

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EXPOSIÇÃO SIMULTÂNEA AO VINILCICLOHEXENO E AO
METILMERCÚRIO EM *Drosophila melanogaster*: ANÁLISE
BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Candia Piccoli

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Bruna Candia Piccoli

**EXPOSIÇÃO SIMULTÂNEA AO VINILCICLOHEXENO E AO METILMERCÚRIO
EM *Drosophila melanogaster*: ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Co-orientadora: Dr^a. Ana Lúcia Anversa Segatto

Santa Maria, RS, Brasil

2017

Candia Piccoli, Bruna

Exposição simultânea ao vinilciclohexeno e ao metilmercúrio em *Drosophila melanogaster*: análise bioquímica e molecular / Bruna Candia Piccoli.- 2017.

56 f.; 30 cm

Orientador: João Batista Teixeira da Rocha

Coorientadora: Ana Lúcia Anversa Segatto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2017

1. Exposição à compostos tóxicos 2. Modelo alternativo
3. Vinilciclohexeno 4. Metilmercúrio 5. *Drosophila melanogaster* I. Batista Teixeira da Rocha, João II. Anversa Segatto, Ana Lúcia III. Título.

Bruna Candia Piccoli

**EXPOSIÇÃO SIMULTÂNEA AO VINILCICLOHEXENO E AO METILMERCÚRIO
EM *Drosophila melanogaster*: ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 13 de fevereiro de 2017:

João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Ana Lúcia Anversa Segatto, Dr^a. (UFSM)
(Co-orientadora)

Cristiane Lenz Dalla Corte, Dr^a. (UNIPAMPA)

Gabriel da Luz Wallau, Dr. (FIOCRUZ)

Santa Maria, RS

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família e meus amigos os quais me proporcionaram apoio e incentivo para que este sonho tivesse se concretizado.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- a toda minha família, em especial, aos meus pais, Abrilino e Gislaine um muito obrigada. Grata por acreditarem no meu potencial e me incentivarem, pelo amor e cuidado de todos esses anos, pelo apoio mesmo quando decidi mudar os planos que tinham feito para mim, que em diversos momentos tiveram que abdicar de coisas para si para poder realizar meus sonhos. A minha irmã Alice Candia Piccoli que também estava presente nestes momentos importantes, obrigada pela paciência;

- ao meu orientador João Batista Teixeira da Rocha pela oportunidade concedida à área de Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela confiança em mim depositada, grata pela orientação;

- a Ana Lucia Anversa Segatto pela oportunidade de me co-orientar. Grata pela pessoa amável, incentivadora e prestativa. Adquiri não somente conhecimento, mas também uma amiga;

- a minha banca, Cristiane Lenz Dalla Corte e Gabriel da Luz Wallau pela disponibilidade em avaliar meu trabalho;

- a todos os colegas de laboratório, em especial, as co-autoras e melhores amigas Cláudia Sirlene de Oliveira e Fernanda D'Ávila da Silva que foram imprescindíveis na realização desta dissertação, não apenas pela ajuda nos experimentos e escrita, mas também pelo apoio e incentivo a mim concedido;

- aos amigos e agora compadres Cláudia Vargas Klimaczewski, Diego de Souza e Margiani de Paula Fortes que me conheceram quando decidi iniciar no mundo da pesquisa, me orientaram, e hoje são praticamente parte da família.

RESUMO

EXPOSIÇÃO SIMULTÂNEA AO VINILCICLOHEXENO E AO METILMERCÚRIO EM *Drosophila melanogaster*: ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR

AUTORA: BRUNA CANDIA PICCOLI
ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
CO-ORIENTADORA: ANA LUCIA ANVERSA SEGATTO

A exposição a compostos tóxicos é cada vez mais frequente. Este fato é relevante, visto que xenobióticos causam um desequilíbrio na homeostase do organismo, principalmente, induzindo o estresse oxidativo. Além disso, podem alterar a atividade de enzimas e a expressão gênica, principalmente relacionada ao sistema antioxidante e a resposta inflamatória, o que pode ser usado como um indicador precoce de toxicidade. Dentre estes compostos destacam-se o vinilciclohexeno (VCH), um subproduto da produção de plástico e derivados, e o metilmercúrio (MeHg), uma forma orgânica do Hg, encontrada principalmente nos peixes. Como estamos constantemente expostos a uma ampla variedade de xenobióticos, torna-se necessário estudar os efeitos da exposição a dois ou mais agentes tóxicos concomitantemente. Deste modo, este trabalho visa estudar os efeitos isolados e da interação do MeHg e do VCH frente ao estresse oxidativo e modulação gênica em *Drosophila melanogaster*, uma vez que estes compostos apresentam semelhanças nos seus mecanismos de toxicidade. Para construir curvas de sobrevivência as moscas foram expostas a diferentes concentrações de MeHg (0 a 400 µM) e de VCH (0 a 10 mM). As maiores concentrações dos compostos que não alteraram a sobrevivência das moscas foram utilizadas no estudo do efeito da coexposição. A produção de espécies reativas (ER) e a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) foram avaliadas na cabeça e no corpo das moscas após um e três dias de exposição individual e concomitante ao VCH e ao MeHg. As modificações na expressão de genes relacionados à manutenção do estado redox e resposta inflamatória das células foram avaliadas após três dias de exposição em ambos os tecidos. Houve uma diminuição na produção de ER após um dia de exposição ao MeHg na cabeça das moscas, em contraste, todos os tratamentos aumentaram a produção de ER no corpo das moscas após um dia de exposição e somente a coexposição dos compostos induziu um aumento neste parâmetro após três dias. Quanto a GST, na cabeça das moscas, após um dia de exposição ao VCH houve um aumento na atividade desta enzima ao passo que a exposição ao MeHg induziu este aumento após três dias de exposição. No corpo, todos os tratamentos aumentaram a atividade da GST após um dia de exposição aos compostos e, após três dias, somente a exposição ao MeHg aumentou a atividade desta enzima. Os tratamentos não alteraram a atividade da AChE na cabeça das moscas. Ocorreu um aumento na expressão do gene Relish, na exposição ao MeHg no corpo das moscas. Sendo assim, a exposição ao VCH e ao MeHg induziu estresse oxidativo e ativação da resposta inflamatória. Destacamos que os testes bioquímicos e moleculares foram capazes de detectar alterações mesmo quando a taxa de mortalidade das moscas não foi afetada. Na maioria dos testes não conseguimos detectar um aumento nos efeitos tóxicos após a coexposição, o que pode incorrer do fato que os dois compostos testados, apesar das semelhanças nos mecanismos de toxicidade, têm como principais alvos órgãos diferentes.

Palavras-chave: estresse oxidativo; resposta inflamatória, xenobiótico, modelo alternativo.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS EXPOSURE TO VINILCYCLOHEXENE AND METHYLMERCURY IN *Drosophila melanogaster*: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ANALYSIS

AUTHOR: BRUNA CANDIA PICCOLI
ADVISOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
COADVISOR: ANA LUCIA ANVERSA SEGATTO

Exposition to toxic compounds is becoming more frequent. This fact is of relevant since xenobiotics cause an imbalance in the body homeostasis mainly inducing oxidative stress. In addition, they can alter enzyme activities and gene expression, especially of those related to the antioxidant system and the inflammatory response, which can be used as an indicator of toxicity. Among these compounds vinylcyclohexene (VCH), a byproduct of plastic and derivatives production, and methylmercury (MeHg), mainly found in fish, stand out. We are constantly exposed to a wide range of xenobiotics and it is necessary to study the effects of exposure to toxic agents concomitantly. Thus, this work aims to study the isolated and interactive effects of MeHg and VCH on the oxidative stress and gene modulation in *Drosophila melanogaster*, since these have similarities in their mechanisms of toxicity. We used different concentrations of MeHg (0 a 400 μ M) and VCH (0 a 10 mM) to make survival curves. The highest concentrations of the compounds that did not alter fly survival were used in the interactive effect study. Reactive species production and glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes activities were evaluated in the head and in the body of the flies one and three days after individual and concomitant exposure to VCH and MeHg. Changes in gene expression related to redox state and inflammatory cell responses were evaluated after three days of exposure in both tissues. There was a decrease in reactive species production after one day of exposure to MeHg in the head of the flies, in contrast, all treatments increased the reactive species production in the body of the flies after one day of exposure and only the coexposition of the compounds induced an increase in this parameter after three days. Regarding to GST, after one day of exposure to VCH there was an increased the activity of this enzyme whereas exposure to MeHg induced this increased after three days of exposure in the head of the flies. In the body, all treatments increased GST activity after one day of exposure to compounds and after three days, only exposure to MeHg increased the activity of this enzyme. The treatments did not alter AChE activity in the head of the flies. There was an increase in Relish gene expression after the exposure to MeHg in the body of the flies. Therefore, the exposure to VCH and MeHg induced oxidative stress and activation of the inflammatory response. We emphasize that biochemical and molecular tests were able to detect changes even when the mortality rate of the flies was not affected. In most tests we failed to detect an increase in toxic effects after co-exposure, which may be due to the fact that the two compounds tested, despite similarities in the mechanisms of toxicity, have different toxicity targets.

Keywords: oxidative stress; inflammatory response, xenobiotic, alternative model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 –	Metabolização do vinilciclohexeno pelo citocromo P450.....	15
Figura 2 –	Ataque nucleofílico realizado pelas proteínas ao vinilciclohexeno diepóxido.....	16
Figura 3 –	Ciclo do mercúrio no ambiente.....	18
Figura 4 –	Possíveis alvos moleculares do metilmercúrio	19
Figura 5 –	Mecanismo de neutralização de espécies reativas de oxigênio.....	21
Figura 6 –	Mecanismo de ação do NRF2.....	22
Figura 7 –	Atuação da acetilcolinesterase.....	24

MANUSCRITO

Figure 1 –	Kaplan-Meier survival curve of MeHg.....	32
Figure 2 –	Kaplan-Meier survival curve after 1 day and 3 days exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg.....	33
Figure 3 –	Climbing rate after one day or three days of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg.....	33
Figure 4 –	DCFDA oxidation.....	34
Figure 5 –	Glutathione S-transferase activity.....	37
Figure 6 –	Acetylcholinesterase activity.....	39
Figure 7 –	Expression of the genes encoding NRF2 and Keap1.....	40
Figure 8 –	Expression of the genes encoding Jafrac1 and TrxR.....	41
Figure 9 –	Expression of the genes encoding NFκβ activating protein and Relish.....	42

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 –	Sequence of RT-PCR primers.....	31
Table 2 –	Statistical analysis of DCFDA oxidation.....	35
Table 3 –	Statistical analysis of GST activity.....	38
Table 4 –	Statistical analysis of AChE activity.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VCH	Vinilciclohexeno
VCD	Vinilciclohexeno diepóxido
Hg	Mercúrio
MeHg	Metilmercúrio
SNC	Sistema Nervoso Central
mEH	Hidrolase microssomal epóxido
GST	Glutaciona S-transferase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
GR	Glutaciona redutase
-SH	Tiol
-SeH	Selenol
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NRF2	Fator nuclear eritróide 2
Keap1	Proteína Kelch 1 associada a ECH
ARE	Elemento de resposta antioxidante
SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutaciona peroxidase
Prx	Peroxirredoxina
NF-κβ	Fator nuclear-κβ
Iκβ	Proteína inibidora-κβ
TNF- α	Fator de necrose tumoral-α
IL-1	Interleucina-1
NKAP	Proteína ativadora do NF-κβ
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo geral	14
1.1.1 Objetivos específicos.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 VINILCICLOHEXENO	14
2.2 METILMERCÚRIO.....	17
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
2.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	22
2.5 SISTEMA COLINÉRGICO.....	23
2.6 <i>Drosophila melanogaster</i>	24
3 MANUSCRITO	25
4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, com uma breve revisão sobre os temas abordados nesta dissertação, e os objetivos. A seguir, encontra-se o referencial teórico e o manuscrito. A metodologia, os resultados e a discussão são apresentados no item manuscrito. O item conclusão encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se as citações que aparecem no item introdução e referencial teórico.

1 INTRODUÇÃO

A exposição passiva a compostos tóxicos tem se tornado cada vez mais exacerbada, visto que os mesmos estão sendo amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica, automobilística, entre outras. De modo geral, a exposição a xenobióticos causa um desequilíbrio na homeostase do organismo, principalmente, induzindo o estresse oxidativo (BRANCO et al., 2012). O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas produzidas e sua neutralização através do sistema antioxidante endógeno (SIES, 1997). Sabe-se que este desequilíbrio pode causar danos no DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Neste contexto destaca-se o vinilciclohexeno (VCH), o qual é um subproduto da produção de pesticidas, plástico, borracha e pneus, sendo utilizado comercialmente como diluente de resinas epóxidos (HUFF, 2001). A exposição passiva ao VCH (BHATTACHARYA; KEATING, 2012) pode acarretar danos ao sistema reprodutor, uma vez que estudos em ratos e camundongos mostraram associação deste composto a danos nos folículos primários e primordiais, podendo causar menopausa precoce (SMITH; MATTISON; SIPES, 1990; SPRINGER et al., 1996; MAYER et al., 2002). Existe uma escassez de informações sobre o mecanismo de toxicidade deste contaminante, entretanto, sabe-se que está envolvido com a formação de metabólitos epóxidos os quais podem se ligar a moléculas importantes no organismo, como proteínas, induzindo a perda de suas funções (RIZZO et al., 2012; ABOLAJI et al., 2015).

Outro xenobiótico muito utilizado comercialmente e na medicina como constituinte comum de vacinas, termômetros, medidores de pressão sanguínea, lâmpadas fluorescentes e bactericidas é o Hg (CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003). São encontradas diferentes formas de Hg na natureza, como o mercúrio elementar (Hg^0), assim como compostos inorgânicos e orgânicos. Dentre os compostos orgânicos de mercúrio, destaca-se o metilmercúrio (MeHg) (FARINA et al., 2013) formado no ambiente aquático através da metilação do mercúrio inorgânico pelos micro-organismos (COMPEAU; BARTHA, 1985). Ao ser ingerido, o MeHg é facilmente absorvido no intestino, sendo transportado para todos os tecidos com destaque para o sistema nervoso central (SNC). O mecanismo de toxicidade do MeHg ainda não está completamente elucidado, entretanto acredita-se que esteja envolvido com o aumento do estresse oxidativo (AZEVEDO et al., 2012).

