds tested exhibit a lack of genotoxic activity in the wing spot assay of *D. melanogaster*.

Carmona et al. (2011) analyzed the genotoxic effect of two nickel-compounds, nickel chloride and nickel sulphate in larval haemocytes of *D. melanogaster*, using two different methods, comet assay and wing-spot assay. These somatic cells offer several advantages: they are highly sensitive to genotoxic agents, the sampling and processing methodologies are quite simple and the level of basal DNA damage is relatively low. No significant increases were observed in wing spot test. However, when both treatments were simultaneous, they showed that both nickel compounds have a synergistic interaction. So, both compounds could act as co-mutagens interfering with DNA-repair processes and that *in vivo* comet assay is a sensitive and effective method for detecting the DNA damage induced by chemicals in haemocytes of *D. melanogaster*.

The genotoxic activity of cadmium chloride had been evaluated in the somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster*. Moreover, its possible modulating effect on the genotoxicity of two known mutagenic agents, potassium dichromate and ethyl methanesulfonate was investigated by Rizki et al. (2004). Their results with potassium dichromate were consistent with their hypothesis that cadmium can interfere with repair mechanisms, the ethyl methanesulfonate data suggest that other modulating mechanisms are also involved in the genotoxicity of this metal.

V) Dyes

Ethidium bromide (EB) is a common laboratory stain for the electrophoresis of double-stranded DNA and RNA (SAMBROOK et al., 1989), but it has been reported to possess a significant anti-cancer effect (NISHIWAKI et al., 1974). However, its potential applications in human healthcare have been prevented as a consequence of its

mutagenic activities reported in model organisms. Experiments reported by Nass (1972) indicated that 0.3 to 13 μM of EB inhibit the growth of both mouse fibroblasts and hamster kidney cells, and that mitochondrial, not nuclear DNA synthesis was also inhibited by EB. Peña et al. (1977) showed that EB accumulated in isolated rat mitochondria and interferes with metabolic activities related to respiration. Sea urchin eggs exposed to water containing 50 μM of EB develop chromosomal abnormalities and fail to divide normally (VACQUIER ; BRACHET, 1969).

Nishiwaki et al. (1974) pointed out that in mice EB acts as an inhibitor of RNA-dependent DNA polymerase activity, and for this reason it can be considered as an anti-tumor agent. Furthermore, Heinen (1978) shows that EB inhibits cell growth in tissue culture, even at very low concentrations; but in spite of this, EB is not used for that purpose. The intercalating properties that are advantageous for biological techniques, is harmful in contact of living organisms because this chemical could cause mutations.

With reference to the mutagenic capacity of EB, the results in bacteria show that it is an effective frameshift mutagen if it is metabolically activated by liver microsomes (MCCANN et al., 1975). In *Saccharomyces cerevisiae* EB acts as a strong inducer of *petite* mutants (SLONIMSKI et al., 1968). Its action is based on the inhibition of mitochondrial nucleic acid and protein synthesis and is probably due to specific intercalations between the base pairs of mitochondrial DNA (PERLMAN et al., 1971).

In mice, EB apparently has little or no access to nuclear DNA, at least in vivo, while it intercalates perfectly well with isolated nuclear DNA in vitro (PACK et al., 1978). This difference could be ascribed to its metabolization; it could be transformed by detoxification enzymes and transformed to by-products.

EB is an intercalating inhibitor of topoisomerase II (topo II). Topo II is an ubiquitous enzyme that regulates DNA topological interconversion during replication,

transcription and genetic recombination decreasing torsional stress in DNA by introducing transient protein-bridged DNA breaks in both DNA strands. Through this function, topo II plays an essential role maintaining the integrity of genetic material (MO ; BECK, 1999; GODARD et al., 2002). Several topo II inhibitors, such as doxorubicin, etoposide and ellipticine have been extensively used as chemotherapeutic agents in anti-cancer treatments. Rather than inhibiting the catalytic activity of the topo II enzyme, they act by increasing levels of topo II mediated DNA cleavage. This mechanism converts essential enzyme into a potent cellular toxin, inducing apoptosis, cell cycle arrest and genotoxicity (ATTIA et al., 2002). In fact, long-term adverse effects of this class of chemotherapeutic agents include infertility and increased incidence of secondary malignancies (TIBURI et al., 2002).

Ouchi et al. (2007) reported that *Drosophila melanogaster* exposed to ethidium bromide showed altered expression of total proteins and esterase-6, involved in the reproductive process. This enzyme is produced by both sexes, but adult males have a specific activity of EST-6 that is five or more times greater than any other developmental stage or in adult females. EST-6 is concentrated in male anterior ejaculatory ducts, a secretory and propulsive structure of the genital tract (RICHMOND et al, 1980; SHEEHAN et al., 1979). At copulation, males partially deplete their supply of EST-6, transferring it to females, and they resynthesize EST-6 to the pre-copulation levels in 1-2 days (RICHMOND et al., 1980; RICHMOND ; SENIOR, 1981). This effect could be responsible for changes observed in daily productivity (OUCHI et al., 2007).

Ouchi et al. (2011) verified that ethidium bromide (EB) when exposed to *D. melanogaster* were capable to interfere in eggs, pupae, larvae and adults viability.

Moreover, these drugs affected the insect's behavior, evaluated as the time spent for copulation and pre-copulation.

Other dyes showed genotoxicity when exposed to *Drosophila melanogaster*, as acridine orange and acriflavine (ALBA et al., 1983).

On the other side, other dyes seem to be safer to use. Coomassie blue (CB) is a dye used for protein staining after electrophoresis in polyacrylamide gels and protein concentration determinations. It is defined as azo type, like RBBR (Remazol Brilliant Blue R or Reactive Blue 19). In the family of brilliant blue some of them are used as colorants in textile and leather. Okamoto et al. (2010) mixed CB with the culture medium used for *Drosophila* and found low toxicity; estimated LC50 was 38 mM by extrapolation, much higher than the dissolution limit of 15 mM. Using 50 µM CB, the authors did not find significant effects along 10 generations of *D. melanogaster* in terms of pre-copulation and copulations times, flies' weight, carboxylesterase activity or emergence. It was also reported that in the presence of CB, there was a decrease of the oviposition but an increase of viability.

VI) Other chemicals

González-César and Ramos-Morales (1997) verified the induction of large single and total spots as a consequence of genotoxic effects of sodium azide (in all the tested concentrations), a potent mutagen for bacteria and barley, for somatic mutation and mitotic recombination induction in wing imaginal disc cells of *Drosophila melanogaster*. So, alterations in wings cells of *D. melanogaster* were induced in larvae after chronic exposure.

The presence of varying ethanol concentrations in the culture medium of *Drosophila* caused the malformation of legs (segments lacking, absence of the legs or deformed), wings, dumbbells and melted buccal parts (RANGANATHAN et al., 1987).

Perfluorooctanoic acid showed toxic effects at the organism level, associated to developmental stages of *Drosophila melanogaster*. The larval phase shows to be more sensitive, having reduced the body volume, aberrant behavior and poliphasic lethality. Moreover, adults showed a decrease in weight in both sex and a reduction of longevity in males. The results indicated that a competition for nutritional components, having as consequence interruption of metabolic pathway responsible of larval compartment (WANG et al., 2010).

Ouchi et al. (2011) verified that ethylmethanesulfonate (EMS), a compound that cause DNA damage, was capable to interfere in *D. melanogaster* eggs, pupae, larvae and adults viability. Moreover, these drugs affected the times of copulation and pre-copulation. A similar behavior was reported by Itoyama et al. (1998) analyzing the effect of caffeine in *D. prosaltans*.

Chapot et al. (2009) listed some products that have been commonly used in research laboratories around the world. In all of them, ethanol was the product most extensively used (70%), followed by ethidium bromide (55%). The International Agency of Cancer Research (IARC) listed known and suspected carcinogenic products and among them the most frequently used were formaldehyde (17%), oncogenic virus (4%) and acrylamide (32%). From these chemicals, data from Okamoto et al. (personal communication) showed significant effects of acrylamide in *D. melanogaster*. In summary, the type of exposition in research laboratories is extremely diversified, and although not many carcinogenic agents are frequency used, many researchers could be occasionally exposed to human carcinogens.

The Comet Assay explains has widespread use in the majority of the experiments performed to verify the genotoxic potential drugs and some environment agents (DHAWAN et al, 2009). Using brain and mid gut cells, Mukhopadhyay et al. (2004) and Siddique et al. (2005a) demonstrated that *Drosophila* is a suitable model for *in vivo* evaluation of toxicity by the comet assay. This method offers the possibility to detect mechanisms related to DNA repair in *Drosophila*, as analyzed by the exposition to methyl methanesulfonate (MMS), ethyl methanesulfonate (EMS) and N-ethyl-N-nitrosourea (BILBAO et al., 2002).

The comet assay has been adapted for genotoxicity assessment in a wide variety of organisms, including yeast (MILOSHEV et al., 2002), earthworms (RAJAGURU et al., 2003), *Drosophila* (SIDDIQUE et al., 2003; 2005a), and goldfish (DEGUCHI et al., 2007). Dixon et al. (2002) indicated that the Comet assay has the potential for investigating the indirect effects of the chemical constituents of complex chemical mixtures on DNA repair. Siddique et al. (2005b) showed the DNA-damaging potential in *Drosophila* of leachates from industrial solid wastes containing complex chemical mixtures, using this assay.

CONCLUSIONS

For all the reasons previously presented, *Drosophila* is a model organism suitable for experiments involving biomonitoring; all of their biological parameters could be used to verify environmental conditions. *D. melanogaster* is the best choice among all species of *Drosophila* for these analysis. Besides the advantages cited before, *D. melanogaster* would present significant advantages in time efficiency and cost-effectiveness compared to mammalian models. Using controlled variables, studies performed in a laboratory, even when the study exposes the insects to more than a chemical, tend to be just a glance compared to what can occur in the environment, where other variables can be significant. In the environment, the organisms could be exposed to different classes of chemicals which could contribute at the same time in genotoxicity presented by the animals. Moreover, the long-term exposure in most works is not analyzed, as the genotoxic effect, for example, could not be evident in a single exposure. So, if research projects are concerned with the consequences of exposure to pollutants on wildlife, not only chemical substances should be noticed. They should include abiotic factors, like temperature, availability of food, competition for space and sexual behavior. So, we are not postulating that experiments carried out under the controlled environment of a laboratory depict the real situation that organisms face in the environment, but certainly provide scientific findings that can not be ignored, and using *D. melanogaster* as a sentinel organism is a relatively fast, inexpensive and efficient approach to reveal harmful effects.

REFERENCES

- ACKERMAN JT, EAGLES-SMITH CA. Integrating toxicity risk in bird eggs and chicks: using chick down feathers to estimate mercury concentrations in eggs. **Environ Sci Technol**; 43:2166–72, 2009.
- ALAVANJA, M.C.R., HOPPIN, J.A., KAMEL, F. **Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and Neurotoxicity. Annu. Rev. Public Health.** 25, 155–97, 2004.
- ALBA, P.; FERRÉS, M.D.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity of acridine orange and acriflavine in *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res.** 121(3-4):199-203, 1983.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J.A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, 18, 533-537, 1997.
- ATKINSON, B.G.; WALDEN, D. B. Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress. **Academic Press, Orlando, FL**, 1985.
- ATTIA, S.M.; SCHMID, T.E.; BADARY, A.O.; HAMADA, F.M.; ADLER, I.D. Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. **Mutat Res**, 520, 1-13, 2002.
- BASSIL, K.L., VAKIL, C., SANBORN, M., COLE, D.C., KAUR, J.S., KERR, K.J. Cancer health effects of pesticides: systematic review.. **Can Fam Physician.** 53 (10): 1704–11, 2007
- BILBAO, C., FERREIRO, J.A., COMENDATOR, M.A. AND SIERRA, L.M. Influence of mus201 and mus308 mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the Comet assay. **Mutat. Res.**, 503, 11-19, 2002.
- BOURNAIS-VARDIABASIS, N.; TEPLITZ, R. L.; CHERNOFF, G. F.; SEECOF, R.L. Detection of Teratogens in the *Drosophila* Embryonic Cell Culture Test: Assay of 100 Chemicals. **Teratology**, vol.28(1), pp. 109-122, 1983.
- BOYD WA, MCBRIDE SJ, RICE JR, SNYDER DW, FREEDMAN JH. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. **Toxicol Appl Pharmacol**, 245, 153–9, 2010.
- BRUCK, D.J.; BOLDA, M.; TANIGOSHI, L.; KLICK, J.; KLEIBER, J.; DEFRANCESCO, J.; GERDEMAN, B.; SPITLER, H. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. **Pest Manag Sci.** doi: 10.1002/ps.2242, 2011.
- BUBLIY OA, LOESCHCKE V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. **J Evol Biol.** 18(4):789-803, 2005.
- ÇAKIR S, SARIKAYA R Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. **Food and Chemical Toxicology** 43, 443-450, 2005.

- CARMONA, E.R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. **Chemosphere.**, 70(10), 1910-4, 2008.
- CARMONA, E.R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res.** 718(1-2), 33-7, 2011.
- CHAPOT, B.; SECRETAN, B.; ROBERT, A.; HAINAUT, P. Exposure to Hazardous Substances in a Standard Molecular Biology Laboratory Environment: Evaluation of Exposures in IARC Laboratories. **Ann. Occup. Hyg.**, vol. 53, pp. 485-490, 2009.
- COPLEY, R.R. The animal in the genome: comparative genomics and evolution. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 363, 1453–1461, 2008
- DAVIDSON, E.H. *The Regulatory Genome*, Academic Press, 2006.
- DEGUCHI Y, TOYOIZUMI T, MASUDA S, YASUHARA A, MOHRI S, YAMADA M, INOUE Y, KINAE N.. Evaluation of mutagenicity activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and Comet assay using goldfish. **Mutat Res** 627, 178–185, 2007.
- DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res.** 341(4), 235-47, 1995.
- DENVER RD, FEINBERG S, STEDING C, DURBIN M, LYNCH M.. The relative role of three repair pathways in preventing *Caenorhabditis elegans* mutation accumulation. **Genetics** 174, 57–65, 2006.
- DHAWAN A, BAJPAYEE M, PARMAR D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol** 25, 5–32, 2009.
- DINAN, L.; BOURNE, P.; WHITING, P.; DHADIALLA, T.S.; HUTCHINSON, T.H. Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B(II) cell in vitro assay. **Environ Toxicol Chem.**, 20(9), 2038-46, 2001.
- DIXION DR, PRUSKIAM, DIXION LRJ, JHA AN. Marine invertebrate eco-genotoxicology: A methodological overview. **Mutagen** 17, 495–507, 2002.
- FESTING M, BAUMANS V, COMBES R, HALDER M, HENDRIKSEN C, HOWARD B, LOVELL D, MOORE G, OVEREND P, WILSON MS. Reducing the Use of Laboratory Animals in Biomedical Research: Problems and Possible Solutions. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 29 ATLA;26:283–301, 1998.
- FORT DJ, STOVER EL, BANTLE JA, DUMONT JN, FINCH RA. Evaluation of a reproductive toxicity assay using *Xenopus laevis*: boric acid, cadmium and ethylene glycol monomethyl ether. **J Appl Toxicol**, 21, 41–52, 2001.
- FUKUTO, T.R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. **Environmental Health Perspectives.** 87, 245-254, 1990

- GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by alkaline comer assay. **Cytol**, 62, 39-45, 2002.
- GONZÁLEZ-CÉSAR, E.; RAMOS-MORALES, P. Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. **Mutation Research**, 389, 157- 165, 1997.
- GOODSTADT, L. AND PONTING, C.P. Phylogenetic reconstruction of orthology, paralogy, and conserved synteny for dog and human. **PLoS Comput. Biol.** 2, e133, 2006.
- GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 271, 59-67, 1992.
- GRAF, U.; VAN SCHAIK, N.; PACELLA, R. Improved “High Bioactivation” cross for the SMART wing assay, **Dros. Inf. Serv.** 70, 247-248, 1991.
- GUPTA, S.C.; MISHRA, M.; SHARMA, A.; DEEPAK BALAJI, T.G.; KUMAR, R.; MISHRA, R.K.; CHOWDHURI, D.K. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. **Ecotoxicol Environ Saf.**, 73(6):1415-23, 2010.
- HEINEN, E. Effects of antimetabolic agents either free or bound to DNA on mouse peritoneal macrophages cultivated in vitro. **Virchows Arch B Cell Pathol** vol. 27, pp. 79-87, 1978.
- HOLDWAY, DA. Hydra Population Reproduction Toxicity Test Method. In: C. Blaise and J-F Ferard, editors. **Small-scale Freshwater Toxicity Investigations.**, p. 395–411, 2005.
- HUANG, S.F.; YUNLI, Z.; WANG, X.; XIANGWANG, Q.; FANGHU, FANG. Cerium caused lifespan shortening oxidative resistance in *Drosophila melanogaster*. **Ecotoxicology and Environment safety**, 73, 2010.
- ISHIBASHI H, HIRANO M, MATSUMURA N, WATANABE N, TAKAO Y, ARIZONO K. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). **Chemosphere** 2006;65:1019 –26.
- ITOYAMA, M.M.; BICUDO, H.E.; MANZATO, A.J. The development of resistance to caffeine in *Drosophila prosaltans*: productivity and longevity after ten generations of treatment. **Cytobios**, vol.96(382), pp. 81-93, 1998.
- JAFARI MT. Determination and identification of malathion, ethion and dichlorovos using ion mobility spectrometry. **Talanta**. ,69(5), 1054-8, 2006.
- JENSEN GE, NIEMELA JR, WEDEBYE EB, NIKOLOV NG. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use—a preliminary investigation. **SAR QSAR Environ Res** 19, 631– 41, 2008.
- KAYA, B.; YANIKOGLU, A.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat Res.** 16;465(1-2):77-84, 2000.
- KWOK, T.C. ET AL. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. **Nature**, v. 441, p.91–95, 2006.