A *Drosophila melanogaster* tem sido utilizada como modelo experimental a mais de 100 anos. Atualmente, sabe-se que o genoma da *D. melanogaster* (ADAMS et al., 2000)

possui muitas homologias com o genoma humano, o que reforça o uso de *D. melanogaster* como modelo experimental para entender mecanismos biológicos e processos de doenças em comparação com humanos (REITER et al., 2011). Além disso, a *D. melanogaster* tem um ciclo de vida muito rápido e alta reprodutividade (PANDEY; NICHOLS, 2011). Isto torna a *D. melanogaster* um modelo extremamente valioso no estudo do estresse oxidativo induzido por compostos químicos.

Como a exposição passiva a compostos tóxicos ocorre de maneira cada vez mais exacerbada e esta exposição não é somente a um composto específico, mas a vários, tornou-se relevante estudar se a toxicidade destes compostos poderia aumentar quando houvesse uma exposição concomitante a mais de um agente. Desta forma, este trabalho verificou os efeitos isolados e/ou aditivo do VCH e do MeHg frente ao estresse oxidativo em modelo de *D. melanogaster*.

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos isolados e da interação do MeHg e do VCH sobre parâmetros de toxicidade em *D. melanogaster*.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de espécies reativas e atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante e colinérgico em *D. melanogaster*.
- Analisar o desempenho locomotor de *D. melanogaster*.
- Investigar as modificações na expressão de genes relacionados à manutenção do estado redox e de resposta inflamatória das células em *D. melanogaster*.

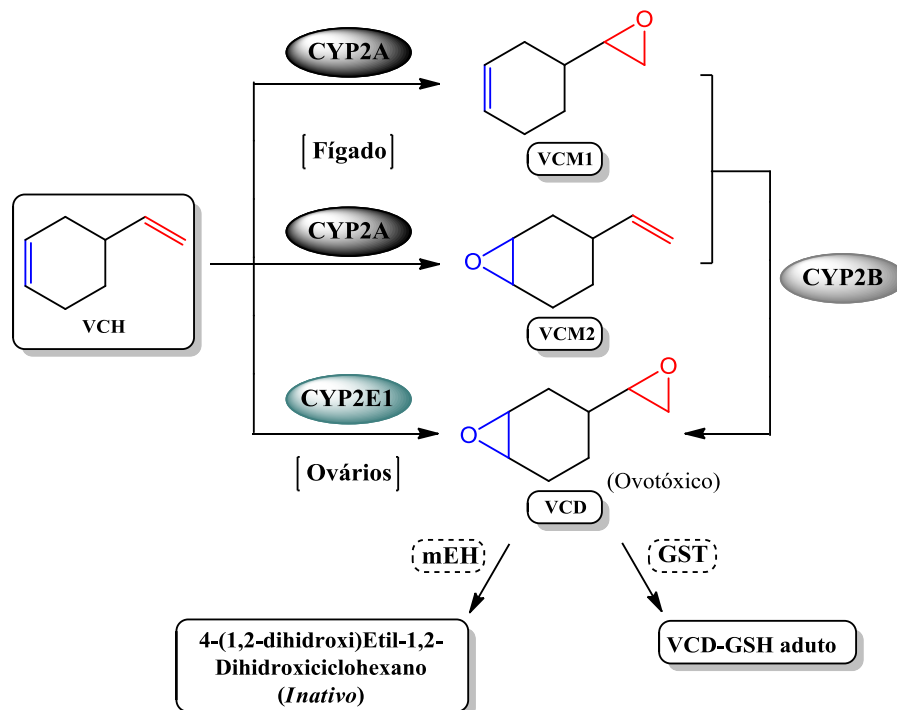
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VINILCICLOHEXENO

A exposição ao VCH tornou-se um problema de saúde pública por estar associado a toxicidade para o sistema reprodutor feminino. Como é considerado um subproduto da produção de plástico, borracha e pesticidas, a exposição passiva a este composto pode acontecer através da ingestão, inalação e contato dérmico (BHATTACHARYA; KEATING,

2012). Uma vez no organismo, citocromos presente no fígado e nos ovários o oxidam na tentativa de torná-lo mais polar a fim de ser eliminado (Figura 1). Em sua estrutura há duas ligações duplas que podem sofrer oxidação. No fígado, o citocromo P450 2A oxida uma das ligações duplas formando dois possíveis metabólitos monoepóxidos (VCM1 e VCM2). Posteriormente, o citocromos P450 2B oxida a ligação dupla restante formando o vinilciclohexeno diepóxido (VCD). Nos ovários apenas o citocromo P450 2E1 atua sobre o VCH formando VCD diretamente. A inativação do VCD pode ocorrer pela enzima hidrolase microssomal epóxido (mEH) formando 4-(1,2-dihidroxi)etil-1,2-dihidroxíciclohexano (CANNADY et al., 2002) ou envolvendo a enzima glutationa-S-transferase (GST) a qual conjuga o VCD com a glutationa (GSH) (RAJAPAKSA, 2007).

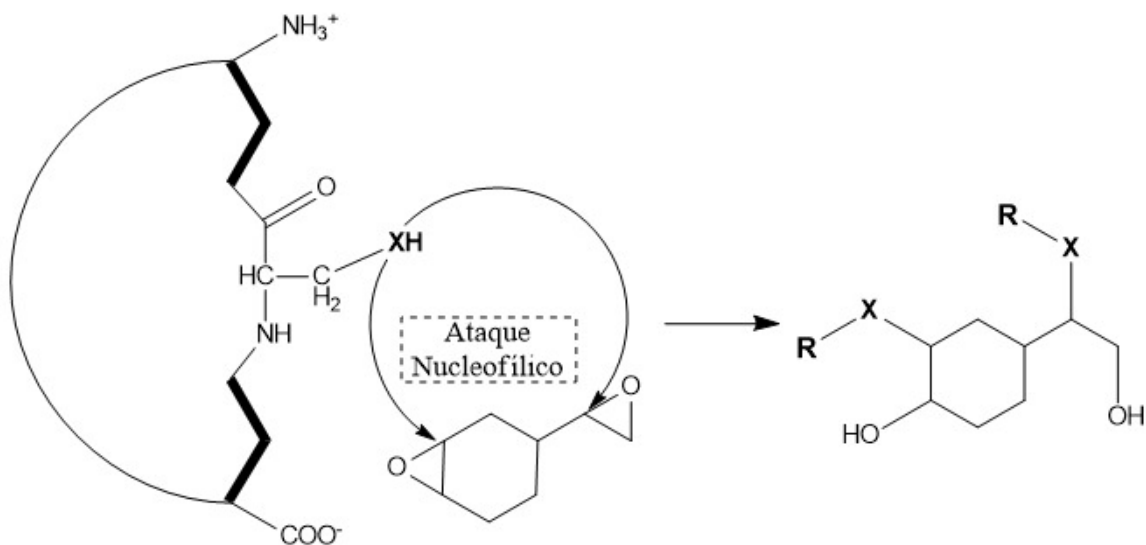
Figura 1 – Metabolização do vinilciclohexeno pelo citocromo P450. O 4-vinilciclohexeno (VCH), quando metabolizado no fígado, sofre a primeira oxidação pelo citocromo P450 2A o qual o transforma em dois possíveis metabólitos monoepóxidos (VCM1 - 4-vinilciclohexeno 1,2-epóxido ou VCM2 - 4-vinilciclohexeno 7,8-epóxido). Posteriormente, o citocromo P450 2B o oxida novamente transformando-o no seu metabólito diepóxido (VCD - 4-vinilciclohexeno). Nos ovários o citocromo P450 2E1 transforma o VCH diretamente no VCD. As enzimas hidrolase microssomal epóxido (mEH) e glutationa S-transferase o transformam em metabólitos inativos.



Fonte: Adaptada de Abolaji et al. (2014)

O metabolismo do VCH leva a formação de epóxidos, os quais são eletrófilos, e desta forma podem reagir com centros nucleófilos importantes na homeostase do estado redox da célula, como por exemplo, grupamentos tiol e selenol de proteínas (Figura 2) (ABOLAJI et al., 2015). Estes grupamentos estão presentes, em sua maioria, em proteínas do sistema antioxidante. Desta forma, o VCH poderia causar um desequilíbrio no sistema redox por depletar a GSH e proteínas do sistema antioxidante e também pela formação de espécies reativas nas reações metabólicas do citocromo P450 (RIZZO et al., 2012).

Figura 2 – Ataque nucleofílico realizado pelas proteínas ao vinilciclohexeno diepóxido. Proteínas que contém os aminoácidos cisteína e selenocisteína contém os grupamentos tiol e selenol ($X = S$ ou Se), respectivamente, os quais são considerados nucleofílicos e podem atacar os grupos éoxido do vinilciclohexeno diepóxido (VCD) ficando ligados covalentemente a este composto. Desta forma, o VCD pode inativar a enzima.



Fonte: Bruna Piccoli

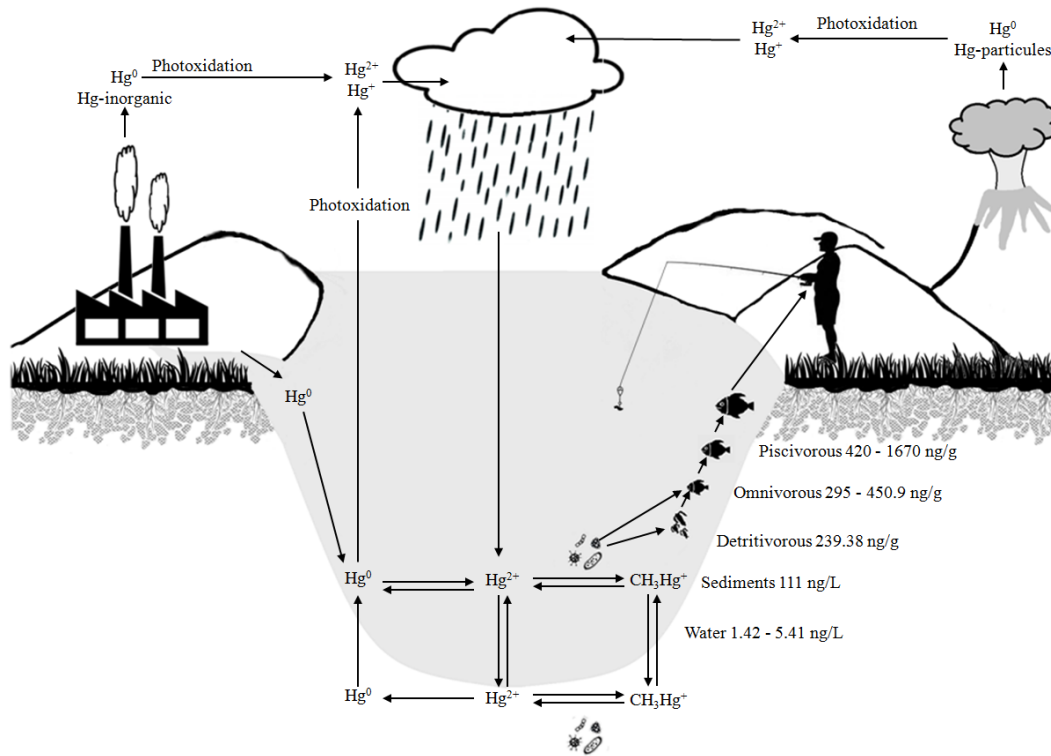
O VCH e seus metabólitos estão fortemente relacionados a destruição dos folículos primários e primordiais causando menopausa precoce em mulheres. Por sua vez, a menopausa precoce está associada ao maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, osteoporose, síndrome metabólica, câncer de ovário, doença de Alzheimer e depressão (SOWERS; LAPIETRA, 1995; WARING et al., 1999; CARR, 2003; VANDERHYDEN, 2005; KAPPELER; HOYER, 2012).

2.2 METILMERCÚRIO

O Mercúrio (Hg) é um metaloide presente no grupo 12 da tabela periódica. Pode ser encontrado na forma elementar (Hg^0), em diferentes estados de oxidação (Hg^+ e Hg^{2+}) ou presente em moléculas orgânicas, forma na qual destaca-se o MeHg. O Hg pode ser encontrado presente naturalmente no ambiente, através do vulcanismo e da erosão, e também por fonte antropogênica como na mineração e resíduos de fábricas (Figura 3). Quando o mercúrio inorgânico atinge o ambiente aquático, pode sofrer metilação por meio da ação dos micro-organismos (como bactérias sulforredutoras anaeróbias) formando MeHg (COMPEAU; BARTHA, 1985). O MeHg é liberado no ambiente aquático onde possui um enorme potencial de biomagnificação. Na cadeia alimentar os níveis de MeHg podem atingir quantidades na faixa de 1 mg/kg em peixes predadores. Portanto, populações que consomem peixes podem se expor a níveis elevados de MeHg (HINTELMANN, 2010), tornando a ingestão a principal forma de contaminação por este xenobiótico (CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003). Como o mercúrio não apresenta nenhuma função bioquímica ou fisiológica conhecida nos seres vivos, a exposição a quaisquer forma deste metaloide (elementar, inorgânico e/ou orgânico) possui significado toxicológico (BRANDÃO et al., 2015).

Uma vez ingerido, o MeHg é facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal (em torno de 90 a 95%) (NIELSEN; ANDERSEN, 1992) e distribuído para vários tecidos através da corrente sanguínea com destaque para o SNC (ZAREBA et al., 2002). O SNC é o principal alvo de toxicidade do MeHg. Esta molécula apresenta alta lipossolubilidade e, portanto, ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica, assim como membranas celulares. Também pode coordenar com o aminoácido cisteína o que facilita sua entrada no cérebro por um mecanismo de mimetismo molecular (ASCHNER, 1989; CLARKSON; VYAS; BALLATORI, 2007; BRIDGES; ZALUPS, 2016) onde o complexo MeHg-S-cisteína ultrapassaria a barreira hematoencefálica através do sistema de transporte de aminoácido tipo L (LAT1 e LAT2) mimetizando a metionina (ASCHNER 1989; BRIDGES; ZALUPS, 2016). A exposição ao MeHg no início do desenvolvimento encefálico é relacionada a danos neurotóxicos mais severos do que no indivíduo adulto (MARSH et al., 1995; COSTA et al., 2004; MANFROI et al., 2004; FRANCO et al., 2006; JOHANSSON et al., 2007; GRANDJEAN; HERZ, 2011).

Figura 3 – Ciclo do mercúrio no ambiente. O mercúrio elementar (Hg^0) e inorgânico pode ser liberado no ambiente de forma antropogênica, como dejetos de fábricas e através da mineração no ambiente aquático, e de forma natural, através da atividade vulcânica e erosão. Quando atinge o ambiente aquático pode sofrer metilação pelos micro-organismos, formando metilmercúrio (MeHg), o qual pode ser biomagnificado na cadeia alimentar aquática. Populações que consomem peixes dos níveis mais altos da cadeia alimentar podem ser expostas a grande quantidade de MeHg .



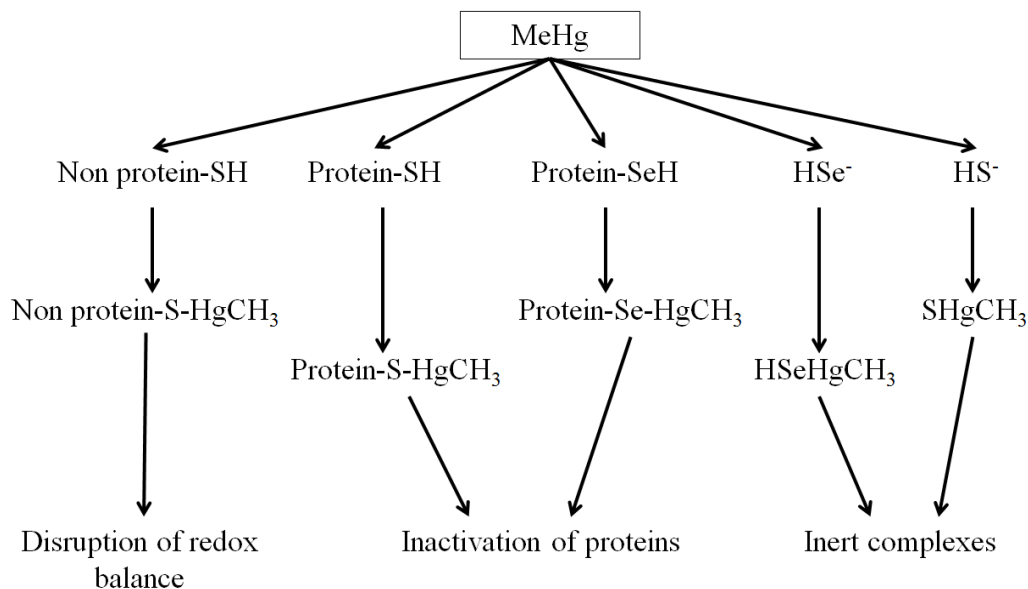
Fonte: Oliveira et al., (Under review)

Muitos estudos foram realizados a fim de compreender o mecanismo de toxicidade do MeHg utilizando diferentes abordagens e modelos experimentais. Primeiramente, o MeHg pode depletar e/ou inibir proteínas presente no sistema antioxidante, como a GSH, GR, GPx, TrxR, entre outras que, por tornarem-se inativas induzem o estresse oxidativo (FUJIYAMA; HIRAYAMA; YASUTAKE, 1994; FARINA et al., 2013; FRANCO et al., 2006; JOHANSSON et al., 2007; KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006). O MeHg também pode modular a atividade de transportadores, neurotransmissores ou receptores, através da interação com a enzima acetilcolinesterase, impedindo a degradação do neurotransmissor acetilcolina o qual continuará excitando os receptores nicotínicos e/ou muscarínicos (ČOLOVIĆ et al., 2013; ADEDARA et al. 2016, HAN et al., 2017). Também induz o aumento da concentração extracelular de glutamato (através da geração de peróxido de hidrogênio o qual regula a atividade dos transportadores do neurotransmissor glutamato) que, por sua vez, superestimula

os receptores NMDA levando ao efluxo de Ca^{2+} e Na^+ que está associado ao estresse oxidativo e a neurotoxicidade (FARINA et al., 2013; FITSANAKIS; ASCHNER, 2005; YIN et al., 2007, 2011).

Sua alta toxicidade deve-se ao fato da molécula de MeHg ser um eletrófilo mole, sendo assim, nos sistemas biológicos, tem muita afinidade por grupos tiois (-SH) e selenois (-SeH) que são considerados nucleófilos moles (FARINA, ASCHNER; ROCHA, 2011) (Figura 4). Os grupamentos -SH estão presente em milhares de proteínas, principalmente constituintes do sistema antioxidante, e em compostos de baixo peso molecular (glutathiona e cisteína, por exemplo) (BISEN-HERSH et al., 2014). Em contraste, são encontradas em células de vertebrados em torno de 20 - 40 tipos de selenoproteínas (HATFIELD et al. 2014, ROCHA; PICCOLI; OLIVEIRA, 2017). Acredita-se, desta forma, que o principal alvo de toxicidade do MeHg esteja relacionado a perda da função das proteínas que contém estes grupamentos.

Figura 4 – Possíveis alvos moleculares do metilmercúrio. Devido a eletrofilicidade o metilmercúrio (MeHg) tem afinidade por moléculas que contém -SH ou -SeH, as quais estão presentes em peptídeos, proteínas ou livres no organismo.



Fonte: Oliveira et al., (Under review)

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

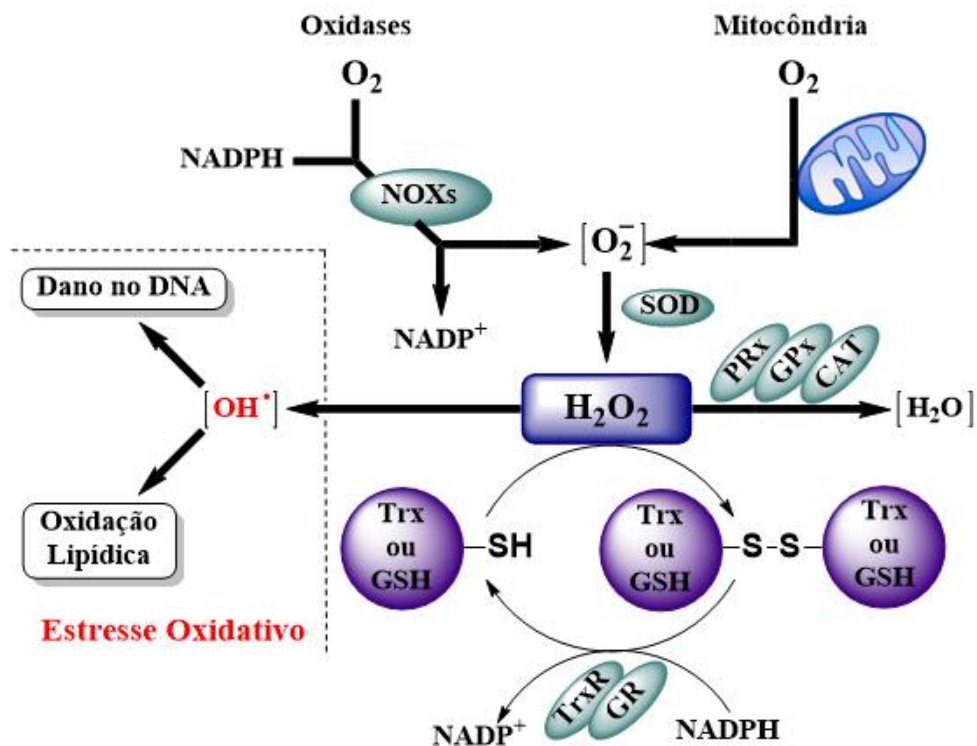
O organismo está constantemente produzindo espécies reativas como produto do metabolismo aeróbico. Em estado fisiológico, o mecanismo de defesa antioxidante é capaz de transformar estas espécies altamente reativas em moléculas não tóxicas (SOHAL; ARNOLD; ORR, 1990). A formação de moléculas de água é o principal mecanismo contra espécies reativas o qual pode envolver diferentes vias enzimáticas. Dentre as espécies reativas de oxigênio, destaca-se o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CROSS, 1987). O ânion superóxido é produzido pela mitocôndria e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases, sendo rapidamente convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 5) (LAMBETH, 2004; BRAND, 2010). O radical hidroxila pode ser formado a partir do peróxido de hidrogênio na presença de íons de Fe e destaca-se por oxidar proteínas, lipídeos e o DNA (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012).

Várias enzimas podem atuar sobre o peróxido de hidrogênio. Um mecanismo elucidado envolve a oxidação de grupos tióis presente nos resíduos de cisteína de proteínas (Cis-SH) como a GSH e a tioredoxina (Trx) que fazem parte de sistemas antioxidantes presentes em organismos procarióticos e eucarióticos (Figura 5) (RHEE, 2006; KORGE; CALMETTES; WEISS, 2015). A GSH e a Trx doam elétrons para o peróxido de hidrogênio transformando-o em água ($2GSH/Trx + H_2O_2 \rightarrow GSSG/Trx-SS-Trx + 2H_2O$). A glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR), assim como a tioredoxina oxidada é reduzida pela enzima tioredoxina redutase (TRxR) às custas de NADPH. Assim essas moléculas retornam a sua estrutura original restaurando, desta forma, sua função (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). Entretanto, na presença de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio, este pode oxidar o tiol a ácido sulfínico (Cis-SO₂H) ou ácido sulfônico (Cis-SO₃H), estas modificações são irreversíveis e fazem com que as proteínas percam sua função. Além disso, para prevenir o acúmulo de H_2O_2 , existem enzimas especializadas como a glutathiona peroxidase e as peroxirredoxinas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

O fator de transcrição que ativa a expressão de proteínas do sistema antioxidante é chamado de fator nuclear eritróide 2 (NRF2). O NRF2 encontra-se no citosol das células ligado a proteína Kelch 1 associada a ECH (Keap1) que o regula negativamente, ou seja, uma vez ligado ao Keap1, o NRF2 se mantém inibido (GAZARYAN; THOMAS, 2016). Elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio podem oxidar resíduos de cisteína presente no

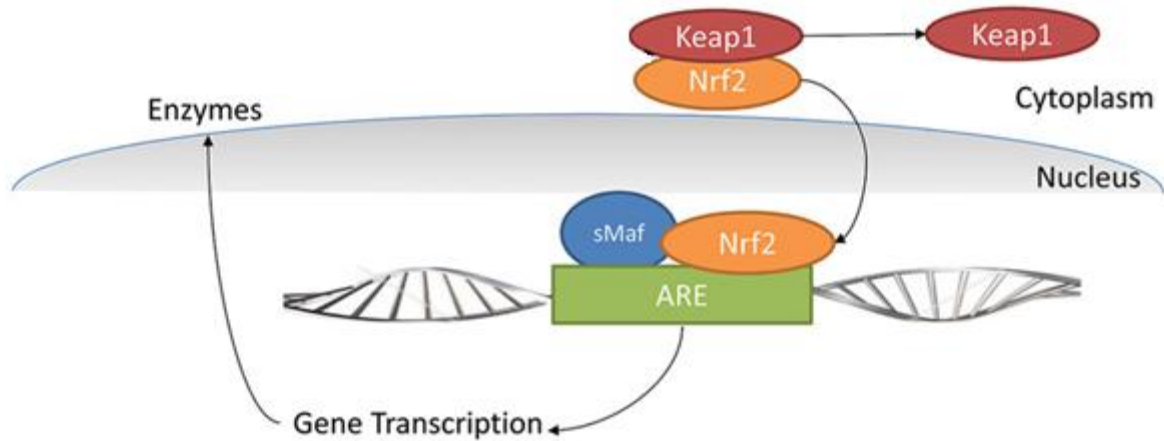
Keap1 resultando na dissociação deste inibidor do fator de transcrição. Por sua vez, o NFR2 se desloca até o núcleo das células onde se liga a elementos de resposta antioxidantes (ARE) ativando, desta forma, a transcrição de genes antioxidantes. O MeHg pode interferir no mecanismo Nrf2-Keap1, pois, como já mencionado, possui afinidade por grupamentos tiol, desta forma, poderia se ligar ao Keap1 ativando o Nrf2 (KUMAGAI et al., 2013; YOSHIDA; ABIKO; KUMAGAI, 2014). Por sua vez, um estudo realizado com camundongos fêmeas mostrou um efeito protetor do Nrf2 sobre o VCD. As fêmeas Nrf2 $-/-$ tratadas com VCD apresentaram um declínio na idade de reprodução, infertilidade e hipogonadismo quando comparado ao controle. A ausência de Nrf2 ocasionaria a não expressão da enzima mEH (controlada por este fator de transcrição) e, desta forma, exacerbando o estresse oxidativo nas células (HU et al., 2006).

Figura 5 – Mecanismo de neutralização de espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido é formado na mitocôndria e também pela enzima NADPH oxidase, sendo transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Por sua vez, o peróxido de hidrogênio pode ser transformado em água pelas enzimas peroxirredoxina (Prx), glutatona peroxidase (GPx). Também pode ser oxidado por moléculas que contém tiol. Entretanto, na presença de Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio pode haver formação de radical hidroxila ($\bullet OH$).



Fonte: Adaptado de Schieber; Chandel (2014)

Figura 6 – Mecanismo de ação do NRF2. O NRF2 encontra-se no citosol das células ligado a uma proteína inibidora (Keap1). Uma vez ativado, o NRF2 se desliga do Keap1, é transportado para o núcleo onde se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) para ativar a transcrição de genes relacionados à resposta antioxidante.



Fonte: Adaptado de Rastogi; Santiago-Moreno, Doré (2015)

2.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os sistemas de imunidade inata e adaptativa são essenciais na defesa a patógenos específicos e no reparo a danos teciduais (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Existem várias vias de sinalização que ativam resposta inflamatória. Aqui destacamos o fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) pela sua rápida ativação. O NF- $\kappa\beta$ é um nome genérico dado a uma família de fatores de transcrição envolvidos na ativação de genes relacionados a infecções, inflamações ou alguma situação de estresse que necessite de uma resposta rápida (SIEBENLIST; FRANZOSO; BROWN, 1994; BAEUERLE; BAICHWAL, 1997; BARNES; KARIN, 1997). A *D. melanogaster* possui três fatores de transcrição da família NF- $\kappa\beta$ identificados, Relish, Dif e Dorsal (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; CHEN et al., 2003).