- LAI, C.H.; CHOU, C.Y.; CH'ANG, L.Y.; LIU, C.S.; LIN, W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. **Genome. Res.** 10, 703–713, 2000.
- MANEV H, Dimitrijevic N. Fruit flies for anti-pain drug discovery. **Life Sci.**, 76(21), 2403-7. Review. 2005.
- MARCOS R, CARMONA E R, CREUS A. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, 718, 33-37, 2011.
- MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 72, pp.5135-9, 1975.
- MILOSHEV G, MIHAYLOV I, ANACHKOV B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutat Res** 513, 69–74, 2002.
- MISHRA, M.; M, SHARMA, A.; NEGI, M.P.S.; DWIVEDI, U.N.; KAR CHOWDHURI, D. Tracing the tracks of genotoxicity by trivalent and hexavalent chromium in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** 722, 44–51, 2011.
- MO Y AND BECK WT. DNA damage signals induction of fas ligand in tumor cells. **Mol Pharmacol** 55:216-222, 1999.
- MUDIAM MK, SINGH MP, CHOWDHURI DK, MURTHY RC. Quantitative evaluation of benzene, toluene, and xylene in the larvae of *Drosophila melanogaster* by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry for potential use in toxicological studies. **J AOAC Int.** Sep-Oct;93(5):1595-9, 2010.
- MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, vol. 19, n°2, pp.85-90, 2004.
- MUTSUDDI M, NAMBU JR. Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause. **Curr Biol.** Nov 5;8(22):R809-11. Review, 1998.
- NASS, M.M.K. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. **Exp. Cell. Res.**, vol. 72, pp. 522, 1972.
- NAZIR, A.; MHUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; KAR CHOWDHURI, D. Induction of *hsp70* in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta** , v.1621, pp.218-225, 2003.
- NISHIWAKI, H.; MIURA, M.; IMAI, K.; OHMO, R.. KASHUMA, K.; EZAKI, K.; UCEDA, R.; YOSHIKAWA, H.; NAGATA, K.; TAKEYAMA, H.; YAMADA, K. **Cancer Research**, v.34, p. 2699, 1974.
- OEHLMANN, J.; MARKERT, B.; STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; BAUERAND, B.; FIORONI, P. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. **Anal Bioanal Chem.** Mar; 354(5-6):540-5, 1996.
- OKAMOTO, D. N. ; OLIVEIRA, L. C. G.; MANZATO, J. A.; ALMEIDA, E.A.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. . Coomassie Brilliant blue dye

- toxicity screen using *Drosophila melanogaster* (Diptera - Drosophilidae). *Drosophila Information Service*, v. 93, p. 40-47, 2010.
- OUCHI, R.Y.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). **Bull of Environ Contam Toxicol**, v. 78, p. 489-493, 2007.
- OUCHI, R.Y.; OKAMOTO, D.N.; CERON, C.R. MANZATO, A.J.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of Ethidium Bromide Effects in the Life Cycle and Reproductive Behavior of *Drosophila melanogaster*. **Dros. Inf. Service**, *In Press*, 2011.
- PACK, G.R.; LOEW, G. Origins of the specificity in the intercalation of ethidium into nucleic acids. A theoretical analysis. **Biochim Biophys Acta**, vol. 519, pp. 163-172, 1978.
- PEÑA, A.; CHAVÉZ, E.; CÁRABEZ, A.; DE GÓMEZ-PUYOU, M.T. The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. **Arch. Biochem Biophys**, vol. 180, pp. 522, 1977.
- PENNISI, E. (2007) Genetics. Working the (gene count) numbers: finally, a firm answer? **Science** 316, 1113
- PERLMAN, P.S.; MAHLER, H.R. Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis. **Nature New Biol**, 231, 12-16, 1971.
- RAJAGURU P, SUBA S, PALANIVEL M, KALAISELVI K. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline Comet assay on fish and earthworm tissues. **Environ Mol Mutagen** 41:85–91.
- RANGANATHAN, S.; DAVIS, D.G.; HOOD, R.D. Developmental toxicity of ethanol in *Drosophila melanogaster*. **Teratology**, vol.36, pp. 45-49, 1987.
- REITER LT, POTOCKI L, CHIEN S, GRIBSKOV M, BIER E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Res.** Jun;11(6):1114-25, 2001.
- RICHMOND, R.C. AND SENIOR, A. J. **Insect. Physiol.** 27,849-852, 1981.
- RICHMOND, R.C.; GILBERT, D.G.; SHEEHAN, K.B.; GROMKO, M.H.; BUTTERWORTH, F.M. 1980, **Science**, 207, 1483-1485.
- RIZKI, M.; KOSSATZ, E.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity modulation by cadmium treatment: studies in the *Drosophila* wing spot test. **Environ Mol Mutagen.**, 43(3), 196-203, 2004.
- RUBIN, G.M.; et al. Comparative genomics of the eukaryotes. **Science**, 287, 2204–2215, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1989.
- SANER, C.; WEIBEL, B.; WÜRGLER, F.E.; SENGSTAG, C. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, **Environ. Mol.**, 27, 46-58, 1996.
- SEKELSKY JJ, BURTIS KC, HAWLEY RS. Damage control: The pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 148:1587–1589, 1998.

- SHEEHAN, K.B.; RICHMOND, R.C.; COCHRANE, B.J., **Insect Biochem.**, vol. 9, 443-450, 1979.
- SIDDIQUE HR, CHOWDHURI DK, SAXENA DK, DHAWAN A. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. **Mutagen** 20:285–290, 2005a.
- SIDDIQUE HR, GUPTA SC, DHAWAN A, MURTHY RC, SAXENA DK, CHOWDHURI DK. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environ Mol Mutagen** 46:189–197, 2005b.
- SIDDIQUE HR, DHAWAN A, SAXENA DK, CHOWDHURI DK. *D. melanogaster* as an in vivo model for somatic cell genotoxicity of chemicals by Comet assay. **Drosophila Inf Serv** 86:149–151, 2003.
- SINGH, M.P.; RAM, K.R.; MISHRA, M.; SHRIVASTAVA, M.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. **Chemosphere**. 79(5), 577-87, 2010.
- SINGH, M.P.; MISHRA, M.; SHARMA, A.; SHUKLA, A.K; MUDIAM, M.K.; PATEL, D.K.; RAM, K.R.; CHOWDHURI, D.K. Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. **Toxicol Appl Pharmacol**. 253, 14-30, 2011.
- SIRIACO,G.M., CENCI,G., HAODIA,A., CHAMPION,L.E., ZHOU,C., GATTI,M.ANDMASON,J.M. Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. **Genetics**, 160, 235—245, 2002.
- SLONIMSKI, P.P.; PERRODIN, G.; GROFTH, J.H. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal “petites”. **Biochem Biophys Res Comm**, 30, 232-239, 1968.
- SONG J, TANOUYE MA. From bench to drug: human seizure modeling using *Drosophila*. **ProgNeurobiol**. 84(2):182-91. Review, 2008.
- SPITSBERGEN JM, KENT ML. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research— advantages and current limitations. **ToxicolPathol**, 31 Suppl: 62–87, 2003.
- STEGMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.; FORLIN,L.; FOWLER, B.; SANDERS, B.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: proteins and enzymes as indicators of contaminant exposure and effect. **SETAC**, 1990.
- THORNTON, B.J.; ELTHON, T.E.; CERNY, R.L.; SIEGFRIED, B.D. Proteomic analysis of atrazine exposure in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Chemosphere**, vol. 81, pp. 235-41, 2010.
- TIBURI, M.; REGULY, M.L.; SCHWATSMANN, G.; CUNHA, K.S.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**, 519, 141-149. 2002.

- TIWARI, A.K.; PRAGYA, P.; RAVI RAM, K.; CHOWDHURI, D.K. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. **Theriogenology**, 76(2), 2011, 197-216, 2011.
- VACHÉ, C.; CAMARES, O.; DE GRAEVE, F.; DASTUGUE, B.; MEINIEL, A.; VAURY, C.; PELLIER, S.; LEOZ-GARZIANDIA, E.; BAMDAD M. *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. **Environ Toxicol Chem.** 25(2), 572-80, 2006.
- VACQUIER, V.D.; BRACHET, J. Chromosomal abnormalities resulting from ethidium bromide treatment. **Nature**, vol. 222, pp. 193-195, 1969.
- VIJVERBERG, H.P.M., VAN DER ZALM, J.M., VAN DEN BERCKEN, J. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. **Nature** 295, 601-603, 1982.
- WANG, J.; LI, Y.; LIU, Y.; ZHANG, H.; DAI, J. Disturbance of perfluorooctanoic acid on development and behavior in *Drosophila* larvae. **Environ Toxicol Chem.**, V.29(9), p. 2117-22, 2010.
- WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, 18, 1090-1094, 1995.
- WEN, H.Y., PENG, R.Z., CHEN, X.W.. Application of rare earth compounds fertilizer in some crops in central Yunnan. **Chin. Rare Earths** 21, 50-54, 2000.
- WILSON DM, SOFINOWSKI TM, MCNEILL DR. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. **Front Biosci** 8:d963-d981, 2003.
- XU, X.K. Application of the rare-earth fertilizers for agricultural sustainable development. **Res. Dev. Resour. Environ. Ecol. Network** 8, 23-26, 1997.
- ZHANG, Z.Y., WANG, Y.Q., LI, F.L., ET AL.. Distribution characteristics of rare earth elements in plants from a rare earth ore area. **J. Radioanal. Nucl. Chem.** 252, 461-465, 2002.
- ZLOTKIN, E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. **Annu. Rev. Entomol.** 44, 429-55, 1999.

Manuscrito II:

“Evaluation of Ethidium Bromide effects in longevity and daily productivity of Drosophila melanogaster (DIPTERA – DROSOPHILIDAE)”

Capítulo III

Manuscrito II:

“Evaluation of Ethidium Bromide effects in biological characteristics, morphology, longevity and daily productivity of *Drosophila melanogaster* (DIPTERA – DROSOPHILIDAE)”

OUCHI, R.Y.¹; CERON, C.R.¹; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O.¹ *

¹ Departamento de química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto SP, Brazil

(*) correspondence author: Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, Depto. de Química e Ciências Ambientais, IBILCE-UNESP, Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP Brazil 15054-000. E-mail bonilla@ibilce.unesp.br, Tel (+5517) 32212361, Fax 32212356.

ABSTRACT

Each year thousands of new products get into the market and do not have a proper hazard classification. For those chemicals that display toxic effects on living beings, can be established mandatory rules demanding specific treatment before being disposed in the environment, or segregation. Ethidium bromide (EB) is an intercalating dye of nucleic acids as RNA and DNA, commonly used by molecular biology laboratories. Many works have been done to investigate their mutagenic capabilities, using yeast, *Drosophila melanogaster*, sea-urchin, *C. elegans* and mice, for example. So, in this work we intended to verify the possible effects of EB evaluated by the daily productivity of six generations (1st, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th), longevity and morphological effects that could be evident for exposed specimens of *D. melanogaster*. The daily productivity revealed that the females and males had their emergency affected by the products when comparing EB and EMS to negative control. Moreover, in the treated groups the frequency of morphological alterations was higher, and absent for the control group. The treated groups showed a decrease of longevity when exposed to EB and EMS. All of these parameters suggest that EB is a toxic chemical, so should have a specific treatment before discarded in environment.

Key Words: *Drosophila melanogaster*, Ethidium bromide, Ehtylmethanesulphonate, longevity, daily productivity, morphological alterations, biomonitoring.

INTRODUCTION

Nowadays there are great concerns about chemicals, laboratory residues and their impact in the environment. Although many of those compounds are recognized as toxic, a significant proportion does not have a proper hazard classification. Considering that many of these compounds should receive a specific treatment or destination before being disposed in the environment, biomonitoring is essential for identification of products that present risks to life and to prevent the degradation of the biosphere.

For that purpose *Drosophila* has become a model organism for biomonitoring genetic damages caused by chemical agents in recent years. During the last 10 years, experiments using *Drosophila* were carried out with genotoxic agents, aiming to identify carcinogens, using this species also as a model for studying the mechanisms of mutagenicity induced by chemical products (VOGEL et al., 1999).

Species of *Drosophila* are model organisms for toxicological studies since they have been well defined genetically, fully characterized in terms of biological development, and their genome has been manipulated easily (MUKHPADHYAY et al., 2004). They also possess high sensibility to detect the presence of toxic substances. Other factors that are taken into account is that they are insects of easy culture and maintenance (they feed mainly of bacteria and yeasts that participate in the fermentation of substrata rich in carbohydrates, such as fruits in decomposition) in laboratory conditions, presenting advantages when compared to other organisms, such as *C. elegans*, *Zebra fish*, used for biomonitoring (ALMEIDA et al., 2001).

Ethidium bromide (EB) or 3,8-diamino-5ethyl-6-phenylphenantridinium bromide is a common laboratory dye for staining double-stranded DNA and RNA (SAMBROOK et al., 1989). Early experiments on effects of EB showed that Sea urchin

eggs exposed to water containing 50 μM of EB develop chromosomal abnormalities and fail to divide normally (VACQUIER and BRACHET, 1969). Besides of these early observations, experiments reported by Nass (1972) indicated that 0.3 to 13 μM of EB inhibit the growth of both mouse fibroblasts and hamster kidney cells. It was also observed that mitochondrial but not nuclear DNA synthesis was also inhibited by EB. Peña et al. (1977) showed that EB accumulated in isolated rat mitochondria and interferes with metabolic activities related to respiration.

With reference to the mutagenic capacity of EB, the results in bacteria show that it is an effective frameshift mutagen if it is metabolically activated by liver microsomes (McCANN et al., 1975), so in fact at least some of several metabolites produced *in vivo* from EB (TETTEY et al., 1999) would be responsible in fact by mutagenicity, instead of EB itself. Results from Fonseca (2006), using the Ames Test (AMES et al., 1973) confirm that information. In *Saccharomyces cerevisiae* EB acts as a strong inducer of *petite* mutants (SLONIMSKI et al., 1968). Its action is based on the inhibition of mitochondrial nucleic acid and protein synthesis and probably is due to specific intercalations between base pairs of mitochondrial DNA (PERLMAN and MAHLER, 1971).

In mice, EB apparently has little or no access to nuclear DNA, at least *in vivo*, while it intercalates perfectly well with isolated nuclear DNA *in vitro* (PACK and LOEW, 1978). This difference could be ascribed to its metabolism; it could be transformed by detoxification enzymes and transformed to by-products.

EB has been reported to possess a significant anti-cancer effect (NISHIWAKI et al., 1974). However, its potential applications in human healthcare have been prevented as a consequence of its mutagenic activities in model organisms. Authors pointed out that in mice EB acts as an inhibitor of RNA-dependent DNA polymerase activity, and

for this reason it can be considered as an anti-tumor agent. Furthermore, Heinen (1978) showed that EB inhibits cell growth in tissue culture, even at very low concentrations; but in spite of this, EB is not used as an anti-tumor agent. The intercalating properties that are advantageous for biological techniques, would be harmful in contact with living organisms because this chemical could cause mutations.

Previous works (OUCHI et al., 2007; 2011) showed that EB could influence the electrophoretic patterns of total proteins and esterase-6 as well as behavior and developmental phases of *D. melanogaster*. Moreover, the daily productivity of an isofemale line was influenced by exposition, including morphological alterations too. In the present study we have investigated the influence of different concentrations of EB on daily productivity of a massal line and morphological alterations along 25 generations. It was also studied the longevity of this massal line of *Drosophila melanogaster* exposed to different concentrations of EB.

MATERIALS AND METHODS

***Drosophila* Stock**

Specimens of *Drosophila melanogaster* were collected at São José do Rio Preto (State of São Paulo, Brazil) and used to create a massal strain originated from six females, in order to ensure genetic variability. The stock was maintained in a temperature-controlled chamber at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, photo phase of 12 hours, in our Institute.

Exposure to Ethidium Bromide (EB) and Ethyl methanesulfonate (EMS)

We used three different concentrations of EB (*Sigma-Aldrich*): 1, 5 and $30\mu\text{M}$, EMS (*Acros Organics*), a well-known mutagenic chemical was used as a positive control at $1\mu\text{M}$ concentration. A negative control was carried with flies fed exclusively

with normal culture medium. The chemicals products was previously mixed with warm (45°C) 50 mL of banana-agar medium in a becker, and then poured into 250 mL glass bottles. Five replicates were prepared for EB treatments as well as for positive and negative controls.

Daily Productivity along 25 Generations

Twelve *D. melanogaster* virgins' males and the same number of virgins' females were placed in bottles containing the medium for feeding ad ovipositing for six days. After that, the flies were removed from bottle and discarded. Ten days after the experiment started, the new generation initiated its emergence (F1). In the fifth day of emergence, twelve virgins males and females were separated and transferred to a new glass bottle, maintaining the same conditions, in order to originate a new generation. The productivity of EB treated and controls was estimated by daily counting of males and females emerged during fifteen days in the 1st, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th generations) for five replicates.

Morphological Alterations

Besides to estimate productivity of emerged flies in 1st, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th generations were morphologically analyzed with a stereoscopic microscopy (*Carl Zeiss*) in order to identify morphological alterations in pattern of color, tergites, wings and normal pattern of body structures. The insects that displayed malformations were counted and then kept frozen at -86°C for later analysis. The proportion of flies carrying morphological alterations was calculated as the ratio altered/ total number of flies emerged on each treatment, for five replicated.

Statistical tools were used to analyze daily emergences and the proportion of emerged insects with morphological alterations, using the free software BioEstat 5.0

(AYRES et al., 2005). For this propose, we applied the Test of equality of two proportions (Normal Approach Z) for independent samples, used for parametric data (MOORE, 2005), with a significance level of $p \leq 0.05$.

Longevity

This experiment was conducted in 250mL bottles containing 50 mL of banana-agar medium. Flies were maintained in EB and EMS at the same conditions utilized for productivity experiments with five replicates for each treatment. Longevity was estimated for males, females and couples. Twenty virgin flies were put into the glass bottles and in intervals of seven days were transferred to new bottles at the same experimental conditions. The dead flies that remained in the “old culture medium” were counted. The number of flies that survived was estimated by the difference between the number of dead flies observed in the “old culture medium” bottle, and those that remain alive.