As proteínas NF- $\kappa\beta$, Relish, Dif e Dorsal estão presentes no citoplasma das células ligadas a uma proteína inibidora chamada Cactus, homóloga a proteína humana I $\kappa\beta$ (BALDWIN, 1996). Quando há um estímulo intracelular, uma enzima quinase rompe a ligação entre o NF- $\kappa\beta$ e a I $\kappa\beta$ possibilitando a entrada do fator de transcrição no núcleo para se ligar ao DNA e ativar a transcrição dos genes relacionados a resposta inflamatória (BALDWIN, 1996). Em uma situação moderada de dano celular, o NF- $\kappa\beta$ ativa genes que protegem a célula da apoptose, entretanto, há indução de apoptose em casos severos (SONENSHEIN, 1997). Estes estímulos são, principalmente, o fator de necrose tumoral- α

(TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1). Foi descrita uma proteína presente no núcleo das células, chamada NKAP, que ativa a expressão do NF- κ B. Um estudo utilizando células transfectadas com plasmídeos que expressavam TNF- α e IL-1 na ausência de NKAP, concluiu que a expressão do promotor do gene do NF- κ B foi reduzida quando comparada as que possuíam NKAP, mostrando uma associação entre a NKAP e estas citocinas (CHEN et al., 2003). Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio estão relacionados a uma resposta inflamatória exacerbada, devido a elevada ativação de proteínas pró-inflamatórias, podendo atingir níveis patológicos (KONG, X.; et al. 2011)

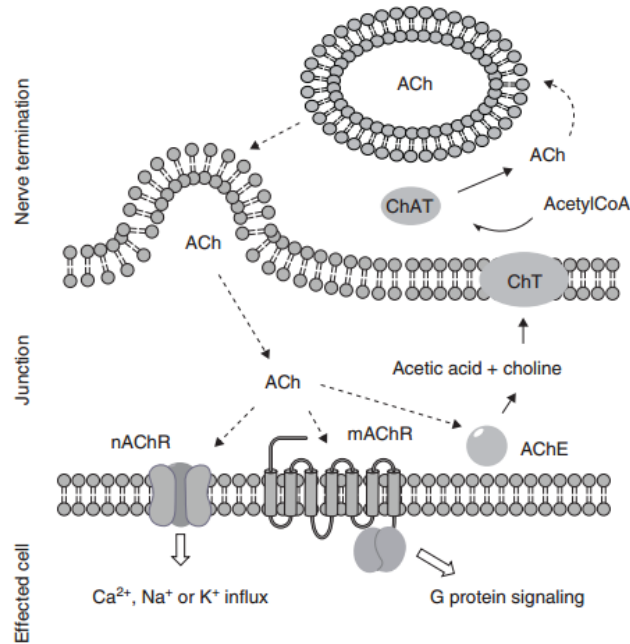
2.5 SISTEMA COLINÉRGICO

Dá-se o nome de sistema colinérgico a rede de neurônios que utiliza acetilcolina como neurotransmissor. Entretanto, a acetilcolina não é encontrada apenas em neurônios, mas em outras células do organismo como os eritrócitos (POHANKA, 2012). É sintetizada a partir de acetato e colina em uma reação catalisada pela enzima colina o-acetiltransferase, transferida para vesículas (GABRIELLE; JEANA; LORENZA, 2003) e liberada na fenda sináptica para atuar sobre os receptores nicotínicos ou muscarínicos (Figura 7) (POHANKA, 2012). A neurotransmissão colinérgica é rapidamente interrompida pela ação de enzimas colinesterases. Duas enzimas colinesterases são encontradas nos humanos: acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE).

A AChE é expressa em vários tipos de células do organismo, com destaque para as presentes no sistema nervoso central, onde há também a maior concentração de acetilcolina presente nos neurônios colinérgicos (WEVERS, 2011). No sítio ativo desta enzima estão presentes os aminoácidos serina, histidina e glutamina (SILMAN; SUSSMAN, 2008). É sabido que algumas moléculas, principalmente organofosforados e carbamatos, podem se ligar a AChE inibindo-a (POHANKA, 2012). Além disso, estudos em diferentes modelos experimentais (moscas, baratas e ratos) demonstraram inibição da AChE após exposição ao MeHg (ADEDARA et al. 2016, WOOTTEN et al., 1985, HAN et al., 2017), assim como um estudo em moscas mostrou esta mesma inibição após exposição ao VCH (ABOLAJI et al., 2014) através de mecanismos ainda não elucidados. A inibição desta enzima causa uma não interrupção da neurotransmissão sináptica pela acetilcolina por não haver enzima que a degrade, desta forma, continuará estimulando os receptores nicotínicos e muscarínicos. Os sintomas típicos de envenenamento agudo com compostos inibidores da AChE são agitação, fraqueza, fasciculações musculares, hipersalivação, sudorese. Além disso, envenenamentos mais

graves podem ocasionar insuficiência respiratória, inconsciência e convulsões, podendo levar a morte (ČOLOVIĆ et al., 2013).

Figura 7 – Atuação da acetilcolinesterase. A acetilcolina (ACh) presente em vesículas do neurônio pré-sináptico é liberada na fenda sináptica onde pode se ligar a receptores nicotínicos (nAChR) ou muscarínicos (mAChR). Após a neurotransmissão, a ACh é degradada em ácido acético e colina (ChT), esta última retorna ao neurônio pré-sináptico onde sofre ação da enzima colina o-acetiltransferase (ChAT) que sintetiza ACh novamente.



Fonte: Pohanka (2012)

2.6 *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, também conhecida como mosca da fruta, é um modelo experimental alternativo amplamente utilizado na pesquisa. Foi o primeiro organismo complexo a ter seu genoma sequenciado (ADAMS et al., 2000) e, posteriormente, descobriu-se que havia muitas homologias com o genoma humano. Desta forma, a *D. melanogaster* é um modelo experimental propício para estudos envolvendo mecanismos biológicos e processos de doenças em comparação com humanos (REITER et al., 2011), assim como, no estresse oxidativo induzido por compostos químicos podendo ser um modelo preditivo de toxicidade em mamíferos. Além disso, o ciclo de vida desta mosca é muito rápido, ela também possui alta reprodutividade onde um único par fértil pode produzir uma prole com centenas de indivíduos dentro de 10 a 12 dias (PANDEY; NICHOLS, 2011).

A mosca da fruta possui muitas proteínas que contêm grupamentos tiol em sua estrutura e três proteínas que contêm selenol (CASTELLANO et al., 2001). Uma destas

selenoproteínas é a selenofosfato sintetase (HIROSAWA-TAKAMORI; JÄCKLE; VORBRÜGGEN, 2000), uma enzima que cataliza a síntese de monoselenofosfato. As outras duas selenoproteínas, dSelG e dSelM, foram identificadas recentemente e ainda possuem função metabólica desconhecida (CASTELLANO et al., 2001). Por conseguinte, tanto as proteínas que contêm tiol como as que contêm selenol podem ser alvo de compostos tóxicos que possuem afinidade por estes grupamentos como o VCH e o MeHg, alvos deste estudo.

3 MANUSCRITO

Este manuscrito está submetido na Revista Toxicology Letters.

Simultaneous exposure to vinylcyclohexene and methylmercury in *Drosophila melanogaster*:
Biochemical and molecular analysis

Bruna C. Piccoli; Ana Lucia A. Segatto; Cláudia S. Oliveira; Fernanda D. da Silva; João B. T. da Rocha*

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

jbtrocha@yahoo.com.br

ABSTRACT:

Toxicants are widely distributed in environment and population can be passively and/or occupationally exposed to them. Exposure to xenobiotics was associated with imbalance in the body homeostasis mainly inducing oxidative stress and gene modulation. Among toxic compounds, we highlight the vinylcyclohexene (VCH) and methylmercury (MeHg). Several studies reported isolated effects of those compounds, but little is known about the effect of their interaction. Thus, this work aims to study the isolated and interactive effects of MeHg and VCH on the oxidative stress and gene modulation in *Drosophila melanogaster*. Based on survival curves of VCH and MeHg the concentrations of the compounds to be used in the interactive effect study were determined. Reactive species production and glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes activities were evaluated one

and three days after individual and concomitant exposure to VCH and MeHg. Expression of genes related to redox state and inflammatory responses were evaluated after three days of exposure. In general, the reactive species production and GST activity increased and AChE did not altered. There was an increase in Relish transcription factor gene. Therefore, the exposure to VCH and MeHg induced oxidative stress and activation of the inflammatory response.

Keywords: oxidative stress; inflammatory response; xenobiotic; alternative model.

1. Introduction

Toxicants are widely distributed in the environment and those found in high levels are mostly related to human activities (Branco et al., 2012). The plastic derivative vinylcyclohexene (VCH) is an example, this contaminant is used commercially as an epoxy resin diluent, being found mainly in production sites of plastic, rubber and pesticides (Huff, 2001). VCH passive exposition occurs through inhalation, ingestion or dermic contact (NTP, 1989).

Once in the body, VCH can be oxidized through the action of cytochromes P450 and its double bounds are transformed into epoxy groups. The liver has two cytochromes P450 2A and 2B that bioactivated VCH into its mono (4-vinylcyclohexene 1,2 epoxide or 4-vinylcyclohexene 7,8 epoxide) and diepoxide (VCD - 4-vynilcyclohexene diepoxide) metabolites, respectively. However, ovaries contain a cytochrome P450 2E1 which oxidizes the two double bounds forming the diepoxiede directly (Doerr-Stevens et al., 1999). Due to the eletrophilicity of the epoxides groups, these metabolites are toxic to the cells via interaction with nucleophilic centers (Abolaji et al., 2014). For instance, thiol containing proteins can be targeted by epoxides (Abolaji et al., 2015). In rodents, VCH and its metabolites have been associated mainly with ovary damage by triggering death of primary and primordial follicles (Springer et al., 1996).

Mercury (Hg) is an important environmental contaminant and a highly toxic metal that has no function in the living organisms. The level of Hg has been increasing along the years due anthropogenic activities (Horowitz et al., 2014). Among the chemical forms of mercury, the major health concern is related to the organic form, i.e., methylmercury (MeHg). MeHg is found in the aquatic environment as a product of Hg²⁺ methylation by microorganisms (Baird and Cann, 2004). MeHg is a soft eletrophile, consequently, it has high affinity for soft

nucleophiles, i.e., thiol and selenol groups present in proteins (Farina et al., 2011). In addition to proteins, thiol groups can be found in low molecular mass molecules, for instance, reduced glutathione and cysteine. The affinity of MeHg for –SH groups is too high and practically no free MeHg will be found in living cell. Indeed, MeHg will be found bound to cysteine, glutathione or target proteins. In mammals, MeHg is transported bound to cysteine or glutathione. The MeHg bound covalently to the amino acid cysteine can be internalized into different type of cell by the LAT protein (Bridges and Zalups, 2017).

The industrial society has faced some cases of Hg poisoning outbreaks, the most famous occurred in the city of Minamata in Japan. The use of Hg^{2+} as a catalyst in the synthesis of acetaldehyde resulted in the release of Hg in the Minamata Bay. The methylation of Hg in the sediment of the bay resulted in the bioaccumulation of MeHg along the food chain. The levels of mercury in fish reached levels as high as 50 ppm and more than a thousand victims of contaminated fish consumption was recorded (Ekino et al., 2007).

The toxicity of environmentally relevant contaminants has been normally made separately. However, in the environment the population is simultaneously exposed to more than one xenobiotic (Karri et al., 2016). Thereby, studies comparing the effect of the exposure to two or more toxicants are highly need to better understand potential interactions between contaminants.

In this context, the invertebrate model *Drosophila melanogaster* is widely used as an organism model because it has homologies with the human (Reiter et al., 2001) and can be a predictive model of toxicity in mammals. *D. melanogaster* have many thiol-containing proteins and three selenoproteins (Castellano et al., 2001). One of the selenoproteins is selenophosphate synthetase (Hirosawa-Takamori et al., 2000), which catalyzes the synthesis of monoselenophosphate. The other two recently identified selenoproteins have unknown metabolic role (dSelG and dSelM) (Castellano et al., 2001).

In this study we used *D. melanogaster* as a model to study the potential toxicological interactions between VCH and MeHg. Here we have determined some potential markers of electrophiles of toxicity, for instance, reactive species production, glutathione S-transferase, and acetylcholinesterase activity (Abolaji et al., 2014, 2015, Adedara et al., 2016). Furthermore, we have also assessed the expression of genes related to oxidative stress and found that some of them were modulated by levels of VCH and MeHg that separately did not alter the survival of flies exposed acutely to these contaminants.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade. 4-Vinylcyclohexene (99%), methylmercury chloride, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 5,50-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Stock and culture

Fruit flies (*D. melanogaster*) were provided by the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. Stocks were maintained and reared into a medium composed of cornmeal (1%), sucrose (1%), powdered milk (1%), agar (1%), yeast extract (2%), and nipagin (0.08%), mixed and cooked with distilled water (450 mL). Temperature and relative humidity were constant corresponding to 23°C and 60%, respectively, under 12h dark/light cycle conditions.

2.3. Concentration curves of MeHg and VCH

To determine the concentration to be used in the interaction experiment, 30 flies (both gender), 3 days old, were exposed to different concentrations of MeHg (0, 100, 200, and 400 μ M) diluted in ethanol (final concentration 0.1%). The MeHg was mixed into the medium. Experimental procedure consisted of three replicates for each concentration tested. The number of dead flies was registered every day during four days. (Figure 1). The highest concentration of MeHg that did not alter the flies survival (200 μ M) was selected to realize the interaction effect study. The VCH concentration was selected based in the study performed by Abolaji et al. (2014) where 1 mM was the highest concentration of VCH that did not alter the percent of survival after five days of exposure.

2.4. Simultaneous exposition to VCH and MeHg

To do the interaction effect study we divided the flies into four groups. Control group received ethanol, a group received only VCH (1 mM), a group received only MeHg (200 μ M)

and other group received VCH and MeHg. Compounds were added into the medium described above and transferred to vials. After cooling, thirty flies (both gender), 3 days old, were placed into the vials containing the experimental medium. Flies were reared during two different periods of exposure, which are 1 or 3 days, for all posterior analysis. The number of dead flies was registered every day in both procedures. Each experimental procedure consisted of twelve replicates.

2.5. Negative geotaxis

Locomotor performance of flies was determined using the negative geotaxis assay after the end of exposition to MeHg and VCH during 1 or 3 days for each treatment. For this assay, 10 flies of each group were cryoanesthetized and placed in vertical glass columns with 15 cm of length and 1.5 cm of diameter with a marking in the sixth cm. After 20 minutes (recovery from ice exposure), the flies were tapped to the bottom of the column through a little beat and in the course of 6 seconds the number of flies that climbed up the mark was recorded. This assay was realized in twelve independent experiments for each concentration.

2.6. Biochemical analysis

2.6.1. Preparation of sample

At the end of the treatment, twenty flies were cryoanesthetized and their head and body were separated due to the main target to VCH toxicity is the ovaries and MeHg the central nervous system. Samples were homogenized with 200 μ L of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, and centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes at 4 °C. Subsequently, the supernatant was separated from the pellet and the concentration of protein was determined in spectrometer Spectra Max at 280 nm. The protein concentration was adjusted so that all samples have the same amount (0.4 mg/mL for head samples and 0.3 mg/mL for body samples). The samples were used for the determination of acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activities and reactive oxygen species production.

2.6.2. Assessment of DCFDA oxidation

The DCFDA assay, which is a general index of oxidative stress, was determined as described by Pérez-Severiano et al. (2004). Briefly, potassium phosphate buffer pH 7.4 (75 mM) and DCFDA (5 μ M) were mixed with 5 μ L of sample. The fluorescence was monitored using a spectrophotometer Spectra Max plate reader, at 488 nm and 525 nm of emission and excitation, respectively, during 30 minutes with interval of 30 seconds.

2.6.3. Determination of glutathione S-transferase activity

The glutathione S-transferase activity was determined according to Habig et al. (1974). The system consisting of potassium phosphate buffer pH 7.4 (69.70 mM), ethylenediamine tetraacetic acid (1.09 mM), reduced glutathione (3.20 mM), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (0.80 mM) and 100 μ L of sample was monitored using a spectrophotometer Spectra Max plate reader, at 340 nm wavelength, during 30 minutes with interval of 30 seconds.

2.6.4. Determination of acetylcholinesterase activity

Acetylcholinesterase activity was determined according to Ellman et al., (1961). The system consisting of potassium phosphate buffer pH 7.4 (10 mM), DTNB (1 mM), acetylthiocholine (0.8 mM), and 30 μ L of sample., The activity was monitored using a spectrophotometer Spectra Max plate reader, at 412 nm wavelength, during 30 minutes with interval of 30 seconds.

2.7. RNA extraction and mRNA analysis through quantitative real time RT-PCR

Total RNA was extracted from 10 heads or bodies of flies from each group using Trizol® according to the specifications suggested by manufacture. RNA amount present in the samples was quantified in Nanodrop2000™ and visualized in 1.5 % agarose gel. RNA (1 μ g) was treated with DNase I (Invitrogen) according to the specifications suggested by manufacture. cDNA was synthesized using iScript™ cDNA Synthesis kit according to manufacture's protocol. The amount of cDNA was quantified in Nanodrop2000™ and 2,5 ng/ μ L was used in quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR). The primer sequences used in this study were NRF2, Keap1, NF κ B, Jafrac1, TrxR1, and Relish (Table 1). All experiments

were calculated in relation to two reference genes (β -tubulin and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH)) (Abolaji et al., 2014). Reaction condition was carried out in 20 μ L final volume with 2.5 ng/ μ L of cDNA, 1x PCR buffer, 0.2 μ M of each primer (Table 1), 0.2 mM dNTP, 1.5 – 5 mM MgCl₂, 0.1x SYBR® Green, and 0.02 U platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®) using 40 therm cycles of 15 seconds at 94 °C, 15 seconds at 60 °C, and 15 seconds at 72 °C (Golombieski et al., 2008). SYBR fluorescence was analysed by Software StepOne 2.0 version (AppliedBiosystems). The reactions were performed in duplicates of six independent experiments. Dissociation curve at 55 to 99 °C were obtained to confirm the amplification of a single specific product per reaction. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to establish the values of genic expression. Experimental number ranged from four to six in this assay.

Table 1. Sequence of RT-PCR primers.

Gene	Left	Right	Flybase gene ID
NFR2 (cap-n-collar)	AGCGCATCTCGAACAAGTTT	CGTGTTGTTACCCTCGGACT	FBgn0262975
Keap1	CCAACCTCCTCAAGGAGCAG	CGGCGACAAATATCATCCTT	FBgn0038475
NF κ B	CCGCAGAAACCAGAGAGTTC	TGTGCTTTCTCTTGCCCTTT	FBgn0039488
activating protein like			
Jafrac1	TGGATCAACACGCCAAGGAA	GGATGCCAGTCTCCTCATCG	FBgn0040309
TrxR1	CGTTCTATTGTGCTGCGTGG	AGCTTGCCATCATCCTGCTT	FBgn0020653
Relish	TTTAGGTGCGGCTCTGCTTT	CTCTCCAGTTTGTGCCGACT	FBgn0014018
GPDH	ATGGAGATGATTCGCTTCGT	GCTCCTCAATGGTTTTTCCA	FBgn0001128
β -Tubulin	ATCCCAACAACGTGAAGAC	ACCAATGCAAGAAAGCCTTG	FBgn0284243

2.8. Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm SEM. Data of biochemical analysis were analyzed by Four-way ANOVA [2 with/without VHC X 2 with/without MeHg x 2 ages (4 and 6 days-old) x sampling time (with sampling time treated as repeated measures) was applied to DCFDA oxidation, GST activity, and AChE activity. Main effect and lower order interactions will be discussed only when higher order interaction were not significant. Data from mRNA levels were analyzed by paired t test. The results were considered significantly when $P \leq 0.05$.

3. Results

As shown in Kaplan-Meier survival curve (Figure 1), a Logrank test for trend indicated a significant difference among the groups [Chi square (1) = 9.72, $p = 0.0018$]. Exposition of flies to 400 μM MeHg during 4 days caused a significant reduction in survival percentage, when compared to control group. In contrast, exposition of flies to 100 and 200 μM MeHg did not alter the survival rate.

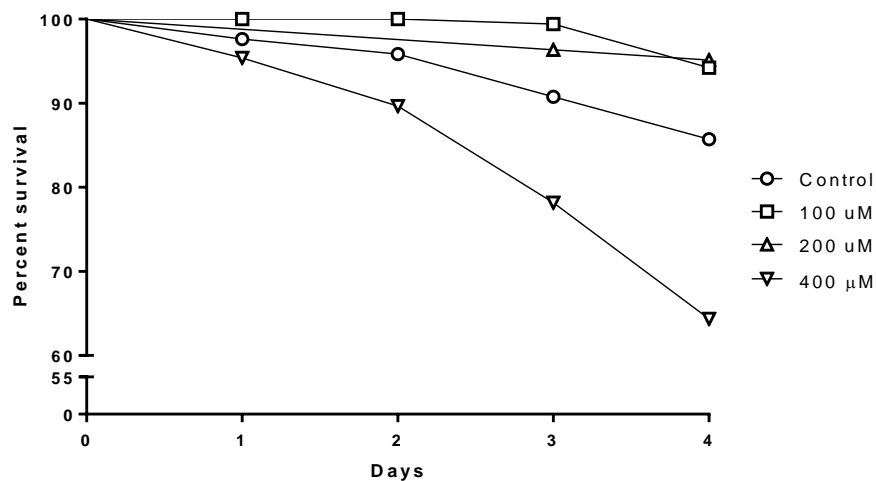


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curve of MeHg.

Flies of both genders were exposed to 1% ethanol (control group), 1 mM VCH, 200 μM MeHg, and a 1 mM VCH + 200 μM MeHg during 1 or 3 days. Logrank test for trend of Kaplan-Meier percent of survival indicated no alterations when the flies were treated with VCH and MeHg during 1 day [Chi square (1) = 1.647, $p = 0.19$] (Figure 2A). In contrast, when the time of exposure increase to 3 days, there was a significant decrease in survival of flies exposed to VCH and MeHg concomitantly (Logrank test for trend [Chi square (1) = 16.61, $p < 0.0001$]; Figures 2B).

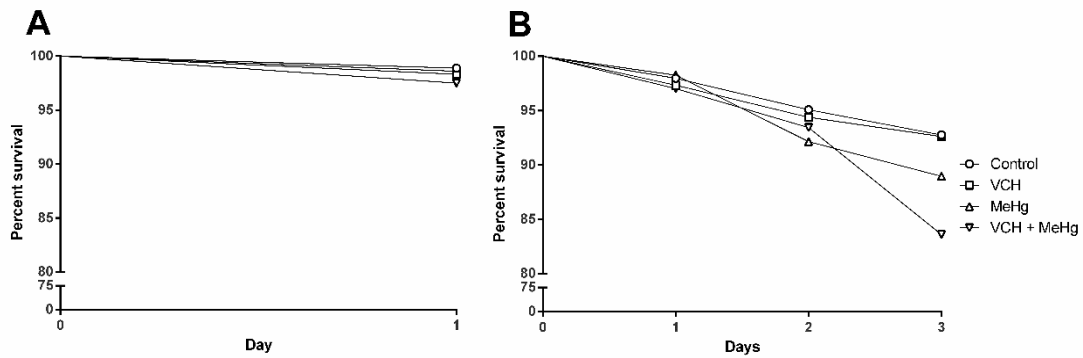


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curve after (A) 1 day and (B) 3 days exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg.

However the locomotor behavior of flies was not affected by the exposure to VCH and/or MeHg (Figure 3A and 3B).

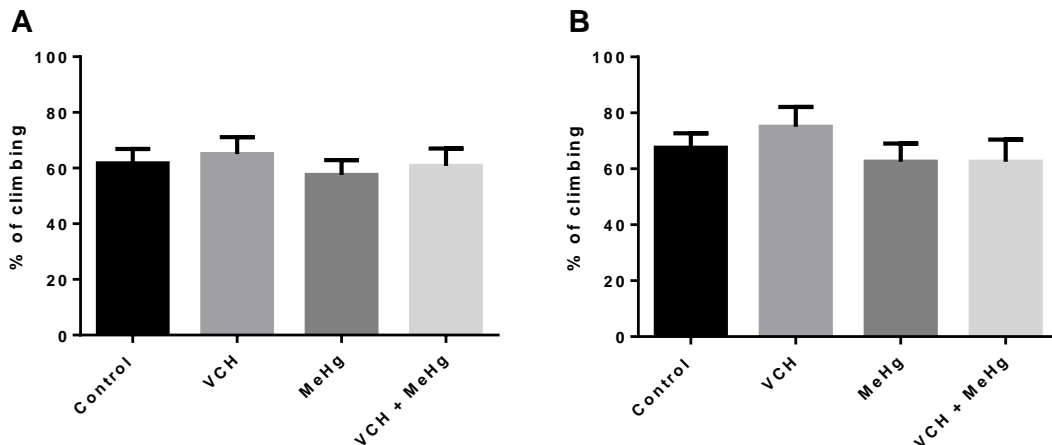
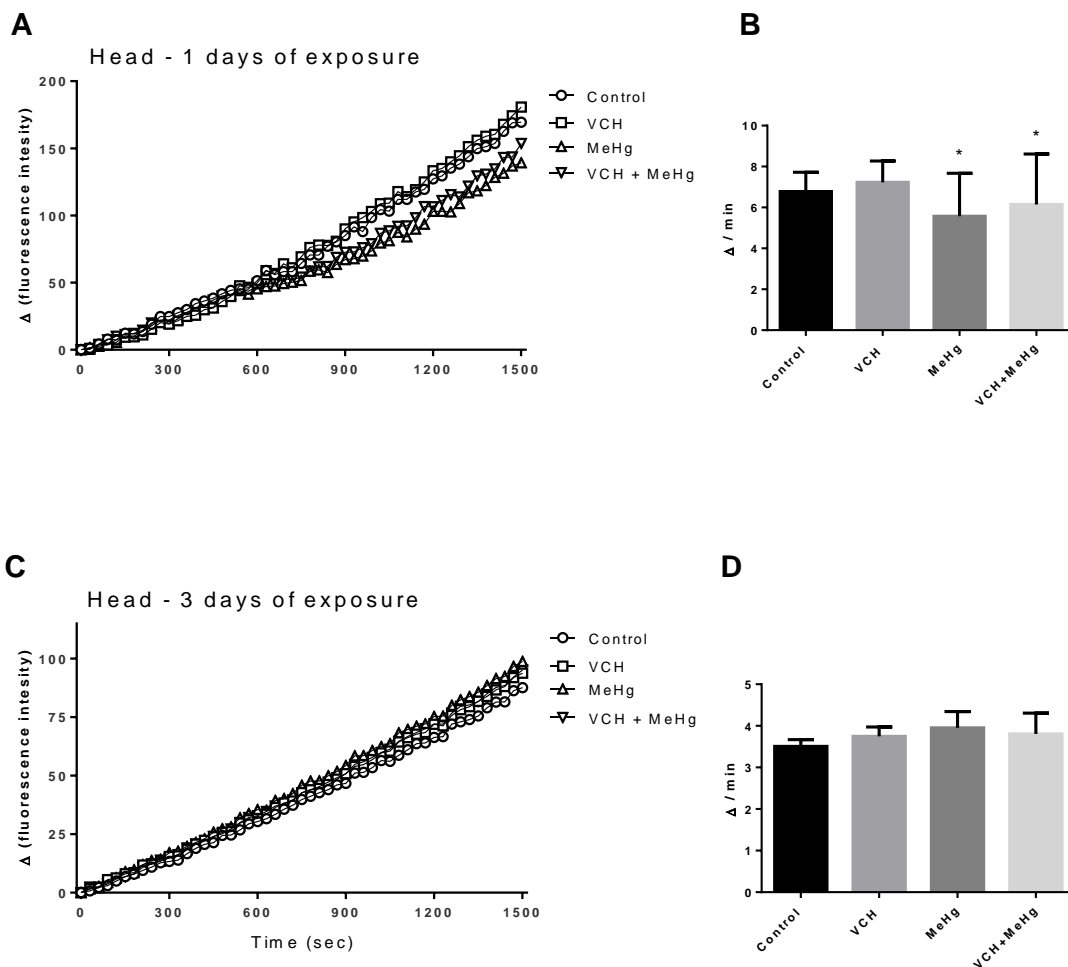


Fig. 3. Climbing rate after (A) one day or (B) three days of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg.

In relation to DCFH oxidation, the between-subjects part of the four-way ANOVA revealed a significant interaction between MeHg x age in the head of flies. The interaction was significant because after one day of treatment MeHg tended to decrease the oxidation of DCFH in the head, whereas MeHg increased it after 3 days of exposure [$F(1,88) = 4.96$, $p < 0.03$ (Figure 4 and A-D and Table 2)]. The within-subjects part of the ANOVA indicated a significant MeHg x age x time of sampling interaction. The analysis of DCFH oxidation as a function of reaction time (Figures 4A and 4C) confirmed that the increase in oxidation of DCFH was decreased after 1 day of exposure to MeHg, but it was increased after 3 days of exposure in relation to control group [$F(49,4312) = 5.41$, $p < 0.001$ (Table 2)]. The main and interactions effects involving the VCH were not significant (data not shown). In the body, the multifactorial ANOVA revealed a significant third order interaction (VCH x MeHg x

age). The interaction was significant because after 1 day of exposure to VCH, MeHg or VCH + MeHg the oxidation of DCFH was increased, whereas after 3 day of exposure only the simultaneous exposure to VCH and MeHg increased the oxidation of DCFH [$F(1,88) = 4.97$; $p < 0.03$ (Figure 4 E-H and Table 2)]. The within-subjects part of the ANOVA indicated a significant fourth order interaction (time x VCH x MeHg x age). The analysis of DCFH oxidation as a function of reaction time (Figures 4E and 4G) demonstrated that the increase in oxidation of DCFH increased in all treatment tested after 1 day of exposure, but it was increased only with the simultaneous exposure to VCH and MeHg after 3 days of exposure [$F(49,4312) = 3.74$; $p < 0.001$ (Table 2)].