Longevity was analyzed using a non-parametric statistical test was applied for analysis of variance, the Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$, between negative control and exposed groups). When differences were pointed out by the test, we applied the Student Newman-Kwels test, with $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Longevity

Table 1 displays the mean longevity of males, females and couples from five replicates analyzed in a period of 13 weeks. Total mortality observed in each week can be found in table 1 of appends. From these data we were able to calculate the survival

proportion of each week (figure 1), and subsequently the relative frequency (Fri), mean longevity (XiFri) and variance displayed in table 1 from appends.

Table 1: Longevity average of males, females and couple from the different groups of *D. melanogaster*: control, exposed to ethidium bromide (EB) or ethyl methanesulphonate (EMS). Each group had five replicates.

Treatment	Sex	n	longevity average (weeks)	SE	Variance	SD
Control	Male	100	7.86	0.38	15.00	3.87
	Female	100	5.17	0.31	9.06	3.14
	Couple	100	7.40	0.32	10.34	3.21
1 μ M EB	Male	100	6.96	0.40	16.14	4.01
	Female	100	4.27	0.21	4.56	2.13
	Couple	100	4.09	0.19	3.50	1.87
5 μ M EB	Male	100	7.13	0.40	16.34	4.04
	Female	100	5.19	0.24	5.95	2.44
	Couple	100	4.72	0.26	6.82	2.61
30 μ M EB	Male	100	5.07	0.34	11.49	3.39
	Female	100	7.41	0.31	9.76	3.12
	Couple	100	4.03	0.17	3.05	1.75
1 μ M EMS	Male	100	3.74	0.15	2.37	1.54
	Female	100	4.80	0.24	5.58	2.36
	Couple	100	6.33	0.29	8.78	2.96

It is possible to verify in table 1 that the male control group showed the average longevity of approximately 8 weeks, while for the exposed groups it was shorter: for the groups of 1 and 5 μ M of EB were 7 weeks, for 30 μ M of EB were 5 weeks and for 1 μ M of EMS the mean value was about 4 weeks. In summary, for EB exposed male groups the mean longevity was shorter than for the control group presenting a mean longevity dose-dependent pattern. Moreover, the average longevity of 30 μ M EB (5 weeks) is more similar to the positive control group (EMS) than for the negative control group. It is well known that *D. melanogaster* males presented a shorter longevity due to costs associated with excessive courtship and mating displays (Cordts ; Partridge, 1996; Costa, 2010). Ouchi et al. (2011) verified that for 30 μ M of EB the time of copulation were significant increased as compared to control group and the same observation was verified with 1 μ M of EMS. In summary, these experiments showed that for males, EB treatments affected longevity.

On the other side, for the female group (table 1) the pattern of average longevity in exposed groups was reasonably different as compared to males. For the control group, the mean longevity was approximately 5 weeks, as well as for 5 μ M EB and EMS, while for 1 μ M EB was 4 weeks. Remarkably, for 30 μ M EB showed a longer longevity (7 weeks).

Although not significant by Kruskal-Wallis test, females exposed to 30 μ M EB showed an increase of longevity when compared to others treatments and control. There are no citation in literature that corroborates this date. Rose et al. (1992) observed that the selection for stress resistance occurred when the individuals were exposed to dietary restriction and desiccation. In their experiments, *D. melanogaster* females also showed increased longevity.

Analyzing this figure, it can be observed that the longevity patterns of survival proportion are similar comparing negative control and exposed groups, all of them displaying a decrease in survival pattern during 13 weeks. For males, it seems that 30 μM of EB and 1 μM of EMS groups presented a more pronounced decrease in longevity curves as compared to negative control. The same is true for couples at least for 30 μM of EB. In this case, 1 and 5 μM of EB also presented a decreasing in longevity in relation to control. In females, with exception of 30 μM of EB, longevity patterns are similar to males and couples (figure 1B).

Despite the patterns of longevity curves have suggested a difference between treated groups and negative control, as mentioned above, Kruskal- Wallis statistical test demonstrated for male differences only in 2nd week for 1 μM of EB and in 3rd weeks for 1 μM of EMS. For females differences in longevity pattern was found only in the 10th week for all treatments. For couples no statistical differences were found.

Effect of EB on lifetime of other model organisms was already related in literature. When *Caenorhabditis elegans* was exposed to EB during the development of the larval phase, an increase of lifetime was observed. A decrease in lifetime was verified after the beginning of the adult stage (OLGUN and AKMAN, 2007).

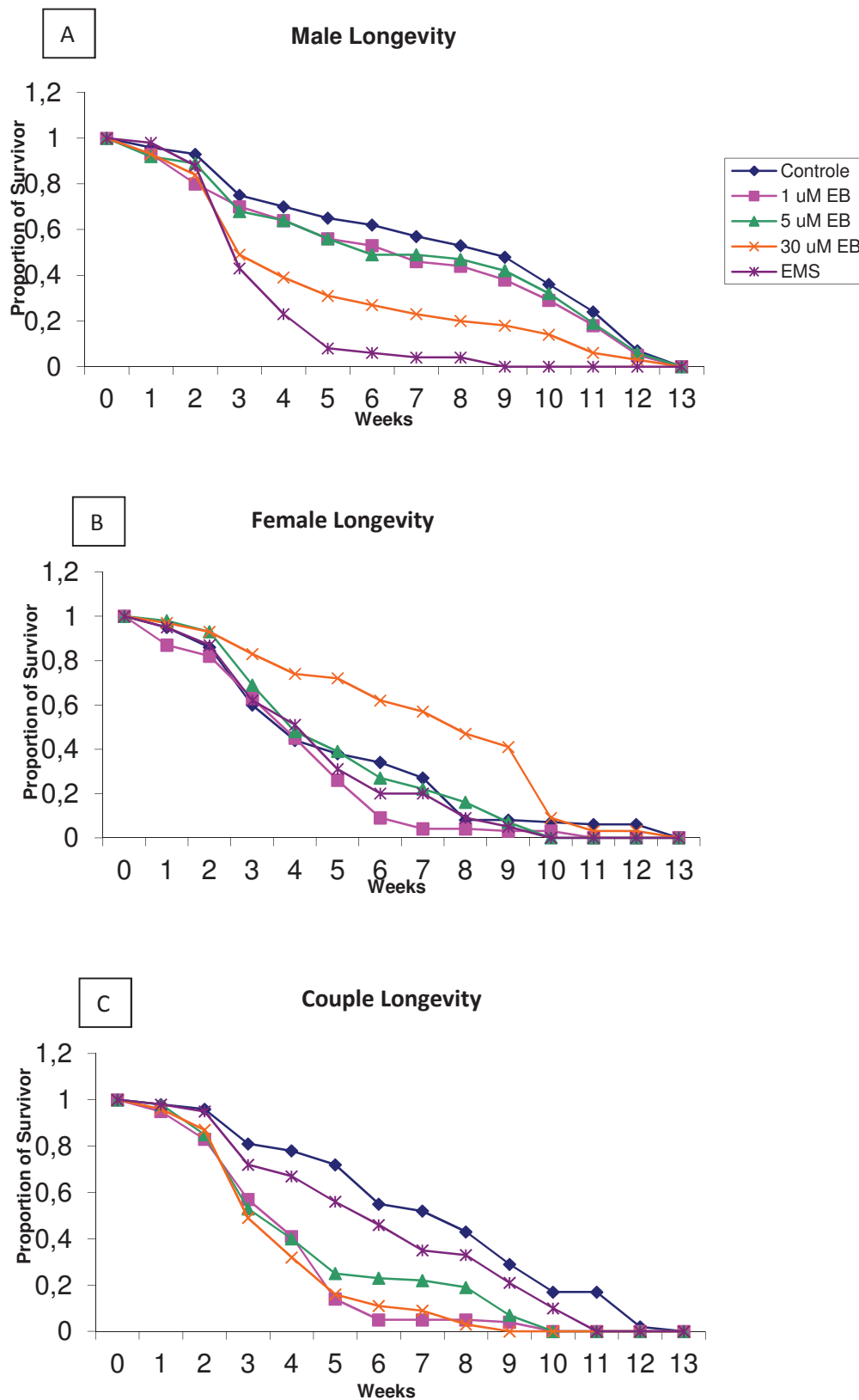
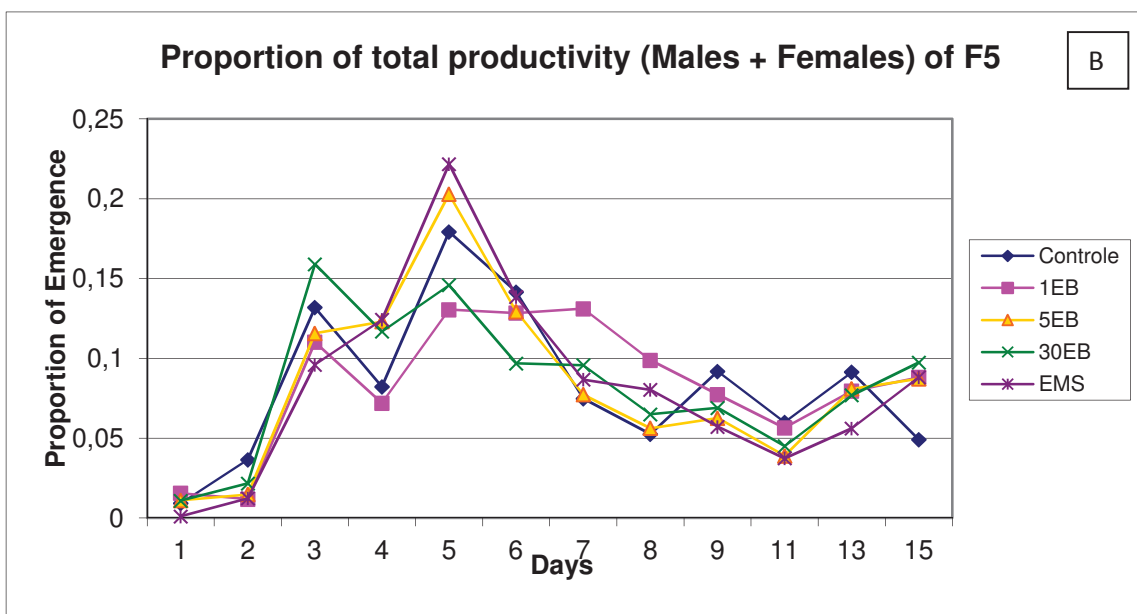
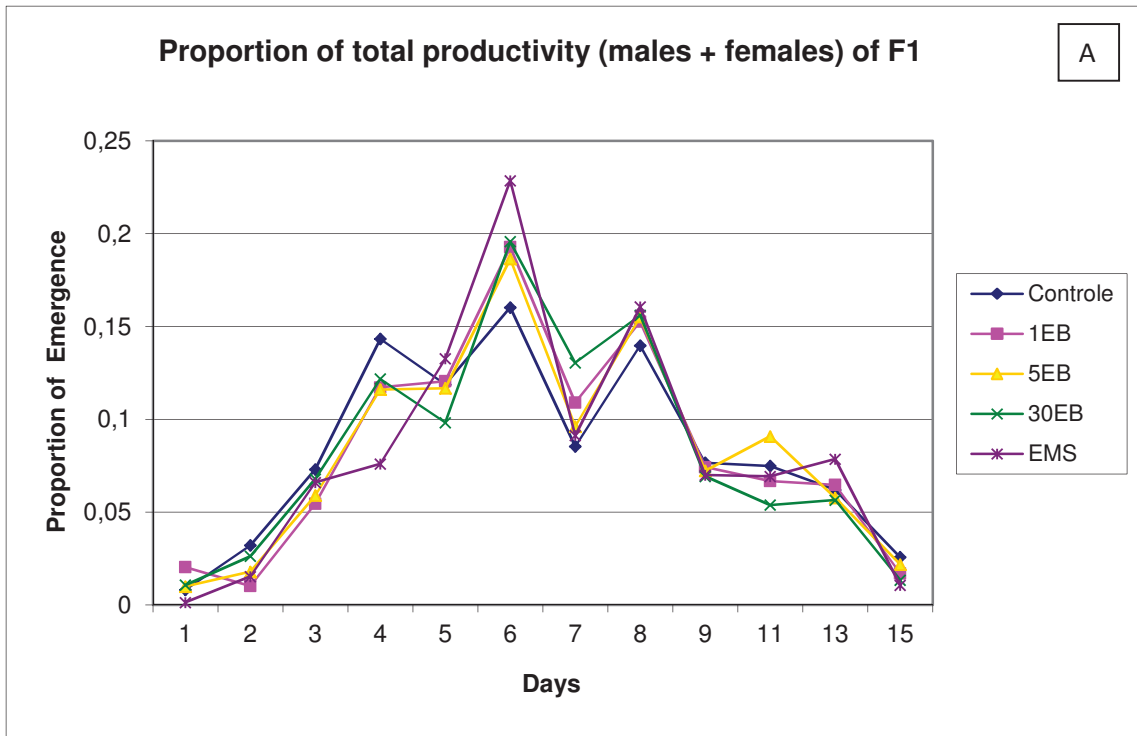


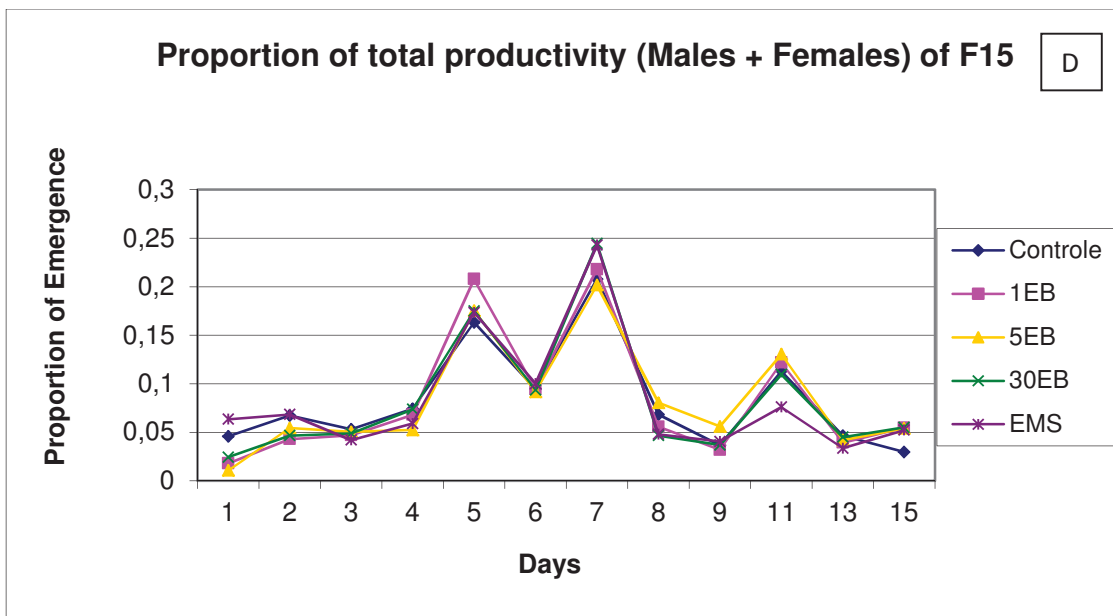
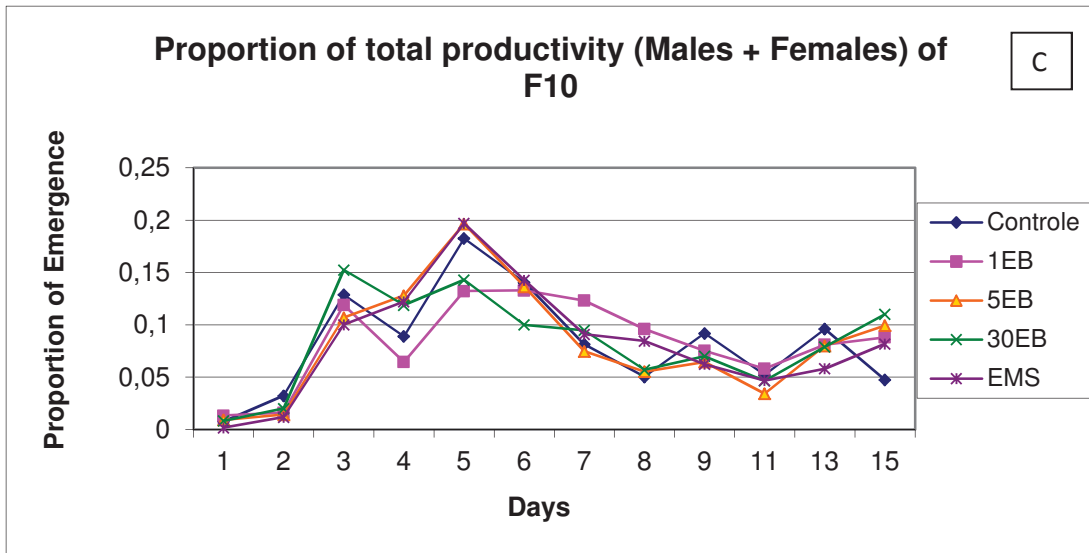
Figure 1: Survival profiles of males (A), females (B) and couple (C) of *D. melanogaster* submitted to control (◆) and exposed to EB at concentrations of 1uM EB (■), 5uM (▲) and 30uM (×) and 1uM of EMS (✱)

Other chemicals could interfere in *Drosophila melanogaster* longevity, such as vinasse (a residual substance left after sugarcane alcohol distillation, represents a major environmental problem for the ethanol industry), that could show genotoxic activity in both fecundity, as well as insect longevity. Yesilada (1999) observed that the toxic effect occurs in both male and female, and an increase of vinasse concentration, causes a survival decrease.