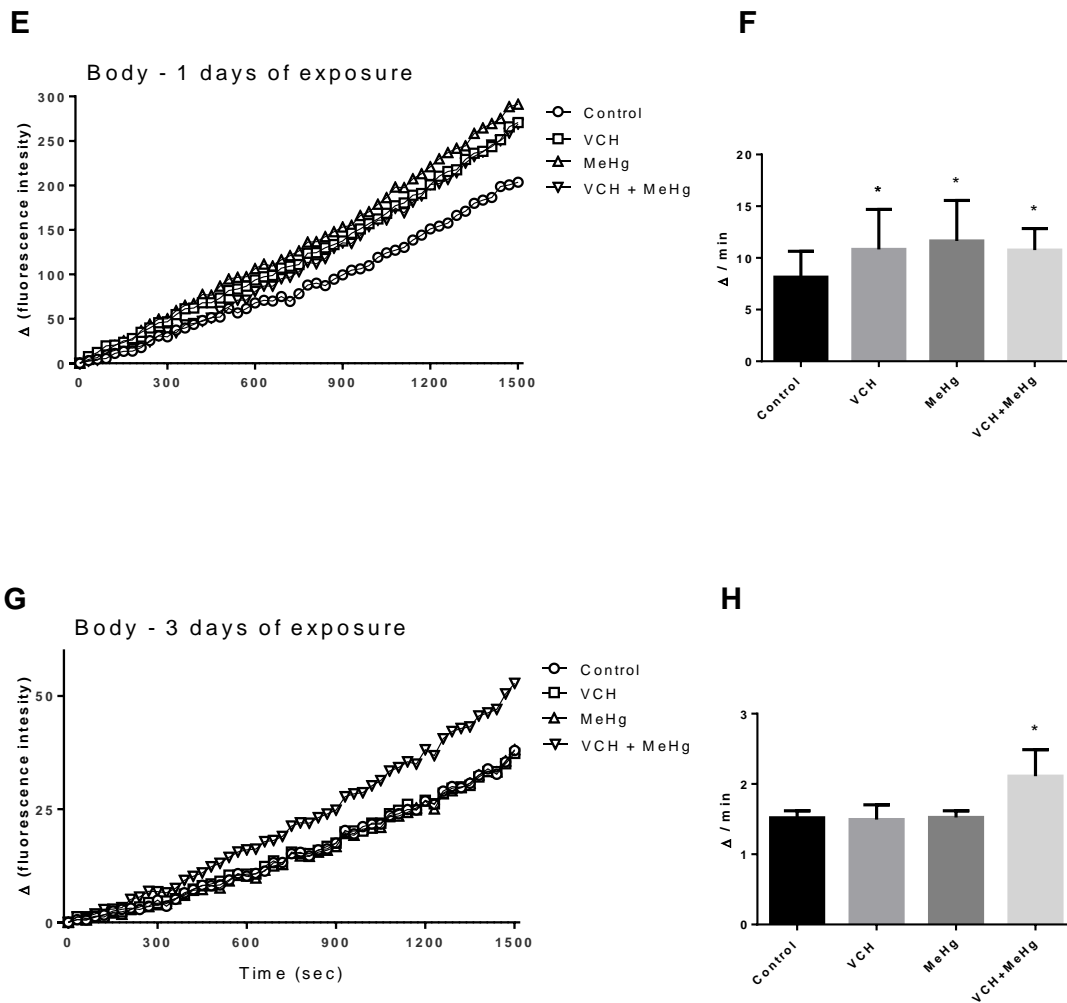


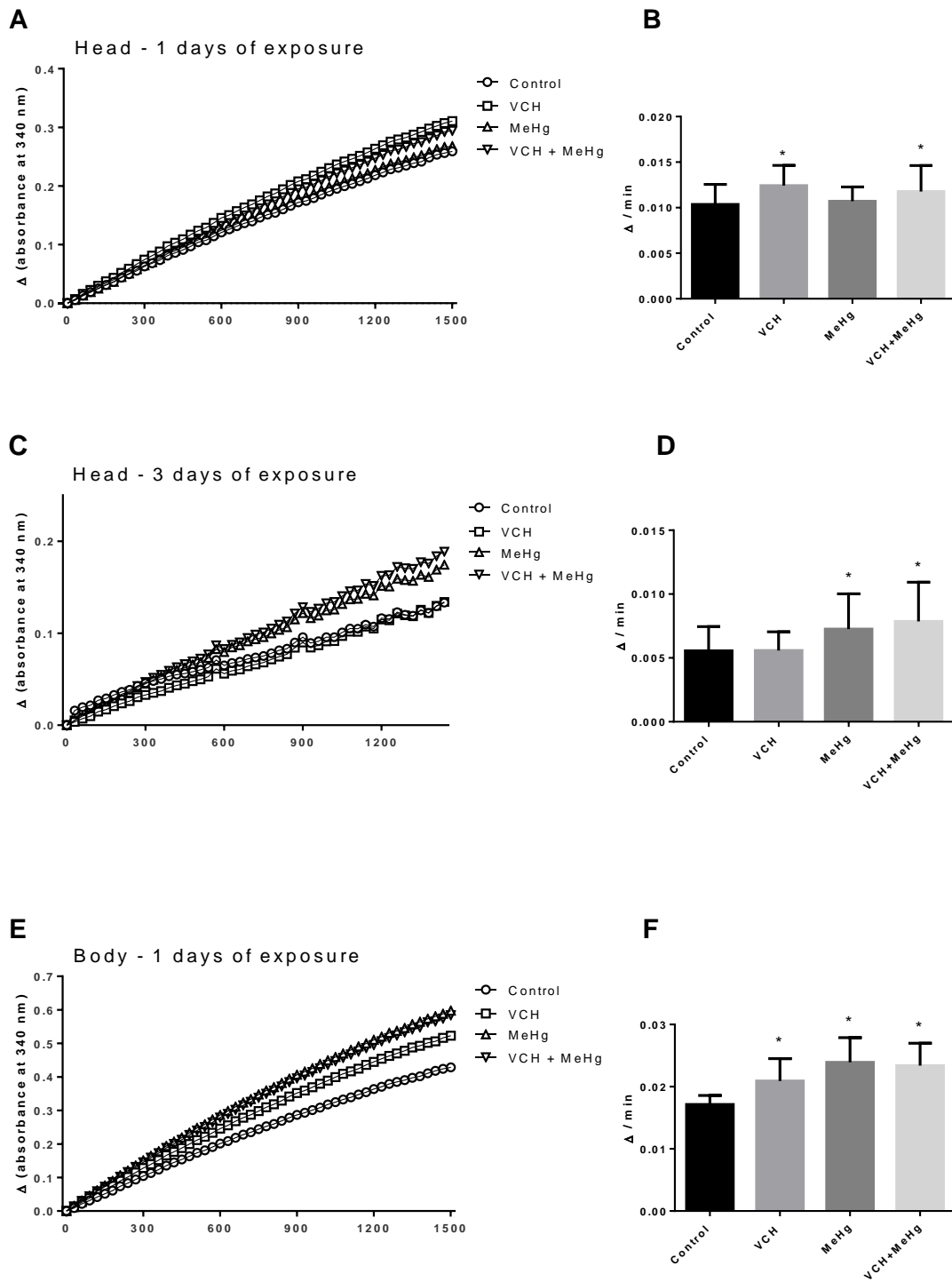
Fig. 4. DCFDA oxidation. Kinect and delta activity in the head after 1 day (A and B, respectively) and 3 days (C and D, respectively) of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg. Kinect and delta activity in the body after 1 day (E and F, respectively) and 3 days (G and H, respectively) of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg. Data are expressed as the mean in A, C, E, and G (standard error were omitted to better viewing) and mean \pm standard error in B, D, F, and H.

Table 2. Statistical analysis of DCFDA oxidation.

Tissue	Part of ANOVA	Interation	DF	F	P
Head	Between-subjects	MeHg x age	1,88	4.96	0.03
	Within-subjects	MeHg x age x time	49,4312	5.41	< 0.001
Body	Between-subjects	VCH x MeHg x age	1,88	4.97	0.03
	Within-subjects	Time x VCH x MeHg x age	49,4312	3.74	< 0.001

Regarding to GST activity in the head of flies, the between-subjects part of the four-way ANOVA revealed a significant main effect of age, because the younger flies (1 day of exposure) exhibited higher GST activity than older flies (three days of exposure) [F(1,88) =

94.78; $p < 0.001$ (Figure 5 A-D and Table 3)]. The within-subjects part of the ANOVA indicated a significant time x VCH interaction. The analysis of GST activity as a function of reaction time (Figures 5A and 5C) confirmed that the VCH increased GST activity after 1 day of exposure, but had no effect after 3 days of exposure [$F(47,4136) = 5.55$; $p < 0.001$ (Table 3)]. There was also a third order interaction (time x MeHg x age). In the body, the between-subjects part of the four-way ANOVA revealed a significant main effect of age, because the GST activity of younger flies (1 day of exposure) is higher than older flies (three days of exposure) [$F(1,88) = 300.19$; $p < 0.001$ (Figure 5 E-H and Table 3)]. There was also an interaction between VCH x MeHg in the body of flies. The interaction was significant because after one day of treatment with VCH, MeHg, and VCH + MeHg GST tended to increase activity, whereas only MeHg increased it after three days of exposure [$F(1,88) = 4.62$; $p > 0.04$ (Table 3)]. The within-subjects part of the ANOVA indicated a significant fourth order interaction (time x VCH x MeHg x age). The analysis of GST activity as a function of reaction time (Figures 5E and 5G) demonstrated an increase in GST activity in all treatment tested after 1 day of exposure, but it was increased only with the MeHg exposure after three days of exposure [$F(47, 4136) = 1.96$; $p < 0.001$ (Table 3)].



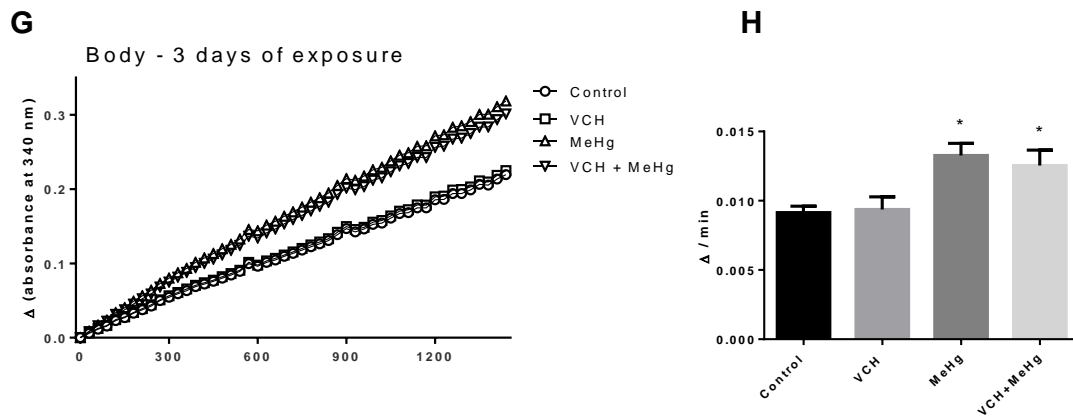


Fig. 5. Glutathione S-transferase activity. Kinect and delta activity in the head after 1 day (A and B, respectively) and 3 days (C and D, respectively) of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg. Kinect and delta activity in the body after 1 day (E and F, respectively) and 3 days (G and H, respectively) of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg. Data are expressed as the mean in A, C, E, and G (standard error were omitted to better viewing) and mean \pm standard error in B, D, F, and H.

Table 3. Statistical analysis of GST activity.

Tissue	Part of ANOVA	Interation	DF	F	p
Head	Between-subjects	Age	1,88	94.78	< 0.001
	Within-subjects	Time x VCH	47,4136	5.55	< 0.001
		Time x MeHg x age	47,4136	6.62	< 0.001
Body	Between-subjects	Age	1,88	300.19	< 0.001
	Within-subjects	VCH x MeHg	1,88	4.62	0.03
		Time x VCH x MeHg x age	47,4136	1.96	<0,001

In relation to AChE in the head of flies, the between-subjects part of the four-way ANOVA revealed a significant main effect of age, because the AChE activity of younger flies (1 day of exposure) had lower AChE activity than older flies (three days of exposure) [$F(1,88) = 209.66$; $p < 0.001$ (Figure 6 A-D and Table 4)]. The analysis of AChE activity as a function of reaction time (Figures 6A and 6C) indicated a third order interaction (time x VCH x MeHg), because VCH tended to increase the AChE activity after 1 day of exposure, but return to basal levels after three days of exposure. In opposite, MeHg caused and increase in AChE activity after 3 days of exposure, but not after 1 day of exposure [$F(19,1672) = 1.69$; $p < 0.04$ (Table 4)].