It was observed with respect to EMS that this compound affected the longevity of males and females in a similar manner that the effect of EB on males (figure 1 A and B). Our results with couples (figure 1C) showed that all EB concentrations tested presented a higher effect on longevity than EMS. Yang et al. (2001) verified longevity among nine quantitative characters of EMS in *Drosophila melanogaster*. They observed that longevity for males exposed to EMS was smaller than for the control group, as well as fecundity and viability. Many studies in *Drosophila* suggest that resistance and longevity are genetically and physiologically linked. Selection experiments revealed a positive association between various stress-resistance traits and lifespan (NORRY and LOESCHCKE, 2003).

Daily Productivity





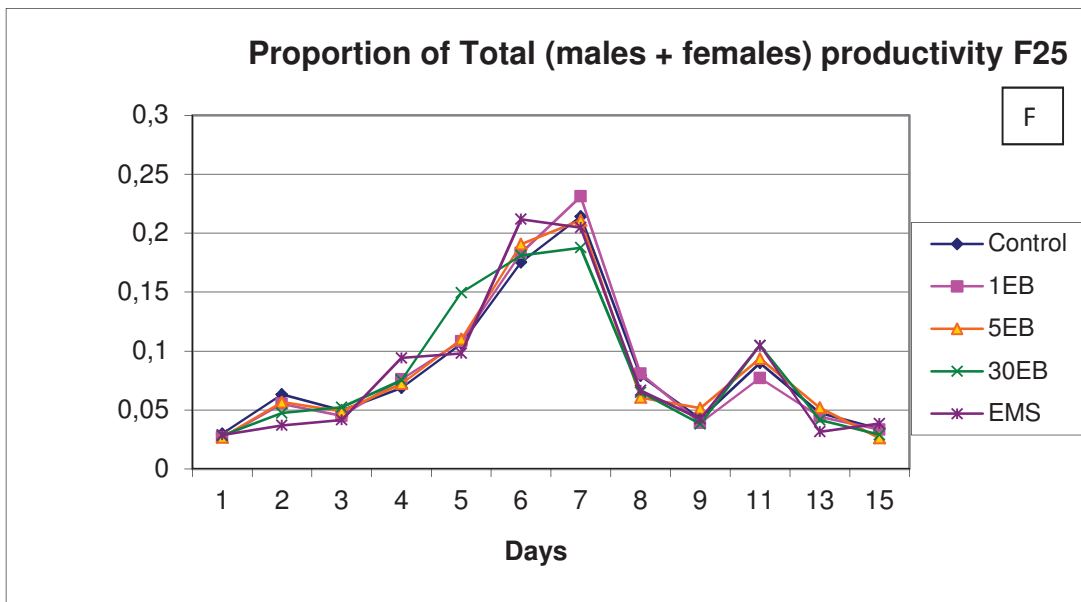
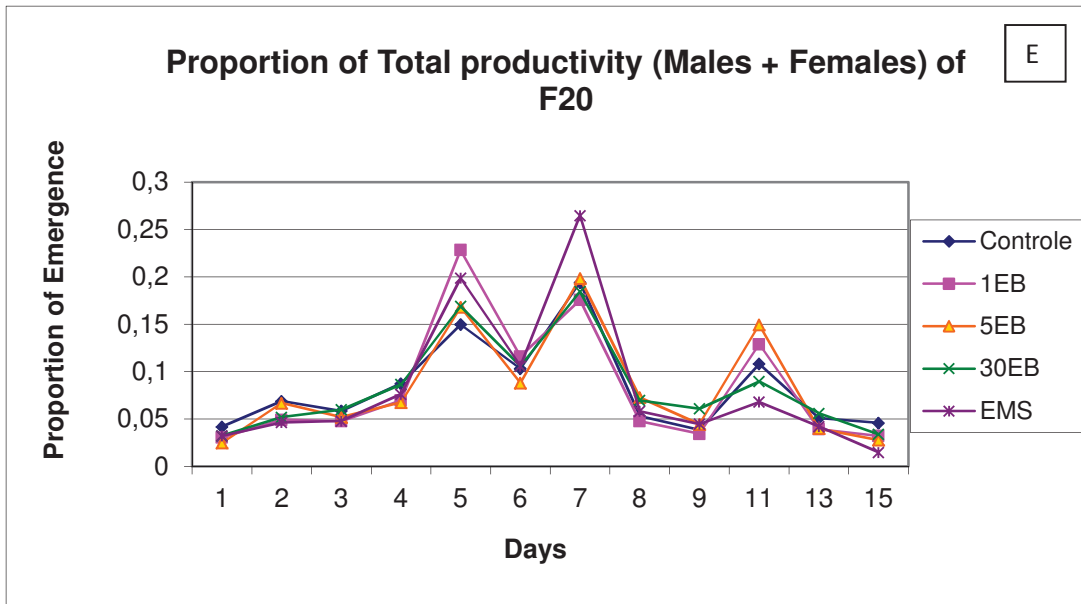


Figure 2: Emergence profiles of F1 (1st generation - A), F5 (5th generation - B), F10 (10th generation - C), F15 (15th generation - D), F20 (20th generation - E) and F25 (25th generation - F) during 15 days analyzed. Control (◆) and exposed to EB at concentrations of 1uM EB (■), 5uM (▲) and 30uM (×) and 1uM of EMS (*).

When it is compared the emergence profile of the males and females between the control group and the treated groups it could be observed that they are very similar, in F1, F5, F10, F15, F20 and F25, as shown by figure 2: A, B, C, D, E and F. However, the number of flies that have emerged in treated groups were statistically significant when compared to the control group, even for the smallest EB concentration (1 μ M). The concentration of 1 μ M of EB is used for visualization of nucleic acids after electrophoresis, a solution that is frequently disposed in the drain without chemical neutralization. In this work, we utilized EMS at the same concentration as a positive control. Treatment with EB influenced in daily emergency of males and females when it is compared to control, as shown in tables 2 and 3 (table 2 from supplemental material: the daily productivity of males and females of 1st, 5th and 10th; table 3 from supplemental material: males and females of 15th, 20th, 25th and in table 4 from supplement material: couples: males + females of each generation).

In table 2 are presented the comparative proportion of total males and females of control and EB and EMS groups.

Table 2: Proportion of total males and females of control and exposed to EB and EMS groups. The asterisks (*) corresponds the gender that presented difference compared to control group.

Generations	Treatment											
	Control		1uM of EB		5uM of EB		30 uM of EB		EMS			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F		
1st	0.490643	0.509357	0.51089918	0.489101	0.500663	0.499337	0.505716	0.494284	0.512325	0.487675		
5th	0.530023	0.469977	0.48040794*	0.519592*	0.509196*	0.490804	0.495726*	0.504274*	0.521932	0.478068		
10th	0.535129	0.464871	0.48458626*	0.515414*	0.494857*	0.505143*	0.494408*	0.505592*	0.470398	0.52962*		
15th	0.508339	0.491661	0.49551048	0.50449	0.508475	0.491525	0.518173*	0.481827*	0.497507	0.502493		
20th	0.500182	0.499818	0.4677762*	0.532224*	0.51945	0.48055	0.442228*	0.557772*	0.478107	0.521893		
25th	0.496877	0.503123	0.49472574	0.505274	0.486388	0.513612	0.497552	0.502448	0.482289	0.517711		

Based on the data of table 2, is possible to verify that in the first (1st) and in the last generation analyzed (25th) there was no difference between control and treated groups, including 1 μM of EMS. In the 5th generation, differences in proportion of males was analyzed when the flies were exposed to 1, 5 and 30 μM of EB and for females the difference were in 1 and 30 μM of EB, when compared to control. No difference was observed in relation to EMS. In the 10th generation, differences were verified to males and females exposed to all concentrations of EB analyzed (1, 5 and 30 μM of EB) and for EMS the difference was only for female group. For the 15th generation, differences were observed only for males and females exposed to 30 μM of EB and for 20th generation, males and females presented differences in proportion of emergency when exposed to 1 and 30 μM of EB.

In table 2, it is also possible to verify that for the most EB groups when there are statistical differences between the control and treated groups, the proportion of females to males (ratio 1:1) is not followed. These data suggest that is a pronounced effect of EB in males pre emergence stages, indicating that *D. melanogaster* males could be more sensitive to EB effects than females.

Fleming et al. (1981) reported a similar effect but at a higher concentration of EB (0.2 mM), that increased the developmental time of *Drosophila melanogaster* by 32%. The authors suggested that the oxygen consumption was lower for flies treated with EB during their development or during their adult life.

Analyzing the couple longevity (figure 1C) and daily productivity of the treated EB groups, one could be observe that exist a correlation between a decrease of longevity and a decrease of productivity, observed only in the first generation. One possible reason for that is the fact that EB, even in low concentrations, causes damages

in mitochondrial DNA (mtDNA), leading to reductions of the activity of respiratory complexes III and IV measured in exposed *Drosophila* cells (MOREL et al., 1999). In this case, flies had a smaller productivity due the fact that their lifespan is shorter. These data also suggest that on the following generations flies became metabolically adapted to EB effects.

Morphological Alterations

Figure 3 shows the results of the analysis of the proportions of total morphological alterations that have been found in each generation. Most of the deformities affected tergites and wings, but we also verified other defects, mainly in the ovipositor.

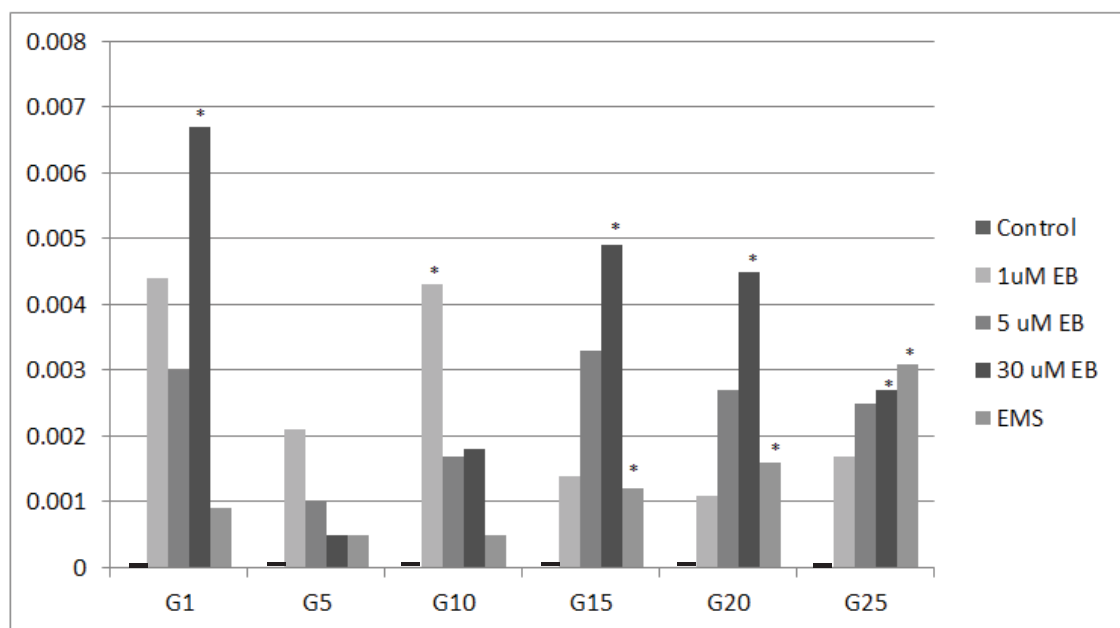


Figure 3: Proportion of morphological alterations caused by EB and EMS treatments in the six generation analyzed (G1 to G25). (*) $p \leq 0.05$. Negative Control (■) and EB treatments with 1uM (■), 5uM (■) and 30uM (■) and 1uM of EMS (■).

For the negative control group no morphological alterations were found. The treatments that showed the highest score of significant differences were 30 μ M EB and 1 μ M EMS.

We found that there was an increase number of morphological alteration in all exposed generation compared to negative control. Amongst the morphological alterations, the most frequently observed affected the body size, pattern of wings, colorations, tergites and an abnormal development of cells around the ovipositor. A decrease in body size has been found in some selected strains (BUCK et al., 2000). Goncharova et al. (1988) verified that individual sensibility was evident when they analyzed lethal recessive mutations in germinate cells in *Drosophila melanogaster* exposed to EMS.

All of the observations (longevity, productivity, and morphological analysis) in this work could be the result of EB action. EB is an intercalating inhibitor of topoisomerase II (topo II), an ubiquitous enzyme that regulates DNA topological interconversion during replication, transcription and genetic recombination decreasing torsional stress in DNA by introducing transient protein-bridged DNA breaks in both DNA strands. Through this function, topo II plays an essential role in the maintenance of genetic material integrity (Mo and Beck, 1999; Godard et al., 2002). Several topo II inhibitors, such as doxorubicin, etoposide and ellipticine have been extensively used as chemotherapeutic agents in anti-cancer treatments. Rather than inhibiting the catalytic activity of the topo II enzyme, they act by increasing levels of topo II mediated DNA cleavage. This mechanism alters this essential enzyme into a potent cellular toxin, inducing apoptosis, cell cycle arrest and genotoxicity (ATTIA et al., 2002). In fact,

long-term adverse effects of this class of chemotherapeutic items, such as infertility and increased incidence of secondary malignancies, have been shown (TIBURI et al., 2002).

EB inhibits mtDNA replication specifically at lower doses in the range 0.1-2 μ M. It is effective at a concentration as low as 20ng/mL, but at the same time it has negligible effect on nuclear DNA under these circumstances (TSANG and LEMIRE, 2002; KING, 1996).

EB induces L3 larval arrest in roundworm *Caenorhabditis elegans* (TSANG et al., 2001). So, lifespan would increase if mtDNA replication is inhibited by EB during larval development. As we discussed for *D. melanogaster*, EB treatment initiated just after the beginning of the adult stage decreases lifespan. In the presence of EB, mtDNA was lost during the larval development stage where DNA replication and cell division occur at high levels, increasing lifespan. The opposite effect is observed, a shortening lifespan during the adult stage where all somatic cells are post-mitotic (OLGUN and AKMAN, 2007).

Ouchi et al. 2007 verified the total productivity of a single exposure to EB and its effects in total protein and in β -esterase enzyme. The exposed groups show a smaller expression of β -esterase enzyme that participate to the female reproductive process, as reported in a previous research.

Some organisms such as *Staphylococcus aureus* have shown an increasing resistance to environmental changes, displaying resistance in a continuous and extended exposure to increasing concentrations of EB. The larger increase in resistance to EB could be explained to the fact that this organism extrudes EB (efflux mediated response to EB) (COUTO et al., 2008).

In summary, the present work presents evidences supporting that EB is able to alter several biological parameters in exposed *D. melanogaster*, so that we can infer

that this chemical is able to exert toxicity. Presently we don't know whether these results can be extrapolated to humans, but certainly the people involved in research projects in the field of Molecular Biology who are exposed chronically to EB should follow the safety rules, even knowing that the ratio EB concentration/body weight is drastically different for humans compared to the flies.

EB residues from Molecular Biology experiments are in many cases discarded in drains, and some neutralization protocols available and widely used, like those that use sodium hypochlorite or potassium permanganate, in fact generate new mutagens (FONSECA, 2006). New alternatives are presently offered by the market and are being postulated as safe chemicals, at least from the point of view of mutagenicity, but for those who continue to use EB, caution would be a good advice.

REFERENCES:

ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. *Drosophila melanogaster meigen*: 3. sensibilidade ao Carbofuran e Biomonitoramento de seus Resíduos em Repolho. *Quim. Nova*, vol. 24, nº6, pp.768-772, 2001.

AMES, B. E.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 70, pp. 2281-2285, 1973.

ATTIA, S.M.; SCHMID, T.E.; BADARY, A.O.; HAMADA, F.M.; ADLER, I.D. Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. *Mutat Res*, vol. 520, pp. 1-13, 2002.

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEst 4.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Editora: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT/ Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2005.

BUCK,S.; VETTRAINO, J., FORCE, A.G.; ARKING, R. Extended longevity in *Drosophila melanogaster* is consistently associated with a decrease in developmental viability. *J. Gerontol.*, vol. 55, pp. B292-B301, 2000.

Cordts, R.; Partridge, L. Courtship reduces longevity of male *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, v. 52 (2), p. 269 – 178, 1996.

COUTO, I.; COSTA, S.S.; VIVEIRO, M.; MARTINS, M.; AMARAL, L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 62, pp. 504-513, 2008.

FLEMING, J. E.; LEON, HA; MIQUEL, J. Effects of ethidium bromide on development and aging of *Drosophila*: Implications for the free radical theory of aging *Exp Gerontol.* , v. 16(3), p. 287-93, 1981.

FONSECA, J.C.L. Avaliação de métodos para tratamento de resíduos químicos originados em laboratórios biológicos. PhD Thesis, UNESP (State University of São Paulo), 136 pp., Araraquara, Brazil.

GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by alkaline comet assay. *Cytol*, vol. 62, pp. 39-45, 2002.

GONCHAROVA, R.I.; LEVINA, A.B.; KUZHIR, T.D. Sensitivity of individual *Drosophila* to the mutagenic action of ethyl methanesulfonate. *Genetika*, vol. 24, pp. 2141-2148, 1999.

HEINEN E. Effects of antimetabolic agents either free or bound to DNA on mouse peritoneal macrophages cultivated in vitro. *Virchows Arch B Cell Pathol* vol. 27, pp. 79-87, 1978.

KING, M.P. Use of Ethidium Bromide to manipulate ratio of mutated and wild type mitochondrial DNA in cultured cells. *Methods Enzymol.*, vol. 264, pp. 339-344, 1996.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 72, pp.5135-9, 1975.

MO, Y.Y.; BECK, W.T. Association of human DNA topoisomerase II alpha with mitotic chromosomes in mammalian cells is independent of its catalytic activity. *Exp Cell Res.* Vol. 252(1), pp. 50-62, 1999.

MOREL, F.; DEBISE, R.; RENOUX, M.; TOURAILLE, S.; RAGNO, M.; ALZIARI, S. Biochemical and molecular consequences of ethidium bromide treatment on *Drosophila* cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 29, pp. 835-843, 1999.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, vol. 19, n°2, pp.85-90, 2004.

NASS, M.M.K. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, vol. 72, pp. 522, 1972.

NISHIWAKI, H.; MIURA, M.; IMAI, K.; OHMO, R.; KASWASHUMA, K.; EZAKI, K.; UCEDA, R.; YOSHIKAWA, H.; NAGATA, K.; TAKEYAMA, H.; YAMADA, K. *Cancer Research*, v.34, p. 2699, 1974.

NORRY, F. M.; LOESCHCHKE, V. Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Exp. Gerontol.*, vol. 39, pp. 673-681, 2003.

OLGUN, A.; AKMAN, S. Mitochondrial DNA-deficient models and aging. *Ann N Y Acad Sci.*, vol. 100, pp. 241-245, 2007.

OUCHI, R.Y.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). *Bull of Environ Contam Toxicol*, v. 78, p. 489-493, 2007.

OUCHI, R.Y.; OKAMOTO, D.N.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of Ethidium Bromide Effects in the Life Cycle and Reproductive Behavior of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 2011.

PACK, G.R.; LOEW, G. Origins of the specificity in the intercalation of ethidium into nucleic acids. A theoretical analysis. *Biochim Biophys Acta*, vol. 519, pp. 163-172, 1978.

PEÑA, A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A.; DE GÓMEZ-PUYOU, M.T. The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem Biophys*, vol. 180, pp. 522, 1977.

PERLMAN, P.S.; MAHLER, H.R. Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis. *Nature New Biol*, vol. 231, pp. 12-16, 1971.

ROSE, M.R.; VU, L.N.; PARK, S.U.; GRAVES, J.L.Jr. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, vol. 27(2). Pp. 241-250, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1989.

SLONISMSKI, P.P.; PERRODIN, G.; GROFTH, J.H. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". *Biochem Biophys Res Comm*, v. 30, pp. 232-239, 1968.

TETTEY, J.N.A.; Skellern, G.G.; Midgley, J.M.; Grant, M.H. Pitt, A.R. The effect of inducing agents on the metabolism of ethidium bromide by isolated rat hepatocytes. *Chem-Biol Interactions* 123, 105–115, 1999.

TIBURI, M.; REGULY, M.L. SCHWATSMANN, G.; CUNHA, K.S.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat res*, vol. 519, pp. 141-149, 2002.

Tsang WY, Lemire BD. Stable heteroplasmy but differential inheritance of a large mitochondrial DNA deletion in nematodes. *Biochem Cell Biol.*, v. 80(5), p. 645-54, 2002.

TSANG, W.Y.; SAYLES, L.C.; SHANDEL, G.S. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acid Res.*, vol. 30, pp.1929-1934, 2001.

VACQUIER, V.D.; BRACHET, J. Chromosomal abnormalities resulting from ethidium bromide treatment. *Nature*, vol. 222, pp. 193-195, 1969.

VOGEL, E.W.; GRAF, U.; FREI, H.J.; NIVARD, M.M. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *Iarc Sci Publ.*, vol.146, pp. 146, 1999.

YESILADA, E. Genotoxic Activity of Vinasse and Its Effect on Fecundity and Longevity of *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 63, pp. 560-566.

Table 2: Total of daily productivity throughout 15 days of 1st, 5th and 10th generations. (*) shows days, that $p \leq 0,05$.

Days	Sex	Generations																	
		1st Generation						5th Generation						10th Generation					
		C	1EB	5EB	30EB	EMS	C	1EB	5EB	30EB	EMS	C	1EB	5EB	30EB	EMS			
1	M	5	12*	4	6	2	8	10	8	8	2*	5	8	3	6	2			
	F	9	18*	11	10	0*	8	19*	13	11	0*	8	17	13	8	1*			
2	M	30	7*	13*	23	10*	36	13*	11*	22	13*	28	15	8*	19	7*			
	F	25	8*	14	16	13	28	11*	17	16	12*	27	15*	17	15	15*			
3	M	62	45	39	52	53	116	102	110	135*	108	110	105	97	127*	88			
	F	63	35*	50	49	46	115	103	110	144*	87*	110	93	90	132*	98			
4	M	119	91	91	88	46*	72	68	133*	95*	103*	80	65	123*	93*	93*			
	F	126	81	84*	93	68*	72	66	101*	110*	149*	72	56	101*	109*	134*			
5	M	108	89	89	61*	108	162	115*	202*	131	262*	160	110*	180*	126	178*			
	F	95	88	87	85	91	152	128	184	125	188	152	138	164	117*	188			
6	M	137	143	142	149	172*	149	116	121	83*	149	145	116	114	86*	132			
	F	137	140*	139	142*	171*	99	123	125	87	132*	95	133*	125*	84	133*			
7	M	68	90*	65	101*	80	62	121*	81	88*	83	70	118*	75	83*	76			
	F	78	70	80	93*	57	69	123*	66	80	93	69	113*	56	78	93			
8	M	116	121	129	128	136*	46	87*	48	65*	72*	40	87*	38	50*	60*			
	F	123	103	105	104	105	46	97*	59	49	91*	46	93*	59	47	97*			
9	M	63	54	57	49	44	91	62	61*	59	67*	87	59	55*	57	67			
	F	68	55	52	54	61	70	82	58	62	49*	70	82	58	62	49*			
11	M	65	46	75	35*	50	54	46	37	42	42	48	50	32	42	42			
	F	63	52	62	45	54	51	59	38	37	34*	41	59	28	37	45			
13	M	42	41	34	48	63*	94	69	68*	55*	67*	98	73	54*	54*	59*			
	F	64	54	53	36*	55	66	79	86	80	47*	66	79	86	80	49*			
15	M	24	11*	17	12	5*	28	86	89	87	91*	43	90	87	97	70*			
	F	20	14	16	8	11	38	78*	77*	84*	88*	38	75*	87*	90*	82*			

Table 3: Total of daily productivity throughout 15 days of 15th, 20th and 25th generations. (*) shows days, that showed $p \leq 0,05$.

		Generations														
Days	Sex	15th Generation				20th Generation				25th Generation						
		C	1 EB	5 EB	30 EB	EMS	C	1 EB	5 EB	30 EB	EMS	C	1 EB	5 EB	30 EB	EMS
1	M	57	23*	11*	31*	86*	58	41	12*	27*	50	41	37	42	39	35
	F	76	31*	22*	45*	131*	57	45	62	59	50	45	39	32	36	39
2	M	101	68*	100	64*	112	95	70	121	57*	49*	89	82	79	69	42
	F	94	71*	67*	81	122	94	69*	78	81	95	93	75	77	57	53
3	M	87	73	78	76	74	96	57*	78*	80	79	75	65	67	72	49
	F	67	68	77	76	70	65	78	77	79	70	68	63	68	67	58
4	M	105	115	85	119	108	125	117	131	118	141	96	110	104	97	112
	F	110	89	76*	110	94*	115	80*	70*	112	96*	102	106	95	103	130
5	M	252	306*	271	285	293	261	325*	251*	279*	302	157	145	156	196	104
	F	221	317*	267*	259	300*	150	320*	250*	170	315*	149	163	147	201	148
6	M	137	143	142	149	172	126	178*	142	149*	172*	227	258	267	236	269
	F	137	140	139	142	171	157	150	120*	132*	157	278	263	258	245	275
7	M	290	312	332	406*	419*	208	147*	305*	126*	402*	315	312	254	235	267
	F	312	341	286	354	411*	325	349	287*	364	420	302	345	327	263	259
8	M	111	72*	125	75*	80*	48	57	102*	116*	94*	112	105	78	98	76
	F	87	95	122	70	84	98	78*	115	69*	87*	116	125	89	75	95
9	M	52	39	89*	67	74	52	39	48	68*	72	65	63	67	47	62
	F	54	57	83	48	65	54	58	85*	94*	67	58	48	75	54	47
11	M	181	204	207	193	139*	185	207	257*	69*	57*	127	105	123	137	133
	F	146	161	193*	148	121*	112	157*	189*	169*	154	132	114	135	141	136
13	M	62	49	61	59	48	62	49	61	59	48	72	67	68	56	45
	F	73	69	52	81	56*	78	62*	58*	90	83	65	59	75	54	36
15	M	28	86	89	87	91*	58	34*	41	27*	19*	56	58	35	39	45
	F	38	78*	77*	84*	88*	68	57	42*	63	27*	42	37	37	38	54

Table 4: Total (male and female) of daily productivity throughout 15 days of 1st, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th generations. (*) shows days that $p \leq 0,05$.

Generations	Treatment	Days														
		1th	2th	3th	4th	5th	6th	7th	8th	9th	11th	13th	15th			
1th	C	14	55	125	245	203	274	146	239	131	128	106	44			
	1 EB	30*	15*	80*	172*	177	283*	160*	224	109	98	95	25			
	5 EB	15	27*	89	175*	176	281*	145	234	109	137	87	33			
	30 EB	16	39	101	181	146	291*	194*	232	103	80*	84	20*			
	1 EMS	2*	23*	99	114*	199	343*	137	241	105	104	118	16*			
5th	C	16	64	231	144	314	248	131	92	161	105	160	296			
	1 EB	29*	22*	205	134	243*	239	244*	184*	144	105	148	174*			
	5 EB	21	28*	220	234*	386*	246	147	107	119	74	154	216*			
	30 EB	19	38*	279*	205*	256	170*	168*	114*	121	79	135	211*			
	1 EMS	2*	25*	195*	252*	450*	281	176*	163*	116*	76*	114*	209*			
10th	C	13	55	220	152	312	240	139	86	157	89	164	301			
	1 EB	25*	30*	223	121	248*	249	231*	180*	141	109	152	165*			
	5 EB	16	25*	187	224*	344*	239	131	97	113*	60*	140	204*			
	30 EB	14	34	259*	202*	243	170*	161*	97	119	79	134	187*			
	1 EMS	3*	22*	186	227*	366*	265	169*	157*	116*	87	108*	190*			
15th	C	133	195	154	215	473	274	602	198	106	327	135	131			
	1 EB	54*	129*	141	204	623*	283	653	167	96	365	118	87*			
	5 EB	33*	167	155	161*	538*	281	618	247*	172*	400*	129	97*			
	30 EB	76*	145*	152	229	544	291	760*	145*	115	341	140	121			
	1 EMS	217	234	144	202	593	343	830	164	139	260	115	88			
20th	C	115	189	161	240	411	283	533	146	106	297	140	126			
	1 EB	86*	139*	135	197*	645*	328	496	135	97	364*	111*	91*			
	5 EB	74*	199	155	201*	501*	262*	592	217*	133	446*	119*	83*			
	30 EB	86	138*	159	230	449*	281	490	185*	162*	238*	149	90*			
	1 EMS	100*	144*	149	237	617*	329	822*	181	139	211*	131	46*			
25th	C	86	182	143	198	306	505	617	228	123	259	137	98			
	1 EB	76	157	128	216	308	521	657	230	111	219	126	95			
	5 EB	74	156	135	199	303	525	581	167	142	258	143	72			
	30 EB	75	126	139	200	397	481	498	173	101	278	110	77			
	1 EMS	74	95	107	242	252	544	526	171	109	269	81	99			

ANEXO:**Table 1:** Mortality date throughout 13 weeks, analysed for male, female and couple, which R1= replicate 1, R2= replicate 2, R3= replicate 3, R4= replicate 4, R5= replicate 5.

GROUPS - Males		Replicates					Total
	Weeks	R1	R2	R3	R4	R5	
Control	0	20	20	20	20	20	100
	1	19	20	19	20	18	96
	2	18	19	18	20	18	93
	3	9	17	15	20	14	75
	4	5	17	15	20	13	70
	5	4	17	12	20	12	65
	6	3	16	11	20	12	62
	7	0	16	11	19	11	57
	8	0	15	9	18	11	53
	9	0	14	7	18	9	48
	10	0	9	4	16	7	36
	11	0	6	0	12	6	24
	12	0	3	0	3	1	7
	13	0	0	0	0	0	0
1 uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	19	20	17	19	18	93
	2	16	16	16	16	16	80
	3	12	16	14	16	12	70
	4	8	16	12	16	12	64
	5	5	16	12	11	12	56
	6	5	16	11	9	12	53
	7	4	16	8	6	12	46
	8	3	16	8	6	11	44
	9	2	14	5	6	11	38
	10	2	9	4	5	9	29
	11	1	5	0	3	9	18
	12	1	1	0	1	2	5
	13	0	0	0	0	0	0

5 uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	18	18	19	19	92
	2	17	18	16	19	19	89
	3	15	18	14	12	9	68
	4	14	18	14	11	7	64
	5	12	17	14	9	4	56
	6	10	17	13	9	0	49
	7	10	17	13	9	0	49
	8	8	17	13	9	0	47
	9	6	16	13	7	0	42
	10	6	13	7	6	0	32
	11	5	11	3	0	0	19
	12	1	4	1	0	0	6
	13	0	0	0	0	0	0
30 uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	17	20	19	19	93
	2	16	14	18	17	19	84
	3	7	4	14	8	16	49
	4	4	1	14	6	14	39
	5	3	0	13	2	13	31
	6	2	0	13	0	12	27
	7	2	0	11	0	10	23
	8	2	0	8	0	10	20
	9	2	0	7	0	9	18
	10	1	0	5	0	8	14
	11	0	0	0	0	6	6
	12	0	0	0	0	3	3
	13	0	0	0	0	0	0
1 uM of EMS	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	17	20	19	19	93
	2	16	14	18	17	19	84
	3	7	4	14	8	16	49
	4	4	1	14	6	14	39
	5	3	0	13	2	13	31
	6	2	0	13	0	12	27
	7	2	0	11	0	10	23
	8	2	0	8	0	10	20
	9	2	0	7	0	9	18
	10	1	0	5	0	8	14
	11	0	0	0	0	6	6
	12	0	0	0	0	3	3
	13	0	0	0	0	0	0

GROUP - Females							
Control	0	20	20	20	20	20	100
	1	19	20	18	18	20	95
	2	18	20	18	15	15	86
	3	15	16	17	7	5	60
	4	15	14	15	0	0	44
	5	12	14	12	0	0	38
	6	12	11	11	0	0	34
	7	9	8	10	0	0	27
	8	0	8	0	0	0	8
	9	0	8	0	0	0	8
	10	0	7	0	0	0	7
	11	0	6	0	0	0	6
	12	0	6	0	0	0	6
	13	0	0	0	0	0	0
1uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	15	16	18	18	20	87
	2	15	15	17	17	18	82
	3	9	12	12	14	16	63
	4	7	8	9	9	12	45
	5	3	4	7	8	4	26
	6	0	0	2	4	3	9
	7	0	0	0	4	0	4
	8	0	0	0	4	0	4
	9	0	0	0	3	0	3
	10	0	0	0	3	0	3
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0
5uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	20	20	20	19	19	98
	2	18	19	19	19	18	93
	3	11	10	18	19	11	69
	4	7	3	16	19	3	48
	5	4	0	16	19	0	39
	6	0	0	11	16	0	27
	7	0	0	7	15	0	22
	8	0	0	6	10	0	16
	9	0	0	0	7	0	7
	10	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0

30uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	19	20	19	19	20	97
	2	18	20	17	19	19	93
	3	18	19	12	15	19	83
	4	18	19	7	12	18	74
	5	18	18	7	12	17	72
	6	17	18	6	10	11	62
	7	17	17	5	9	9	57
	8	16	15	3	5	8	47
	9	14	12	3	4	8	41
	10	5	4	0	0	0	9
	11	1	2	0	0	0	3
	12	1	2	0	0	0	3
	13	0	0	0	0	0	0

EMS	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	20	20	20	20	98
	2	18	20	17	20	20	95
	3	17	19	6	10	20	72
	4	15	18	6	8	20	67
	5	15	18	3	0	20	56
	6	13	16	0	0	17	46
	7	7	14	0	0	14	35
	8	6	14	0	0	13	33
	9	0	10	0	0	11	21
	10	0	9	0	0	1	10
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0

GROUP - Couple

Control	0	20	20	20	20	20	100
	1	20	19	19	20	20	98
	2	19	18	19	20	20	96
	3	19	16	11	17	18	81
	4	19	16	10	15	18	78
	5	16	16	8	14	18	72
	6	15	14	0	8	18	55
	7	13	13	0	8	18	52
	8	11	13	0	7	12	43
	9	7	13	0	0	9	29
	10	4	13	0	0	0	17
	11	4	13	0	0	0	17
	12	1	1	0	0	0	2
	13	0	0	0	0	0	0

1uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	20	17	20	19	19	95
	2	18	14	16	18	17	83
	3	16	8	9	12	12	57
	4	15	7	5	6	8	41
	5	9	0	0	0	5	14
	6	0	0	0	0	5	5
	7	0	0	0	0	5	5
	8	0	0	0	0	5	5
	9	0	0	0	0	4	4
	10	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0
5uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	20	20	18	20	20	98
	2	17	15	16	20	17	85
	3	9	8	8	15	13	53
	4	4	5	7	15	9	40
	5	0	5	0	13	7	25
	6	0	5	0	11	7	23
	7	0	5	0	10	7	22
	8	0	5	0	7	7	19
	9	0	0	0	7	0	7
	10	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0
30uM of Ethidium Bromide	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	18	20	20	20	96
	2	16	18	20	15	18	87
	3	7	12	14	6	10	49
	4	5	6	11	4	6	32
	5	4	0	9	0	3	16
	6	0	0	8	0	3	11
	7	0	0	6	0	3	9
	8	0	0	0	0	3	3
	9	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0

EMS	0	20	20	20	20	20	100
	1	18	20	20	20	20	98
	2	18	20	17	20	20	95
	3	17	19	6	10	20	72
	4	15	18	6	8	20	67
	5	15	18	3	0	20	56
	6	13	16	0	0	17	46
	7	7	14	0	0	14	35
	8	6	14	0	0	13	33
	9	0	10	0	0	11	21
	10	0	9	0	0	1	10
	11	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0