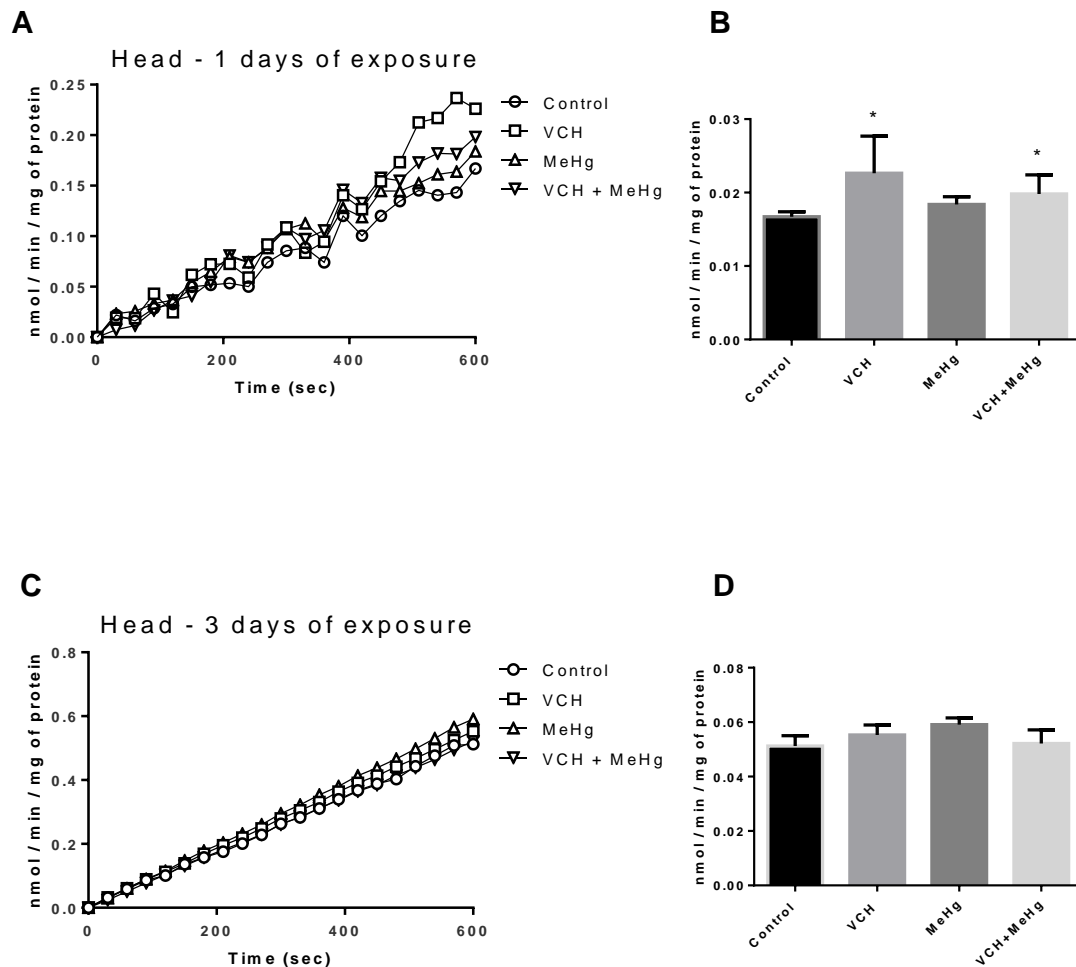


Fig. 6. Acetylcholinesterase activity. Kinect and delta activity in the head of *D. melanogaster* after one day (A and B, respectively) and three days (C and D, respectively) of exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg. Data are expressed as the mean in A and C (standard error were omitted to better viewing) and mean \pm standard error in B and D.

Table 4. Statistical analysis of AChE activity.

Tissue	Part of ANOVA	Interation	DF	F	p
Head	Between-subjects	Age	1,88	209.66	<0.001
	Within-subjects	Time x VCH x MeHg	19,1672	1.69	0.03

The expression of genes involved in oxidative stress and inflammatory response after exposition to VCH and MeHg are shown in Figures 7 to 10. Figure 7 depicts the expression of transcript factor NRF2 and Keap 1, which is an inhibitor of NRF2, in the head (Figure 7A and 7B) and the body (Figure 7C and 7D). Treatment with VCH, MeHg or VCH + MeHg for 3 days did not alter the mRNA levels of NRF2 and Keap 1 in both parts.

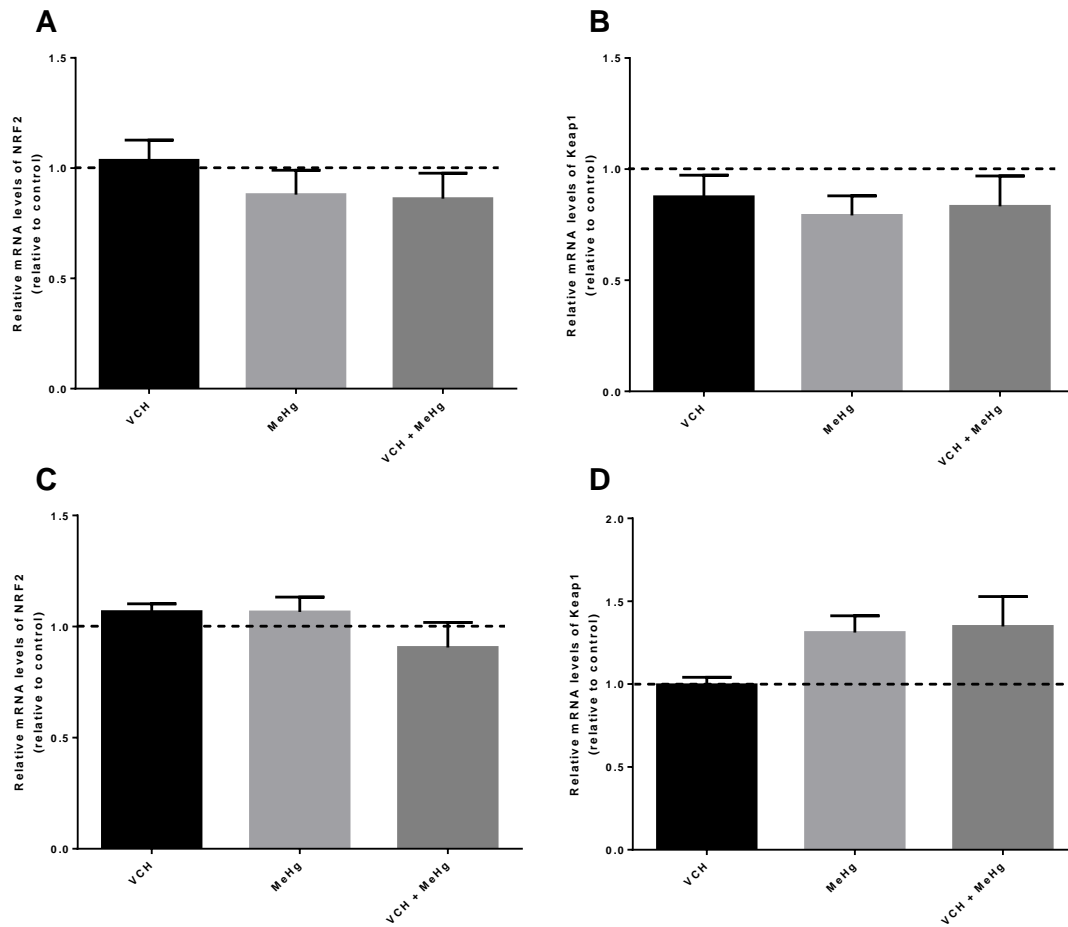


Fig. 7. Expression of the genes encoding NRF2 and Keap1. mRNA levels of NRF2 in the head (A) Keap 1 in the head (B) NRF2 in the body (C) Keap1 in the body (D) of *D. melanogaster* after exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg for three days. Data are expressed as the mean \pm standard error.

The mRNA expression of genes related to oxidative stress (Jafrac1 and TrxR1) is shown in Figure 8. Exposure to VCH, MeHg, or VCH + MeHg did not alter the Jafrac1 (Figure 8A and 8B) and TrxR1 (Figure 8C and 8D) expression in both tissues.

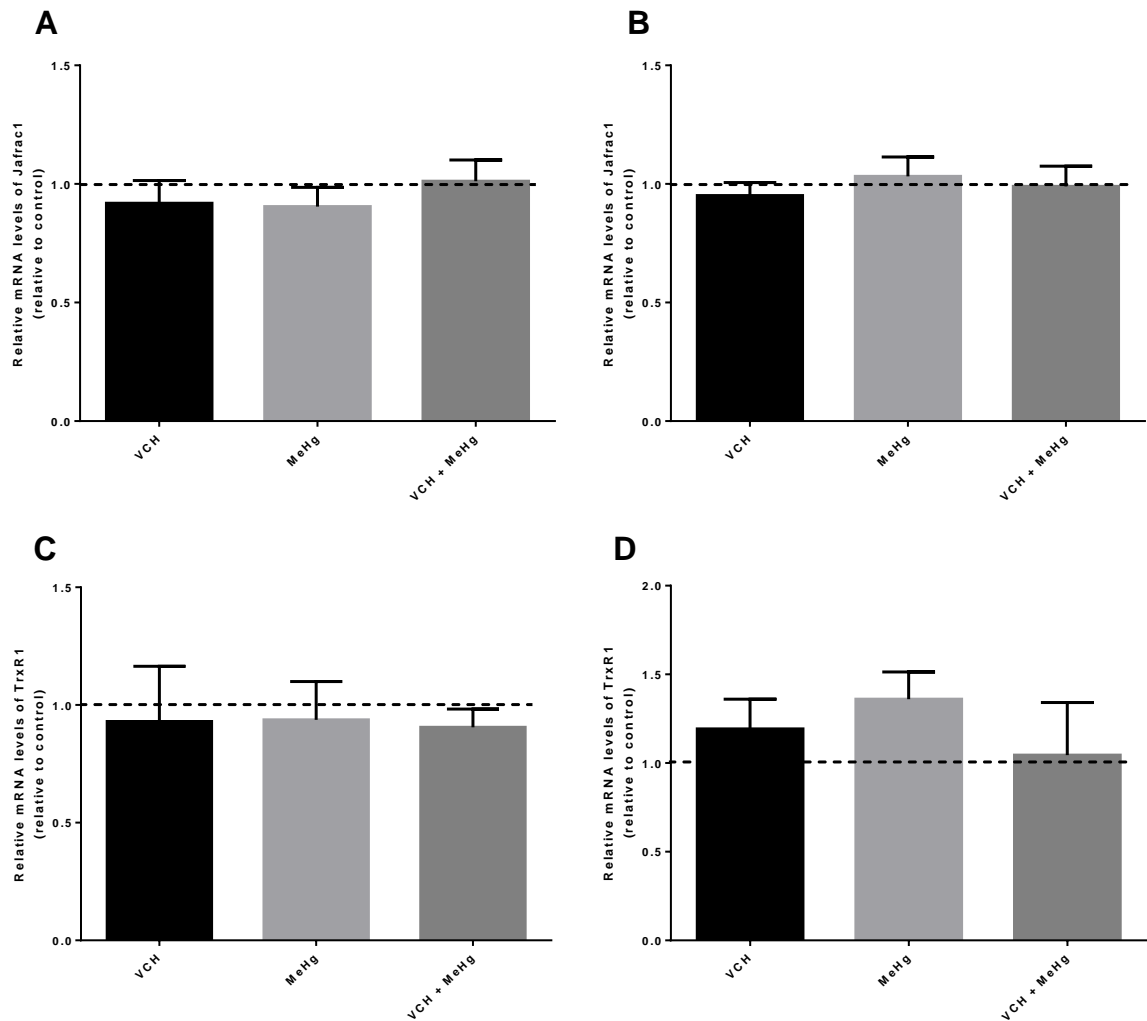


Fig. 8. Expression of the genes encoding Jafrac1 and TrxR1. mRNA levels of Jafrac1 in the head (A) and Jafrac1 in the body (B), TrxR1 in the head (C) and TrxR1 in the body (D) of *D. melanogaster* after exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg for three days. Data are expressed as the mean \pm standard error.

The mRNA levels of the two transcript factors involved in inflammatory responses, NF κ B activating protein like (Figure 9A and 9B) and Relish (Figure 9C and 9D) were evaluated. MeHg caused a significant up regulation of Relish in body of flies ($p = 0.03$).

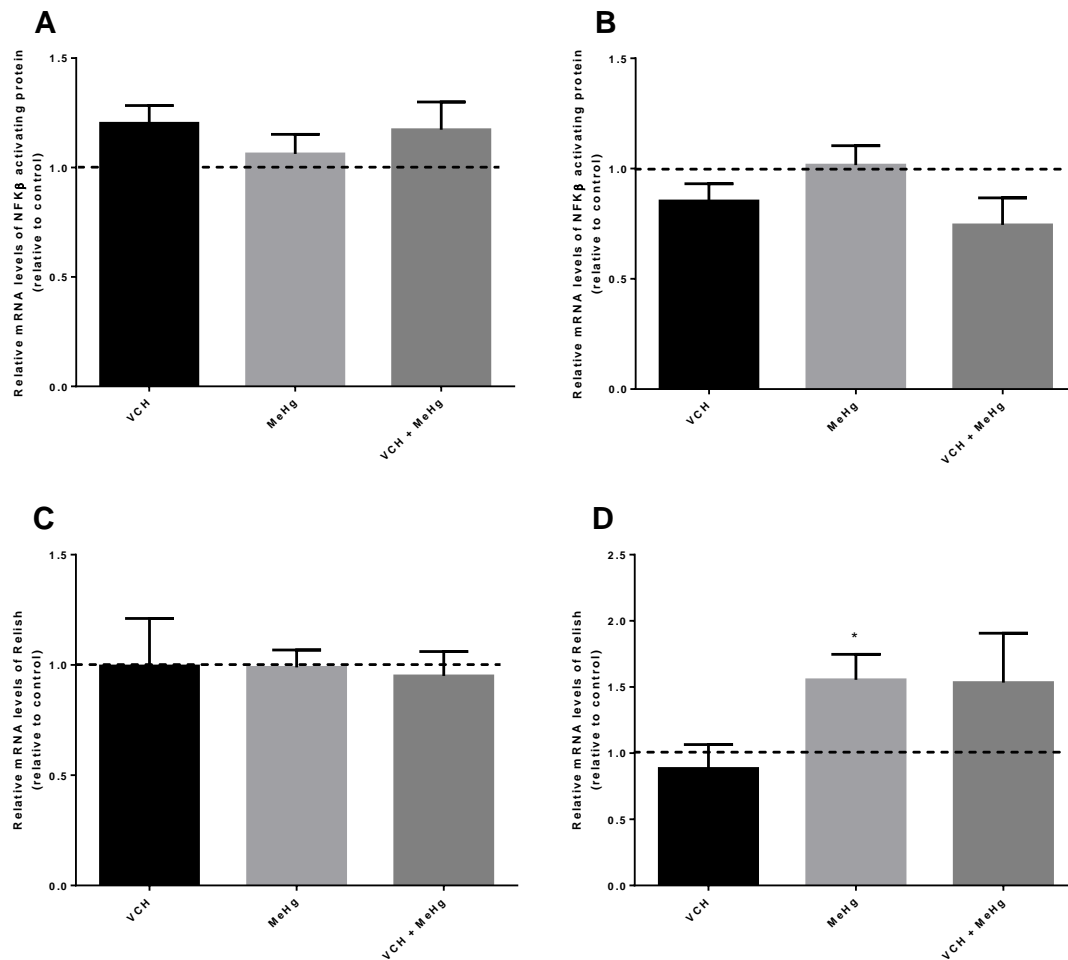


Fig. 9. Expression of the genes encoding NFκβ activating protein and Relish. mRNA levels of NFκβ activating protein in the head (A) and NFκβ activating protein in the body (B), Relish in the head (C) Relish in the body (D) of *D. melanogaster* after exposure to VCH, MeHg, and VCH + MeHg for three days. Data are expressed as the mean ± standard error.