Table 2: Statistical dates for each group (male, female and couple), which Xi: weeks, Fri: relative frequency

		MACHOS				
	Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri	
	0	0	0	0	0	
	1	0.04	0.04	1	0.04	
	2	0.03	0.06	4	0.12	
	3	0.18	0.54	9	1.62	
	4	0.05	0.2	16	0.8	
	5	0.05	0.25	25	1.25	
	6	0.03	0.18	36	1.08	
	7	0.05	0.35	49	2.45	
	8	0.04	0.32	64	2.56	
	9	0.05	0.45	81	4.05	
	10	0.12	1.2	100	12	
	11	0.12	1.32	121	14.52	
	12	0.17	2.04	144	24.48	
	13	0.07	0.91	169	11.83	
	Somatório		7.86		76.8	
$S^2 = 76.8 - (7.86 * 7.86) = 76.8 - 61.8 = 15$						

1uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.07	0.07	1	0.07
2	0.13	0.26	4	0.52
3	0.1	0.3	9	0.9
4	0.06	0.24	16	0.96
5	0.08	0.4	25	2
6	0.03	0.18	36	1.08
7	0.07	0.49	49	3.43
8	0.02	0.16	64	1.28
9	0.06	0.54	81	4.86
10	0.09	0.9	100	9
11	0.11	1.21	121	13.31
12	0.13	1.56	144	18.72
13	0.05	0.65	169	8.45
Somatório		6.96		64.58

$$S^2 = 64.58 - (6.96 * 6.96) = 64.58 - 48.44 = 16.14$$

5uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.08	0.08	1	0.08
2	0.03	0.06	4	0.12
3	0.21	0.63	9	1.89
4	0.04	0.16	16	0.64
5	0.08	0.4	25	2
6	0.07	0.42	36	2.52
7	0	0	49	0
8	0.02	0.16	64	1.28
9	0.05	0.45	81	4.05
10	0.1	1	100	10
11	0.13	1.43	121	15.73
12	0.13	1.56	144	18.72
13	0.06	0.78	169	10.14
Somatório		7.13		67.17

$$S^2 = 67.17 - (7.13 * 7.13) = 67.17 - 50.83 = 16.34$$

30uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.07	0.07	1	0.07
2	0.09	0.18	4	0.36
3	0.35	1.05	9	3.15
4	0.1	0.4	16	1.6
5	0.08	0.4	25	2
6	0.04	0.24	36	1.44
7	0.04	0.28	49	1.96
8	0.03	0.24	64	1.92
9	0.02	0.18	81	1.62
10	0.04	0.4	100	4
11	0.08	0.88	121	9.68
12	0.03	0.36	144	4.32

13	0.03	0.39	169	5.07
Somatório		5.07		37.19
$S^2 = 37.19 - (5.07 * 5.07) = 37.19 - 25.7 = 11.49$				

1uM EMS

Xi	Fri	XiFri	Xi ²	Xi ² Fri
0	0	0	0	0
1	0.02	0.02	1	0.02
2	0.1	0.2	4	0.4
3	0.45	1.35	9	4.05
4	0.2	0.8	16	3.2
5	0.15	0.75	25	3.75
6	0.02	0.12	36	0.72
7	0.02	0.14	49	0.98
8	0	0	64	0
9	0.04	0.36	81	3.24
10	0	0	100	0
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		3.74		16.36
$S^2 = 16.36 - (3.74 * 3.74) = 16.36 - 13.99 = 2.37$				

Controle

FÊMEAS				
Xi	Fri	XiFri	Xi ²	Xi ² Fri
0	0	0	0	0
1	0.05	0.05	1	0.05
2	0.09	0.18	4	0.36
3	0.26	0.78	9	2.34
4	0.16	0.64	16	2.56
5	0.06	0.3	25	1.5
6	0.04	0.24	36	1.44
7	0.07	0.49	49	3.43
8	0.19	1.52	64	12.16
9	0.01	0.09	81	0.81
10	0.01	0.1	100	1
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0.06	0.78	169	10.14
Somatório		5.17		35.79
$S^2 = 35.79 - (5.17 * 5.17) = 35.79 - 26.73 = 9.06$				

1uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.13	0.13	1	0.13
2	0.05	0.1	4	0.2
3	0.19	0.57	9	1.71
4	0.18	0.72	16	2.88
5	0.18	0.9	25	4.5
6	0.18	1.08	36	6.48
7	0.05	0.35	49	2.45
8	0	0	64	0
9	0.01	0.09	81	0.81
10	0	0	100	0
11	0.03	0.33	121	3.63
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		4.27		22.79
$S^2 = 22.79 - (4.27 * 4.27) = 22.79 - 18.23 = 4.56$				

5uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.08	0.08	1	0.08
2	0.03	0.06	4	0.12
3	0.21	0.63	9	1.89
4	0.04	0.16	16	0.64
5	0.08	0.4	25	2
6	0.07	0.42	36	2.52
7	0	0	49	0
8	0.02	0.16	64	1.28
9	0.05	0.45	81	4.05
10	0.1	1	100	10
11	0.13	1.43	121	15.73
12	0.13	1.56	144	18.72
13	0.06	0.78	169	10.14
Somatório		7.13		67.17
$S^2 = 67.17 - (7.13 * 7.13) = 67.17 - 50.83 = 16.34$				

30uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.03	0.03	1	0.03
2	0.04	0.08	4	0.16
3	0.1	0.3	9	0.9
4	0.09	0.36	16	1.44
5	0.02	0.1	25	0.5
6	0.1	0.6	36	3.6
7	0.05	0.35	49	2.45
8	0.1	0.8	64	6.4
9	0.06	0.54	81	4.86
10	0.32	3.2	100	32
11	0.06	0.66	121	7.26

12	0	0	144	0
13	0.03	0.39	169	5.07
Somatório		7.41		64.67
$S^2 = 64.67 - (7.41 * 7.41) = 64.67 - 54.91 = 9.76$				

1uM EMS

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.05	0.05	1	0.05
2	0.08	0.16	4	0.32
3	0.25	0.75	9	2.25
4	0.11	0.44	16	1.76
5	0.2	1	25	5
6	0.11	0.66	36	3.96
7	0	0	49	0
8	0.11	0.88	64	7.04
9	0.04	0.36	81	3.24
10	0.05	0.5	100	5
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		4.8		28.62
$S^2 = 28.62 - (4.8 * 4.8) = 28.62 - 23.04 = 5.58$				

Controle

CASAL				
Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.02	0.02	1	0.02
2	0.02	0.04	4	0.08
3	0.15	0.45	9	1.35
4	0.03	0.12	16	0.48
5	0.06	0.3	25	1.5
6	0.17	1.02	36	6.12
7	0.03	0.21	49	1.47
8	0.09	0.72	64	5.76
9	0.14	1.26	81	11.34
10	0.12	1.2	100	12
11	0	0	121	0
12	0.15	1.8	144	21.6
13	0.02	0.26	169	3.38
Somatório		7.4		65.1
$S^2 = 65.1 - (7.4 * 7.4) = 65.1 - 54.76 = 10.34$				

1uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.05	0.05	1	0.05
2	0.12	0.24	4	0.48
3	0.26	0.78	9	2.34
4	0.16	0.64	16	2.56
5	0.27	1.35	25	6.75
6	0.09	0.54	36	3.24
7	0	0	49	0
8	0	0	64	0
9	0.01	0.09	81	0.81
10	0.04	0.4	100	4
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		4.09		20.23
$S^2 = 20.23 - (4.09 * 4.09) = 20.23 - 16.73 = 3.5$				

5uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.02	0.02	1	0.02
2	0.13	0.26	4	0.52
3	0.32	0.96	9	2.88
4	0.13	0.52	16	2.08
5	0.15	0.75	25	3.75
6	0.02	0.12	36	0.72
7	0.01	0.07	49	0.49
8	0.03	0.24	64	1.92
9	0.12	1.08	81	9.72
10	0.07	0.7	100	7
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		4.72		29.1
$S^2 = 29.1 - (4.72 * 4.72) = 29.1 - 22.28 = 6.82$				

30uM EB

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.04	0.04	1	0.04
2	0.09	0.18	4	0.36
3	0.38	1.14	9	3.42
4	0.17	0.68	16	2.72
5	0.16	0.8	25	4
6	0.05	0.3	36	1.8
7	0.02	0.14	49	0.98
8	0.06	0.48	64	3.84
9	0.03	0.27	81	2.43
10	0	0	100	0
11	0	0	121	0
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		4.03		19.59
$S^2 = 19.59 - (4.03 * 4.03) = 19.59 - 16.24 = 3.05$				

1 uM EMS

Xi	Fri	XiFri	Xi²	Xi²Fri
0	0	0	0	0
1	0.02	0.02	1	0.02
2	0.03	0.06	4	0.12
3	0.23	0.69	9	2.07
4	0.05	0.2	16	0.8
5	0.11	0.55	25	2.75
6	0.1	0.6	36	3.6
7	0.11	0.77	49	5.39
8	0.02	0.16	64	1.28
9	0.12	1.08	81	9.72
10	0.11	1.1	100	11
11	0.1	1.1	121	12.1
12	0	0	144	0
13	0	0	169	0
Somatório		6.33		48.85
$S^2 = 48.85 - (6.33 * 6.33) = 48.85 - 40.07 = 8.78$				

Manuscrito III:

**“Análise Preliminar da Expressão
Gênica da *Hsp70*, *Sod2* e *Est-6* e
atividade de enzimas de
detoxificação, CAT, SOD, GST e
“GR-thioredoxin reductase”, de
Drosophila melanogaster expostas
ao Brometo de etídio”:**

Capítulo IV

Manuscrito III:

“Análise Preliminar da Expressão Gênica da *Hsp70*, *Sod2* e *Est-6* e atividade de enzimas de detoxificação, CAT, SOD, GST e GR, de *Drosophila melanogaster* expostas ao Brometo de etídio.”

OUCHI, R.Y.¹; GRANZOTTO, A.²; MASCHIO, L. R.¹; ALMEIDA, E.A.¹;
CARARETO, C.M.A.²; CERON, C.R.¹; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O.¹ *

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais – IBILCE-UNESP

² Departamento de Biologia – IBILCE - UNESP

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto SP,
Brazil

(*) autor para correspondência: Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, Depto. de Química e Ciências Ambientais, IBILCE-UNESP, Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP Brazil 15054-000. E-mail bonilla@ibilce.unesp.br, Tel (+5517) 32212361, Fax 32212356.

RESUMO

A maioria das substâncias químicas disponíveis no mercado não possui uma caracterização no que se refere à sua toxicidade potencial. Com o objetivo de avaliarmos a toxicidade do Brometo de etídio (BE), composto muito utilizado em laboratórios de Biologia Molecular, testamos três concentrações (1, 5 e 30µM) em *Drosophila melanogaster* para avaliar os possíveis efeitos em dois níveis: gênico (expressão gênica da *Hsp70*, *Sod1* e *Est-6*) e bioquímico (atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione S-transferase). Houve um aumento da expressão dose-dependente do gene da *Est-6*, sendo que para o gene da *Hsp70* houve uma diferença de expressão com relação ao controle. O mesmo não foi observado para o gene da *Sod1*. Entretanto, quando analisado o perfil da atividade enzimática, com exceção da catalase, todas as demais enzimas de detoxificação analisadas apresentaram diferenças com relação ao controle. Isso sugere que o BE, assim como o EMS, possam atuar também a nível molecular.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase, glutathione redutase, heat shock protein70, esterase-6, expressão gênica, atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

O brometo de etídio (BE – brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridina) é um composto intercalante que permite a visualização de ácidos nucleicos, RNA e DNA sob iluminação com luz ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989). Foi descrito também na literatura, que o BE apresenta, por propriedades anti-cancerígenas por inibir o crescimento de fibroblastos de ratos e células renais de hamster, em cultura celular (NISHIWAKI et al., 1974; NASS, 1972; HEINEN, 1978). Essa aplicação potencial na saúde humana não tem sido utilizada, pois há relatos na literatura de que o BE atua, eventualmente, como agente mutagênico em algumas espécies, como ratos (PENNA et al., 1977; PACK et al., 1978), ouriço-do-mar (VACQUIER ; BRACHET, 1969), bactérias (MACCANN et al., 1975) e *Saccaromyces cerevisiae* (SLONIMSKI et al., 1968; PERLMAN et al., 1971). A mutagenicidade aparentemente é devida a metabólitos formados *in vivo* pelas enzimas de detoxificação (McCANN et al., 1975).

O BE atua também como um inibidor intercalante da enzima topoisomerase II (topo II), que atua na manutenção da integridade do material genético (MO ; BECK, 1999; GODARD et al., 2002). Quando há um aumento nos níveis de clivagem do DNA mediada pela topo II, há uma conversão da enzima como uma potente toxina celular, induzindo a apoptose, alteração do ciclo celular e genotoxicidade (ATTIA et al., 2002). Esses fatores podem levar à infertilidade e aumentar a incidência de malignidades secundárias (TIBURI et al., 2002).

Em trabalho anterior (OUCHI et al., 2007) verificamos que o BE pode influenciar os padrões eletroforéticos de proteínas totais e diminuir a atividade da esterase-6 em *D. melanogaster*. Nesta espécie, a esterase-6 (EST-6) é uma carboxilesterase não-específica (EC 3.1.1.1) comumente polimórfica para duas aloenzimas em populações naturais (GIRARD et al., 1977; COCHRANE ;

RICHMOND, 1979). A função desta enzima e aloenzimas na biologia de *Drosophila* não está bem definida; sabe-se que ela está envolvida em processos reprodutivos, tendo os machos adultos uma atividade específica da EST6 que é de cinco ou mais vezes maior do que em qualquer outro estágio de desenvolvimento ou em fêmeas adultas. A EST6 está concentrada no ducto ejaculatório anterior do macho e durante a cópula é transferida para a fêmea (RICHMOND et al., 1980). Essa enzima pode estar envolvida na produção de feromônios e influenciar na velocidade de cópula.

Por outro lado, pelo metabolismo oxidativo normal são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS), como íons superóxido de hidrogênio, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Acredita-se que o ataque oxidativo gere a ativação de uma bateria de genes para proteção celular. Falhas nesse mecanismo geram um acúmulo de radicais livres, que podem causar um estresse oxidativo ao DNA e danos às membranas, mutagenicidade, degradação de tecidos, apoptose, transformação celular e câncer (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

Para evitar os efeitos nocivos, existem enzimas de proteção, dentre elas a glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e a óxido nítrico sintase (NOS) (HALLIWELL, 1999; FREMONT, 2000). A SOD catalisa a destruição do radical ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a CAT, por sua vez, converte o H_2O_2 em água e oxigênio, eliminando assim radicais livres (ORR e SOHAL, 1994).

No processo de proteção intracelular contra o dano oxidativo a glutathione reduzida (GSH) desempenha um papel essencial, sendo vital a manutenção da relação GSH/GSSG (a forma oxidada) favorável à primeira. A GSH tem funções importantes também em outros aspectos como o metabolismo de nutrientes e a regulação de

processos celulares, entre eles a expressão gênica, proliferação celular, apoptose, etc. (WU et al., 2004).

A glutathione S-transferase é uma enzima de detoxificação presente tanto em eucariotos como em procariotos e participa da catálise de vários substratos endógenos e de xenobióticos (DOUGLAS, 1987). As enzimas de redução de dissulfetos: glutathione reductase e tioredoxina reductase são muito conservadas entre bactérias, fungos, vermes e mamíferos. Essas proteínas são responsáveis pela manutenção da homeostase redox intracelular para proteção do organismo dos danos oxidativos (MEISTER, 1988). Kanzok et al. (2001) demonstraram a ausência da glutathione reductase em *D. melanogaster*, identificaram um novo tipo de tioredoxina reductase, que faz a redução da GSSG. Esses dados sugerem que a defesa antioxidante em *Drosophila*, e provavelmente em outros insetos, difere fundamentalmente do encontrados em outros organismos.

Outras biomoléculas envolvidas na integridade do metabolismo normal e defesa celular são as *heat shock proteins (hsp)*, que são classificadas de acordo com o seu peso molecular em kDa: HSP 100, 90, 70, 60 e 40. Essas proteínas são sintetizadas em resposta a diferentes situações de estresse, tais como fatores fisiológicos, fatores patológicos e fatores ambientais (KIANG; TSOKOS, 1998). Três aspectos caracterizam as hsp como biomarcadores de poluição: i) elas são parte da resposta celular de proteção da conformação nativa de proteínas; ii) sua síntese é provavelmente induzida, entre vários fatores, por um grande número de substâncias químicas e, iii) a resposta a um estresse pode ocorrer em pequenas concentrações de poluentes que são comumente encontradas no ambiente (BIERKENS, 2000).

As proteínas da família hsp 70 exibem um complexo de genes de regulação do crescimento e estresse, e são marcadas de acordo com os diferentes compartimentos

subcelulares (MUKHOPADHYAY et al., 2003a). Estudos demonstraram a imensa potencialidade da hsp70 no monitoramento da poluição utilizando a abordagem transgênica tanto *in vivo* como *in vitro* (MUKHOPADHYAY et al., 2003b). Elevados níveis de hsp 70 foram encontrados em células de organismos expostos a pesticidas (CHOWDHURI et al., 1999; NAZIR et al., 2001), comidas adulteradas (MUKHOPADHYAY et al., 2002), solventes (NAZIR et al., 2003), e aumento da temperatura (KREBS et al., 1997). Isto é responsável pela expressão de hsp 70, que se torna um importante indicador molecular dos efeitos biológicos adversos. A eficiência da expressão da hsp 70, como um biomarcador da poluição ambiental, foi utilizada por diversos pesquisadores (POMERAI, 1996; VARO et al., 2002). Assim, muitas pesquisas foram focalizadas nessa proteína, considerando-a um biomarcador da agressão por poluentes ambientais (revisado por SANDERS, 1993; BIERKENS, 1998).

No intuito de verificar alguns efeitos provocados pelo BE em diferentes níveis em *D. melanogaster*, analisamos o efeito em nível bioquímico (baseado na análise da atividade enzimática de enzimas de detoxificação: catalase, superóxido dismutase, glutationa S-transferase e glutationa redutase) e níveis gênicos, avaliando os efeitos em genes por meio da reação da PCR quantitativa para os genes *Cat*, *Hsp70*, *Sod*, *Sod2* e *Est-6*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Linhagem:

Os espécimes de *D. melanogaster* de São José do Rio Preto com os quais trabalhamos fazem parte de linhagens montadas a partir de uma coleta efetuada em maio de 2005, no município de São José do Rio Preto, SP. A coleta foi realizada com

auxílio de uma armadilha fechada (MEDEIROS; KLACZKO, 1999), sendo que a triagem e identificação das espécies foram realizadas no “Laboratório de Sistemática e Ecologia de *Drosophila*” do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP. Foi utilizada uma linhagem massal (montada a partir de seis fêmeas).

A linhagem foi mantida em câmaras de temperatura constante a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, no Departamento acima citado, em garrafas de vidro de 250 mL, contendo 50mL de meio de cultura de banana-ágar, com repiques dos estoques a cada 30 dias.

2. Exposição ao BE e ao EMS:

Três diferentes concentrações de BE foram misturadas homogeneamente ao meio de cultura. De acordo com os objetivos propostos, a menor quantidade de BE utilizada ($1\mu\text{M}$) corresponde às concentrações deste produto usadas nas soluções para corar géis de eletroforese de DNA. As demais concentrações utilizadas foram 5 e 30 μM . A concentração de EMS ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$) utilizada foi também de $1\mu\text{M}$, como controle positivo enquanto o grupo não tratado quimicamente foi tido como controle negativo.

O material contaminado com BE e EMS foi segregado e enviado a destinação final adequada através do Programa de Gerenciamento de Resíduos da UNESP.

3. Análise da expressão dos genes *Hsp*, *Est*, *Sod*, *Sod2* e *Cat*

a. Extração de RNA total

O RNA total foi isolado a partir de 30 indivíduos adultos, usando o reagente TRIZOL (Invitrogen), e para a eliminação de qualquer DNA, foi realizado um tratamento com a enzima *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi gerado a partir de 1 μg de

RNA total usando o kit *High Capacity* (Applied Biosystems), em condições de baixa estringência (37°C).

b. PCR quantitativa (PCR em tempo real)

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene *Rp49* (controle endógeno) e os genes *Hsp*, *Est-6*, *Sod*, *Sod2* e *Cat*, desenhados a partir das sequências depositadas no FLYBASE (<http://flybase.bio.indiana.edu>). As sequências usadas como oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação por PCR em tempo real dos genes *Hsp*, *Est-6*, *Sod1*, *Sod2*, *Cat* e do gene *rp49* (controle endógeno). * Tamanho do produto amplificado pelos iniciadores.

Gene	Sequência <i>Sense</i> 5'→3'	Sequência <i>Antisense</i> 5'→3'	pb
<i>Rp49</i>	CGGATCGATATGCTAAGCTGT	GCGCTTGTTTCGATCCGTA	182
<i>Hsp</i>	AGGACATGAAGCACTGGCCT	TGGAAGTGTGATGACTGCGTC	215
<i>Est-6</i>	ATGTTTCGGTGCAGCATGGCA	ATCCATTTGAGAGCCAGCCGT	171
<i>Sod</i>	ACCAAGGTCAACATCACCGA	GCAATGCCAATAACGCCGCA	171
<i>Sod2</i>	CCACCAGACCTACGTCAACA	GACTCGATGGCCTTCTTCAG	204
<i>Cat</i>	TCATTACACCCAGAAGCGCA	CAATTTGAAGGTGTGCGAGCCA	175

As reações foram realizadas usando o equipamento *7300 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems) compreendendo uma etapa inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 60 °C e 20 segundos a 72 °C para extensão. Todas as reações foram realizadas em triplicata, e em todos os experimentos foram utilizados controles negativos.

O valor relativo da expressão do transcrito alvo foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação ao gene endógeno (normalizador, o *rp49* sendo esse um gene constitutivo). Nesta avaliação, as comparações de quantidade foram feitas a partir do C_T (*Threshold Cycle*, momento no qual o sistema de amplificação começa a detectar um aumento de sinal associados ao aumento exponencial do produto de PCR na

fase linear da reação). O valor da expressão relativa dos genes estudados foi calculado de acordo com Pfaffl (2001).

4. Ensaio Enzimático - Análises Bioquímicas

a) Preparo das amostras para análise das enzimas SOD, CAT, GST, e GR

Para as análises das atividades enzimáticas da SOD, CAT, GST, e GR, vinte moscas foram homogeneizadas (1:4, m:v) em tampão Tris 50 mM, pH 7,4, contendo inibidor de serino e cisteíno proteases (PMSF) na concentração de 1mM, e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos. A fração sobrenadante foi, então, coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por uma hora, formando as frações citosólica (sobrenadante) e microssomal (precipitado). A fração citosólica foi coletada e armazenada a -80 °C, para medida da atividade das enzimas.

b) Análises enzimáticas e quantificação de proteínas

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969), utilizando um sistema de geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorvância em 550 nm em 25° C.

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 240 nm, a 30° C. A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen et al., (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 mM de GSH, e o aumento de absorvância foi acompanhado a 340 nm.

A atividade da GR foi medida baseada na metodologia de Carlberg e Mannervik (1985), na qual o consumo do NADPH é estimado por meio da variação de absorbância e acompanhado por dois minutos a 340 nm e 30 °C, na presença do substrato GSSG. A metodologia consiste na redução da GSSG a GSH pela glutathione redutase com a concomitante oxidação do NADPH a NADP⁺. Para isto, 40 µL de amostra foi adicionado em um meio de reação contendo 20 µL de glutathione oxidada (GSSG), 20 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) e 950 µL de tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,5, EDTA 1 mM.

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976). O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e a comparação dos resultados com a curva analítica, com valores de concentração conhecidos, fornecem a concentração da proteína em estudo.

5. Análise Estatística

Para os experimentos de PCR em tempo real o teste estatístico aplicado foi de Dunnett, com índice de significância de 5%. Já para a análise enzimática foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, com $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa computacional BioEstat 4.0 (AYRES, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Análise da Expressão Gênica:

A figura 1 demonstra a expressão gênica da *HSP70*, sendo que pode-se perceber uma menor expressão para os grupos tratados em relação ao controle negativo. Além disso, pode-se perceber ainda, uma semelhança maior entre os tratados com BE com o

controle positivo do que com o controle negativo. Entretanto, apesar de tão diferentes na expressão, quando a análise estatística é aplicada verifica-se que há somente diferenças entre os tratados com 1 μ M de BE e 1 μ M de EMS com o controle negativo, ou seja, os grupos expostos à menor concentração de BE e ao controle positivo, sugerindo que não ocorre um efeito dependente da dose.

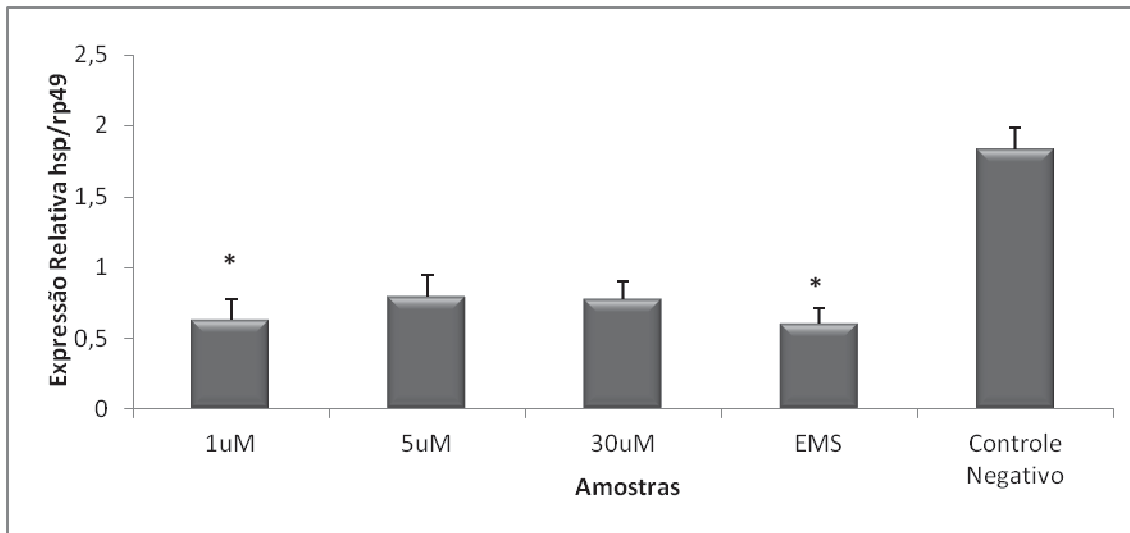


Figura1: Expressão do gene da *HSP70* em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μ M) e a 1 μ M de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

Para o gene da *EST6* (figura 2), a expressão demonstrou-se dose-dependente para os grupos tratados com o BE, sendo que houve em todos os tratados uma maior expressão, o que poderia estar relacionado com uma maior expressão da atividade enzimática. Entretanto, previamente demonstramos (OUCHI et al., 2007) que para os grupos tratados com BE e que apresentavam alterações morfológicas havia uma menor atividade da *EST6*, o que pode ser um indício de que os metabólitos gerados pela presença do BE alterem a atividade da enzima, atuando, provavelmente como um inibidor, assim como o que foi verificado por Attia et al. (2002) em que a presença do BE atua como um inibidor da topo II. Entretanto, quando a análise estatística é aplicada,

somente 1 μ M e 5 μ M apresentam diferenças significativas com relação ao controle negativo.

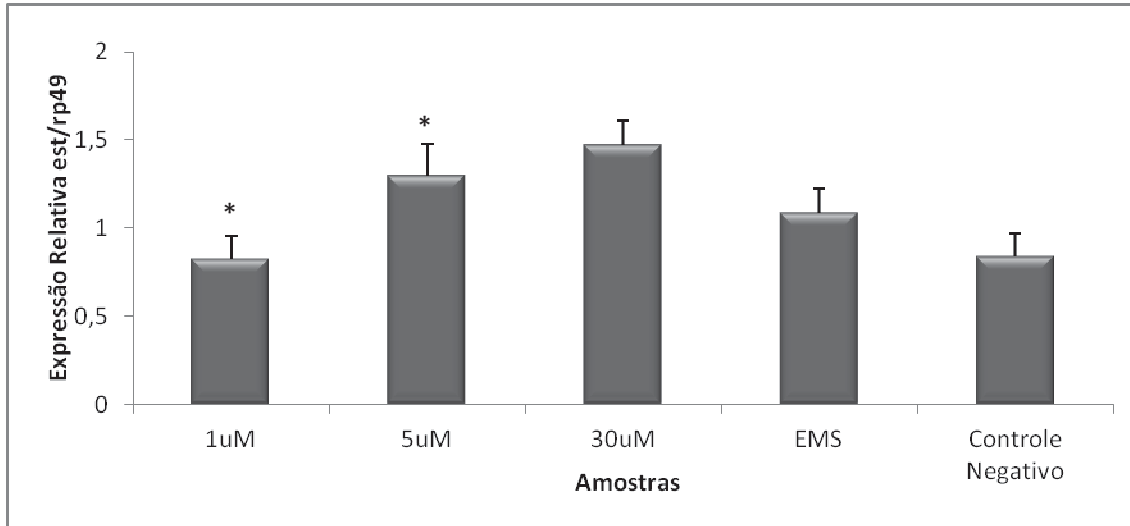


Figura 2: Expressão do gene da *EST6* em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μ M) e a 1 μ M de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

Já para a expressão gênica da *SOD 1* (figura 3) não houve diferenças significativas entre controle e tratados com BE, somente entre os dois controles, apesar da média aritmética da expressão desse gene ser sempre maior para os tratados com BE.

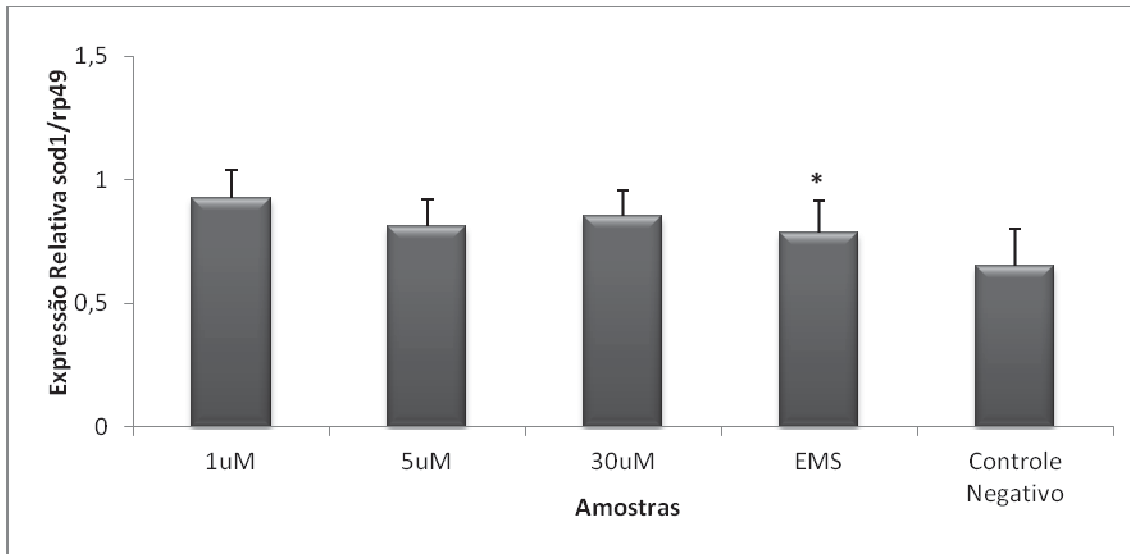


Figura 3: Expressão do gene da *SOD1* em em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μM) e a 1 μM de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

B) Análise Enzimática

Quando observada a figura 4, que mostra a atividade enzimática da catalase, os resultados não mostraram diferenças significantes.

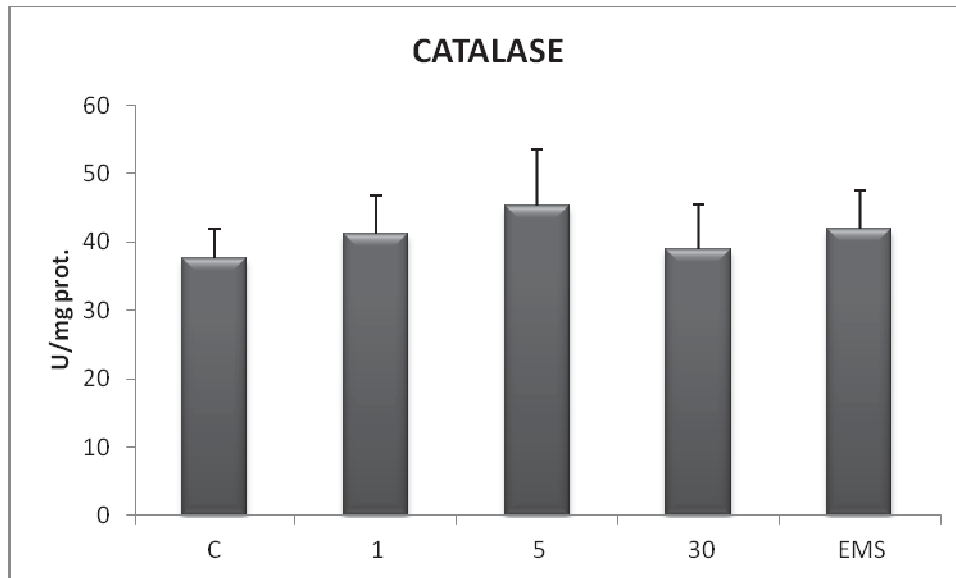


Figura 4: Atividade enzimática da catalase em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μM) e a 1 μM de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (C).

Para a glutathiona redutase, conforme mostrado na figura 5, houve uma atividade diferenciada entre 5 e 30 μM de BE e 1 μM de EMS. Pode-se notar também que houve um aumento crescente da atividade dessa enzima, conforme aumenta-se a concentração de BE. Logo, pode-se inferir que o efeito do BE sobre a atividade da GR é dose-dependente.

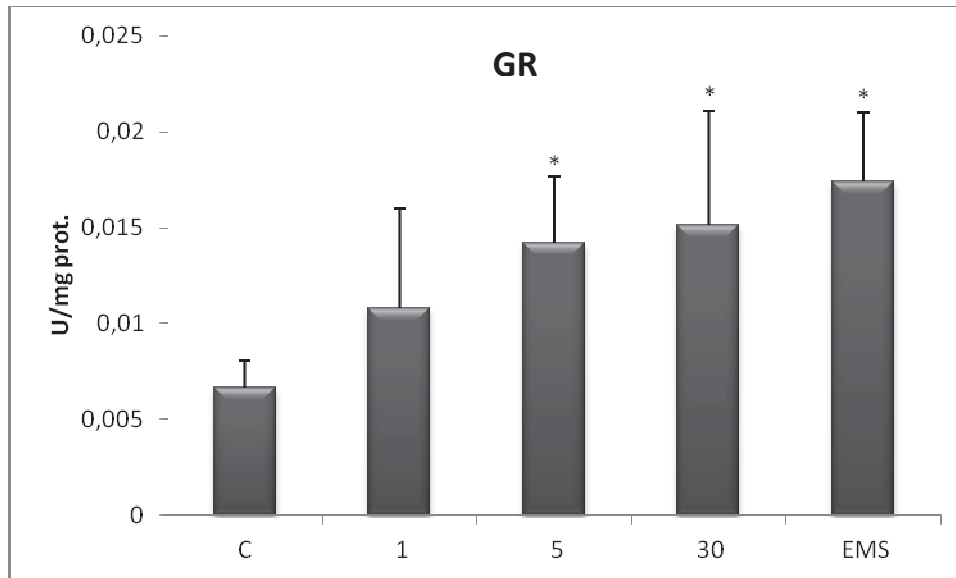


Figura 5: Atividade enzimática em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μM) e a 1 μM de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (C).

Para a SOD e GST houve entre todos os tratados uma diferença significativa com relação ao controle. Para a GST (figura 6) apresentou, para 30 μM de BE, uma atividade diferenciada mesmo quando comparada com o 1 e 5 μM de BE, enquanto que o EMS apresentou uma atividade distinta também se comparada ao 30 μM de BE. Além disso, a GST apresentou menor atividade catalítica do que o controle negativo, comportando-se de forma semelhante ao controle positivo. Já a SOD, apresentou uma diferença de atividade entre o 30 μM de BE se comparada a atividade catalítica do 1 e 5 μM de BE.

A SOD (figura 7) apresentou-se distinta também entre todos os tratados com BE e EMS, sendo que a expressão também foi dose-dependente para os tratados com BE, nos quais aumentou proporcionalmente à elevação da concentração do BE. O controle positivo com EMS também apresentou elevação significativa. Estes resultados podem

indicar a elevação do estresse oxidativo induzido pelo EB, induzindo a síntese da enzima como medida de proteção.

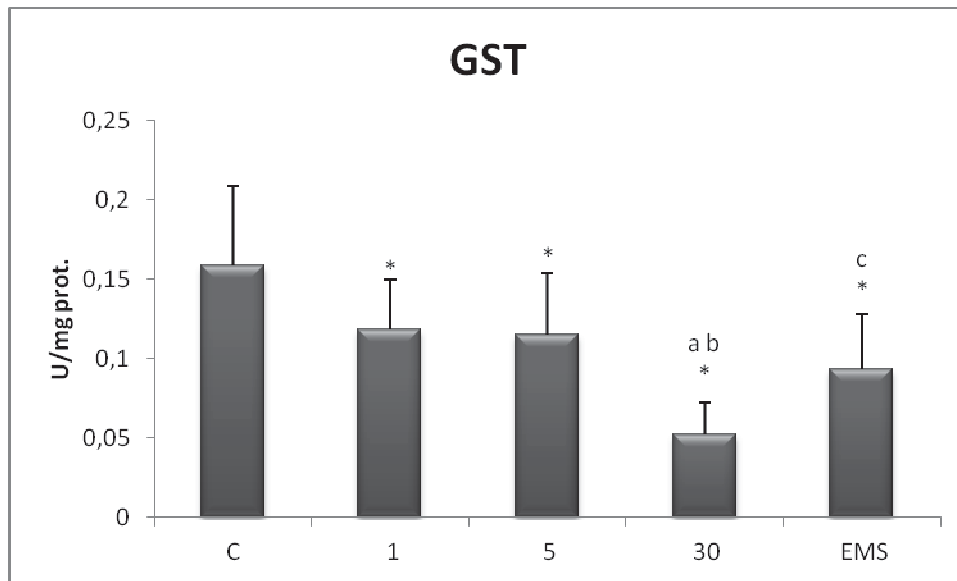


Figura 6: Atividade enzimática da glutiona S-transferase em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μM) e a 1 μM de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (C); a: diferente em relação a 1 μM ; b: diferente em relação a 5 μM ; c: diferente em relação a 30 μM .

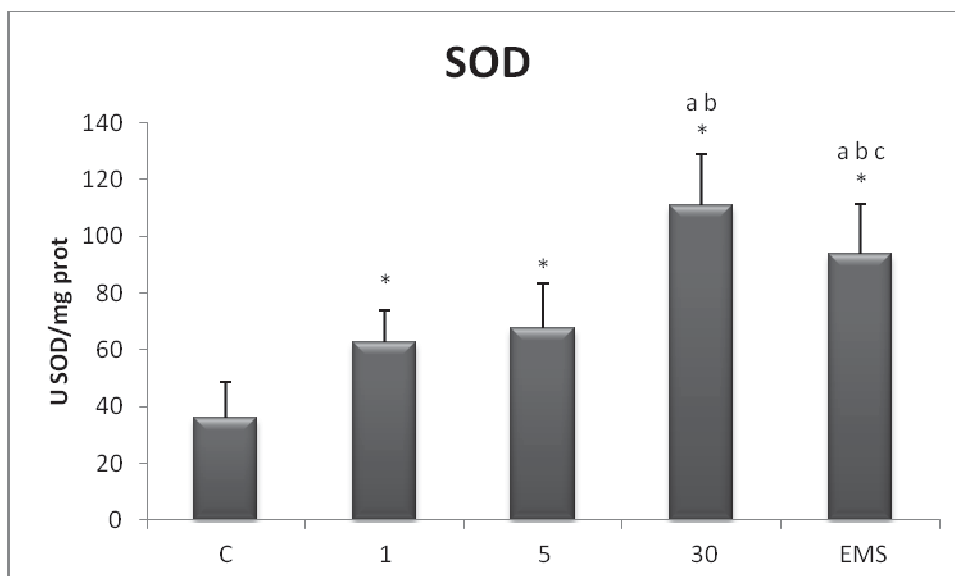


Figura 7: Atividade enzimática da superóxido dismutase em espécimes de ambos os sexos de *D. melanogaster*, expostos a diferentes concentrações de brometo de etídeo (1-30 μM) e a 1 μM de etilmetanosulfonato (EMS). Os asteriscos mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (C); a: diferente em relação a 1 μM ; b: diferente em relação a 5 μM ; c: diferente em relação a 30 μM .

Comparação da expressão gênica e da atividade enzimática:

Como foi relatado, foi realizado para SOD, análises tanto em nível gênico, como em nível bioquímico. Verificou-se que tanto uma maior expressão gênica, como também uma maior atividade enzimática para os grupos tratados em relação ao grupo controle. Quando analisado estatisticamente, verificou-se que houve um aumento da expressão gênica somente do EMS em relação ao controle, enquanto que na parte enzimática a diferença da atividade enzimática foi entre todos os grupos tratados e controle tanto positivo, como em relação ao controle negativo. Isso pode ser devido ao fato de que nós conseguimos realizar a expressão gênica somente da *Sod1* e, sabe-se que *D. melanogaster* possui dois genes que codificam duas isoenzimas: SOD 1 e SOD 2, enquanto a medição da análise enzimática seria incapaz de distinguir entre as isoformas. O fato das moscas congeladas terem sido congeladas pode ter facilitado a quebra de mitocôndrias e a liberação da SOD2, a que contribuiria para a elevação constatada da atividade. A Catalase, enzima que deve transformar o peróxido de hidrogênio formado pela SOD não teve sua atividade afetada nos grupos expostos, o que sugere duas opções: que mantenha sua eficiência, ou que seja incapaz de lidar com a sobrecarga de H_2O_2 .

No que se refere ao metabolismo da glutathiona, a atividade da GST foi significativamente inibida pela exposição ao BE e EMS. Como essa enzima faz parte do

sistema de detoxificação, se considerarmos apenas esta enzima, a metabolização do BE seria prejudicada, porém não temos medidas de atividade ou expressão gênica de outras enzimas do sistema que metaboliza os xenobióticos, o que nos impede de termos uma avaliação global do que ocorre com a transformação e excreção do BE. A atividade da GR aumentou nos grupos expostos, sugerindo maior expressão da enzima, para manter a relação GSH/GSSG favorável ao estado reduzido. Lembremos que o aumento de H₂O₂ devido à maior atividade da SOD pode promover aumento da formação de GSSG através da glutathione peroxidase (WU et al., 2004).

Como esta é uma análise preliminar, as análises dos efeitos comparativos entre a atividade enzimática e expressão gênica, serão realizadas ainda o PCR em tempo real para os genes da GST e GR de *D. melanogaster*.

CONCLUSÕES FINAIS:

O BE pode ser o causador de um estresse oxidativo que afetou a atividade das enzimas envolvidas na degradação de ROS. Pode-se observar também, a atividade da GR para a espécie de *D. melanogaster*, fato esse não descrito anteriormente na literatura. Além disso, a GR apresentou uma expressão diferenciada entre os grupos tratados e o grupo controle.

REFERÊNCIAS:

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEst 4.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Editora: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT/ Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2005.

ATTIA, S.M.; SCHMID, T.E.; BADARY, A.O.; HAMADA, F.M.; ADLER, I.D. Molelular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. *Mutat Res*, v. 520, pp. 1-13, 2002.

- BEUTLER, E. Disorders in glutathione metabolism. *Life Sci.*, v. 16(10), p.1499-505, 1975.
- BIERKENS, J. G. E. A. Heat shock proteins in ecotoxicological risk assessment. *Advances in Molecular Toxicology*, Utrecht, p. 531-544, 1998.
- BIERKENS, J.G. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology.*, v.153(1-3), pp.61-72, 2000
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, v. 113, p.484-90, 1985.
- COCHRANE, B.J.; RICHMOND, R.C. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. II. The genetics and frequency distributions of naturally occurring variants studied by electrophoretic and heat stability criteria. *Genetics*, v. 93(2), pp. 461-78, 1979.
- CHOWDHURI, D. K.; SAXENA, D. K.; VISHWANATHAN, P. N. Effect of hexachlorocyclohexane (HCH), its isomers, and metabolites on Hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.63, pp.15-25, 1999.
- DOUGLAS, K.T. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v. 59, p. 103–67, 1987.
- FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, v. 66, p. 663-73, 2000.
- GIRARD, P.; PALABOST, L.; PETITI, C. Enzymatic variation at seven loci in nine natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet.* v.15(5-6), p. 589-99, 1977.
- GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by alkaline comer assay. *Cytol*, v. 62, p. 39-45, 2002.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem. Pharm.*, v.49, p. 1341-1348, 1995.
- HEINEN E. Effects of antimetabolic agents either free or bound to DNA on mouse peritoneal macrophages cultivated in vitro. *Virchows Arch B Cell Pathol*, v. 27, p. 79-87, 1978.
- KANZOK, S. M.; et al. Substitution of the Thioredoxin System for Glutathione Reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v. 291, p. 643-646, 2001

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOKI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem.*, v. 251(20), p.6183-8, 1976.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology*, v. 80, p. 183-201, 1998.

KREBS, R.A.; FEDER, M.E. Tissue-specific variation in HSP70 expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Exp. Biol.*, v. 200, p. 2007-2015, 1997.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 72, p.5135-9, 1975.

MATÉS, J. S.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosc*, v. 4, 1999.

McCord, J.M. ; Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.*, v. 244(22), p.6056-63, 1969.

MEDEIROS, H.F.; KLACZKO, L.B. A weakly biased *Drosophila* trap. *Dros. Inf. Serv.*, v. 82, p. 100-102.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.*, v. 263 (33),p. 17205–8, 1988.

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 674, p. 36-44, 2009.

MO, Y.Y.; BECK, W.T. Association of human DNA topoisomerase II alpha with mitotic chromosomes in mammalian cells is independent of its catalytic activity. *Exp Cell Res.*, v. 252(1), pp. 50-62, 1999.

MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Heat shock response: hsp70 in enviromental monitoring. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 17(5), p. 249-254, 2003a.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D.K.; BAJPAI, V.K.; CHOWDHURI, D.K. Argenome oil induced cellular damage in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: Protective role of 70kDa heat shock protein. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 17(4), p. 223-234, 2003b.

NASS, M.M.K. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, v. 72, p. 522, 1972.

NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; KAR CHOWDHURI, D. Chlorpyrifos induced hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Arch. Environ. Toxicol.*, v. 41, p. 443-449, 2001.

NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v.13 (2), 2003.

NISHIWAKI, H.; MIURA, M.; IMAI, K.; OHMO, R.. KASWASHUMA, K.; EZAKI, K.; UCEDA, R.; YOSHIKAWA, H.; NAGATA, K.; TAKEYAMA, H.; YAMADA, K. *Cancer Research*, v.34, p. 2699, 1974.

OUCHI, R.Y.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). *Bull of Environ Contam Toxicol*, v. 78, p. 489-493, 2007.

ORR, W. C; SOHAL, R. S. Extension of Life-Span by Overexpression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v. 263, p. 1128-1130, 1994.

PACK, G.R.; LOEW, G. Origins of the specificity in the intercalation of ethidium into nucleic acids. A theoretical analysis. *Biochim Biophys Acta*, v. 519, p. 163-172, 1978.

PEÑA, A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A.; DE GÓMEZ-PUYOU, M.T. The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem Biophys*, v. 180, p. 522, 1977.

PERLMAN, P.S.; MAHLER, H.R. Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis. *Nature New Biol*, v. 231, p. 12-16, 1971.

PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 9, p. 29-45, 2001.

de POMERAI, D. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Hum. Exp. Toxicol.* v. 15(4), p. 279-85, 1996.

RICHMOND, R.C.; GILBERT, D.G.; SHEEHAN, K.B.; GROMKO, M.H.; BUTTERWORTH, F.M. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v. 207, p. 1483-5, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1989.

SANDERS, B. M.; MARTIN L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci Total Environ*, v. 139-141, p. 459-70, 1993.

SLONISMSKI, P.P.; PERRODIN, G.; GROFTH, J.H. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal “petites”. *Biochem Biophys Res Comm*, v. 30, p. 232-239, 1968.

TIBURI, M.; REGULY, M.L. SCHWATSMANN, G.; CUNHA, K.S.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat res*, v. 519, p. 141-149, 2002.

VARO, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LOPEZ, F.J.; NAVARRO, J.C. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. *Arch Environ Contam Toxicol.*, v. 42(2), p. 229-35, 2002

VALKO, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1–40, 2006.

VACQUIER, V.D.; BRACHET, J. Chromosomal abnormalities resulting from ethidium bromide treatment. *Nature*, v. 222, p. 193-195, 1969.

WU, G.; Fang, Y-Z.; Yang, S.; Lupton, J.R.; Turner, N.D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.*, v. 134, p. 489-492, 2004.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS:

Com a realização deste trabalho foi possível verificar os efeitos do brometo de etídeo (EB) misturado ao meio de cultura em *Drosophila melanogaster*, avaliados em níveis de produtividade diária ao longo de seis gerações (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a gerações) usando uma linhagem massal, e em nível gênico e bioquímico, analisando-se o padrão de atividade enzimática para enzimas envolvidas na metabolização de espécies reativas de oxigênio, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST) e a expressão dos seguintes genes: *cat*, *hsp 70*, *sod 1* e *sod 2* (genes que codificam enzimas envolvidas na integridade celular), assim como a expressão do gene *est-6* (que codifica a enzima β -esterase, envolvida no processo reprodutivo dessa espécie). Dessa forma, através da exposição contínua ao EB, conseguimos verificar as seguintes alterações:

1. *Produtividade diária:* Verificou-se que para essa linhagem houve, para cada geração, diferenças significantes em termos de produtividade. Além disso, a análise do padrão de emergência total ao longo de quinze dias nos permitiu verificar que os machos expostos ao EB, assim como ao EMS, de *D. melanogaster* são mais sensíveis que as fêmeas.
2. *Análise bioquímica:* Através da atividade enzimática para enzimas envolvidas na metabolização de enzimas envolvidas no processo de destoxificação como a catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione S-transferase revelou que essas enzimas tiveram uma expressão e atividade distinta entre controle e tratados (excetuando-se a atividade da catalase). Essas diferenças foram verificadas pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk, com $p \leq 0,05$. Essas enzimas participam do processo de eliminação de xenobióticos e de radicais livres, que poderiam causar danos em nível celular.
3. *Análise da Expressão Gênica:* Verificou-se a expressão para alguns genes, entre eles, *sod*, *hsp 70* e *est-6*, diferenciada em alguns grupos submetidos à exposição ao EB e EMS. Os genes que codificam a SOD e HSP70 estão envolvidas na detecção de fatores que poderiam alterar a integridade celular, enquanto que a

Est-6 está envolvida no processo reprodutivo. Foram detectadas diferenças pelo teste de Dunnet, com índice de significância de 5%.

4. *Análise morfológica:* Permitiu-nos observar as alterações morfológicas decorrentes, provavelmente, de alterações no padrão de desenvolvimento. As principais alterações foram verificadas nas asas (deformações em nervuras, asas não esticadas, alterações no padrão de pintas das asas, infladas), no padrão de pigmentação corpóreo (pintas ou manchas foram encontradas no escutelo, patas, porção ventral do abdômen e entre os tergitos) e nos tergitos (malformações que resultavam em um aspecto tortuoso ao contrário do padrão retilíneo e uniforme normal). Com uma incidência menor, foram encontrados indivíduos inteiramente malformados, sem asa, e sem uma das patas. A frequência de indivíduos alterados foi sempre mais elevada quando comparada ao controle negativo, não exposto.
5. Os efeitos do EB foram perceptíveis mesmo na concentração mais baixa, igual àquela utilizada nos laboratórios de pesquisa, em que o EB é utilizado como um corante que se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA e RNA, em métodos de biologia molecular.
6. Os experimentos realizados mostraram uma elevada variação de respostas, mostrando a variabilidade de respostas individuais. A suscetibilidade diferente de indivíduos frente aos mutágenos reflete a existência de variabilidade genética. É pertinente levar-se em consideração a sensibilidade individual dos organismos para se avaliar os fatores que causam a toxicidade, bem como o seu impacto como um poluente da biosfera.
7. Os resultados obtidos permitiram-nos evidenciar efeitos tóxicos induzidos pelo EB e/ou seus metabólitos em *D. melanogaster*, os quais servem de alerta para serem tomadas medidas de proteção por aqueles que usam rotineiramente essa substância, que igualmente devem adotar procedimentos adequados de descarte.

A substituição do EB por novas opções disponíveis no mercado que não apresentam efeitos mutagênicos seria a melhor opção.

8. Com relação ao elemento transponível *Bari-1* não houve diferença no polimorfismo de inserção do mesmo, verificado pela técnica de Southern Blot.