4. Discussion

To maintain the redox status homeostasis in aerobic organisms there is a complex interplay between different classes of proteins, for instance, transcript factors, antioxidant enzymes, and electron donating molecules (Winterbourn and Hampton, 2008). Reactive oxygen or nitrogen species are formed constantly in the organism as product of physiologic reactions (Schieber and Chandel, 2014). However, xenobiotics can induce an imbalance in redox homeostasis, causing either direct damage of biomolecules or by promoting oxidative stress. Currently, humans can be exposed to complex mixtures of xenobiotic (Rand, 2010). It has been described that exposition to electrophilic xenobiotics can disrupt the cellular redox balance and change the expression of different classes of genes (Davies, 2000).

Here we observed that VCH, MeHg, and VCH + MeHg caused oxidative stress after one day of exposure in the body of the flies. In addition, the simultaneous exposure to VCH + MeHg caused oxidative stress after three days of exposure in the same tissue. These results are in accordance with previous studies where the individual exposure to MeHg or VCH increased the ROS production in different classes of animals (Abolaji et al., 2014, 2015, 2016, Mailloux et al., 2015, Yang et al., 2016, Feng et al., 2017).

Since reactive metabolites of VCH and MeHg can form adducts with proteins containing soft nucleophile center, we determine the activity of GST. GST is a family of enzymes that catalyzes phase II detoxification reactions and they conjugate reduced glutathione with electrophilic molecules (Sánchez-Gómez et al., 2016). GST is considered as a biomarker of toxicity to environmental contaminants both its activity and the expression of GST genes (Fitzpatrick et al., 1997; Lee et al., 2008; Carvalho-Neta and Abreu-Silva, 2013; Liu et al., 2015). In the head of flies, VCH caused an increase in GST activity after 1 day of exposure, while MeHg and VCH + MeHg increased it after three days of exposure. In the body, VCH, MeHg and VCH + MeHg increased the activity of this enzyme after one and MeHg and VCH + MeHg increased it after three days of exposure. GST catalyze the conjugation of VCH metabolites with GSH, preventing their interaction with target proteins (Abolaji et al., 2014, 2016). Similar process of detoxification can occur with GSH and MeHg (Roy et al., 2017). Here, we observed a complex pattern of changes in the total GST activity, which depended on the tissue, the type of chemical and time of exposure. However, the enzyme activity tended to increase after exposure to VCH and MeHg.

Previously, we and other laboratories have indicated that AChE can be used as biomarker of exposure to xenobiotics (da Silva et al., 2006, Moraes-Silva et al., 2014, Kwiatkowska et al., 2014, Kim et al., 2014). Preceding studies have demonstrated the inhibition of AChE after exposure to MeHg in flies, cockroaches, and rats (Adedara et al. 2016, Wootten et al., 1985, Han et al., 2017) and after exposure to VCH in flies (Abolaji et al., 2014), but here we did not observe inhibition of the enzyme. Inhibition of AChE activity can be associated with impairments in fly locomotion (Abolaji et al., 2014, 2015). Accordingly, here the behavior of the flies was not modified and the enzyme was not inhibited.

Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) is a protein that repress the translocation of the transcript factor NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) to the nucleus (Dinkova-Kostova et al., 2002). The protein encoded by KEAP1 gene has vicinal thiol groups and the cysteinyl residues can be oxidized by electrophiles. The oxidation of these critical residues abolish the

repression of Nrf-2 that is translocated to the nucleus. Once in the nucleus, Nrf-2 binds to the antioxidant response element (ARE) then stimulating the expression of stress-responsive genes (Motohashi and Yamamoto, 2004). In *Drosophila melanogaster* this mechanism is similar to the one that operates in mammals, and NRF2 is named CncC orthologous, which is part of the transcript factor family called Cap'n'collar (Chatterjee et al., 2016; Pitoniak and Bohmann, 2015). The gene CG3962 encodes a Kelph protein, which is similar to Keap1. (Sykiotis and Bohmann, 2008). Here, the NRF2 and KEAP1 genes expression was not altered after exposure to VCH and MeHg after three days. In rodents, GST expression is controlled by ARE (Motohashi and Yamamoto, 2004). Since the GST activity was increased by MeHg or VCH, we expected to find an increase in the expression of NRF2 and KEAP1. However, their expression did not differ from control flies. It is possible that the expression of GST is not under control of Nrf2-ARE or that the changes in mRNA levels do not parallel the enzyme activity.

Peroxiredoxins are a family of enzymes that reduce H_2O_2 or organic peroxides to H_2O or R-OH, respectively (Orr et al., 2013). *D. melanogaster* has seven peroxiredoxins including Jafrac1 that is homolog to Prx2 of mammals (Lee et al., 2007). In this study, the Jafrac1 gene expression was not altered by the exposure to VCH and MeHg for three days. In the same direction, thioredoxin (Trx) are a family of small proteins that has in their structure redox active thiol groups, which can donate reducing equivalents to different proteins. The oxidation of reduced Trx [$Trx(-SH)_2$] forms the oxidized Trx [$Trx(S)_2$] that can be reduced again by the NADPH-dependent thioredoxin reductase (TrxR) restoring the Trx [$Trx(-SH)_2$] (Norberg and Arnér, 2001). Here, the mRNA levels of TrxR were not altered.

In order to understand whether simultaneous exposure to VCH and MeHg could activate some inflammatory response, we analyze the mRNA levels of NF- κ B activating protein (NKAP) and Relish. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) comprehends an ubiquitous dimers family which regulates the expression of a large number of genes involved in immune regulation, inflammatory responses, and anti-apoptotic effects (Karin and Ben-Neriah, 2000). In the present study, MeHg induced an upregulation of Relish gene in the body of the flies after three days of exposure. In *D. melanogaster* three NF- κ B/Rel proteins have been identified, e.g., Relish, Dif, and Dorsal (Ghosh et al., 1998; Chen et al., 2003). The NF- κ B/Rel proteins of *Drosophila* are selectively activated by exogenous environmental factors; here we observed an upregulation of Relish mRNA in the body of flies exposed to MeHg for 3 days. Since Relish is involved in the inflammatory process in flies, we can speculate that MeHg may activate some inflammatory response via this route. Of particular importance, a recent

study has demonstrated an early activation of pro-inflammatory genes (Egr, reaper, hld, pvf1, upd3, and Socs36E) in flies exposed to concentrated ambient material particulate 2.5 (Wang et al., 2017).

5. Conclusion

The results presented here indicate that, as role, VCH and MeHg did not potentiate the isolated effects in different end-points of toxicity. In general MeHg modified more endpoints than VCH, which is in accordance with its high electrophilicity. The results presented demonstrated that the gene Relish can be a good candidate to be used as an early molecular marker of MeHg toxicity. We suggest investigate more genes related to oxidative stress and inflammatory response as possible toxicity markers. The development and standardization of biomarkers of exposure to detect early toxicological changes induced by low concentration of toxic agents is extremely important to predict and prevent chronic exposition effects.

References

- Abolaji, A.O., Kamdem, J.P., Lugokenski, T.H., Nascimento T.K., Waczuk, E.P., Farombi, E.O., Loreto, É.L., Rocha, J.B.T., 2014. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, 99-108.
- Abolaji, A.O., Kamdem, J.P., Lugokenski, T.H., Farombi, E.O., Souza, D.O., da Silva Loreto, É.L., Rocha, J.B.T., 2015. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biol.*, 5, 328–339.
- Abolaji, A.O., Toloyai, P.E., Odeleye, T.D., Akinduro, S., Rocha, J.B.T., Farombi, E.O., 2016. Hepatic and renal toxicological evaluations of an industrial ovotoxic chemical, 4-vinylcyclohexene diepoxide, in both sexes of Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 45, 28-40.
- Adedara, I. A., Rosemberg, D. B., Souza, D. O., Farombi, E. O., Aschner, M., Rocha, J. B. T. R., 2016. Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 42, 243-251.
- Baird C., Cann M., editors. *Environmental Chemistry*. New York: W.H. Freeman; 2004.
- Bassett, M.H., McCarthy, J.L., Waterman, M.R., Sliter, T.J., 1997. Sequence and developmental expression of Cyp18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 131, 39–49.
- Branco, V., Canario, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2012. Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. Med.*, 52, 781–793.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2017. Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Arch. Toxicol.*, 91, 63-81.

- Carvalho-Neta, R.N.F., Abreu-Silva, A.L., 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. *Lat. Am. J. Res.*, 41, 217-225.
- Castellano, S., Morozova, N., Morey, M., Berry, M.J., Serras, F., Corominas, M., Guigó, R., 2001. In silico identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *Sci. Rep.* 2, 697-702.
- Chatterjee, N., Tian, M., Spirohn, K., Boutros, M., Bohmann, D., 2016. Keap1-independent regulation of Nrf2 activity by protein acetylation and a BET bromodomain protein. *PLoS Genet.*, 12, 1–20.
- Chen, D., Li, Z., Yang, Q., Zhang, J., Zhai, Z., Shua, H-B., 2003. Identification of a nuclear protein that promotes NF- κ B activation *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 310, 720–724.
- da Silva, A.P., Meotti, F.C., Santos, A.R., Farina, M., 2006. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *Neurotoxicology*, 27, 1101-1105.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279–289.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P., 2002.¶ Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 11908–11913.
- Doerr-Stevens, J.K., Liu, J., Stevens, G.J., Kraner, J.C., Fontaine, S.M., Halpert, J.R., Sipes, I.G., 1999. Induction of cytochrome p-450 enzymes after repeated exposure to 4-vinylcyclohexene in B6C3F1 mice. *Drug Metab. Disp.*, 27, 281-287.
- Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T., 2007. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J. Neurol. Sci.*, 262, 131-144.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andress, J.R.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B.T. 2011. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 405-417.
- Feng, S., Xu, Z., Wang, F., Yang, T., Liu, W., Deng, Y., Xu, B., 2017. Sulforaphane prevents methylmercury-induced oxidative damage and excitotoxicity through activation of the Nrf2-ARE pathway. *Mol. Neurobiol.*, 54, 375-391.
- Fitzpatrick, P. J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2, 51-56.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 225–60.
- Golombieski, R.M., Graichen, D.A.S., Pivetta, L.A., Nogueira, C.W., Loreto, E.L.S., Rocha, J.B.T., 2008. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] inhibits *Drosophila melanogaster* δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) gene transcription and enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 198–204.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130–7140.
- Han, J., Yang, X., Chen, X., Li, Z., Fang, M., Bai, B., Tan, D., 2017. Hydrogen sulfide may attenuate methylmercury-induced neurotoxicity via mitochondrial preservation. *Chem. Biol. Interact.*, 1, 66-73.
- Hirosawa-Takamori, M., Jäckle, H., Vorbrüggen, G., 2000 The class 2 selenophosphate synthetase gene of *Drosophila* contains a functional mammalian-type SECIS. *EMBO Rep.*, 1, 441-446.

- Horowitz, H.M., Jacob, D.J., Amos, H.M., Streets, D.G., Sunderland, E.M., 2014. Historical mercury releases from commercial products: global environmental implications. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10242-10250.
- Huff, J., 2001. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexene diepoxide, and 4-vinylcyclohexene. *Toxicol. Sci.*, 64, 282-283.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 621-663.
- Karri, V., Schuhmacher, M., Kumar, V., 2016. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 48, 203-213.
- Kim, Y.H., Kwon, D.H., Ahn, H.M., Koh, Y.H., Lee, S.H., 2014. Induction of soluble AChE expression via alternative splicing by chemical stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 48:75-82.
- Kwiatkowska, M., Nowacka-Krukowska, H., Bukowska, B., 2014. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 37, 1101-1108.
- Lee, W., Choi, K.S., Riddell, J., Ip, C., Ghosh, D., Park, J.H., Park, Y.M., 2007. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: The unique presence of Cys83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *J. Biol. Chem.*, 282, 22011-22022.
- Lee, K., Raisuddin, S., Rhee, J., Hwang, D., Yu, I.T., Lee, Y., Park, H.G., Lee, J., 2008. Expression of glutathione *S*-transferase (*GST*) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.*, 89, 158-166.
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y., 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione *S*-transferase from *Mytilus coruscus*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 118, 47-54.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, 25, 402-408.
- Mailloux, R.J., Yumvihoze, E., Chan, H.M., 2015. Superoxide produced in the matrix of mitochondria enhances methylmercury toxicity in human neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 15, 371-380.
- Moraes-Silva, L., Siqueira, L.F., Oliveira, V.A., Oliveira, C.S., Ineu, R.P., Pedroso, T.F., Fonseca, M.M., Pereira, M.E., 2014. Preventive effect of CuCl₂ on behavioral alterations and Mercury accumulation in central nervous system induced by HgCl₂ in newborn rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 28, 328-335.
- Motohashi, H., Yamamoto, M., 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.*, 10, 549-557.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.*, 31, Issue 11, 1287-1312.
- NTP (National Toxicology Program), 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide (CAS No. 106-87-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (dermal studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.*, 362, 1-249.
- Orr, W.C., Radyuk, S.N., Sohal, R.S., 2013. Involvement of redox state in the aging of *Drosophila melanogaster*. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 788-803.
- Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Ríos, C., Segovia, J., 2004. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's Disease mutation. *Neurochem. Res.*, 29, 729-733.
- Pitoniak, A., Bohmann, D., 2015. Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radic. Biol. Med.*, 88, 302-313.

- Rand, M.D., 2010. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.*, 32, 74–83.
- Reiter L. T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskow, M.; Bier, E., 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 11, 1114–1125.
- Roy, G., Banerjee, M., Karri, R., Chalana, A., Das, R, Rai, R.K., Rawat, K.S., Pathak, B., 2017. Protection of endogenous thiols against methylmercury by benzimidazole-based thione via unusual ligand exchange reactions. *Chemistry*, doi: 10.1002/chem.201605238
- Sánchez-Gómez, F.J., Díez-Dacal, B., García-Martín, E., Agúndez, J.A., Pajares, M.A., Pérez-Sala, D., 2016. Detoxifying enzymes at the cross-roads of inflammation, oxidative stress, and drug hypersensitivity: role of glutathione transferase p1-1 and aldose reductase. *Front. Pharmacol.*, 7, 237.
- Schieber, M., Chandel, N. S., 2014. ROS function in redox signaling and review oxidative stress. *Curr. Biol.*, 24, 453–462.
- Springer, L.N., McAsey, M. E., Flaws, J.A., Tilly, J.L., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 1996. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 394–401.
- Sykitotis, G.P., Bohmann, D., 2008. Keap1/Nrf2 Signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 14, 76–85.
- Wang, X., Chen, M., Zhong, M., Hu, Z., Qiu, L., Rahagopalan, S., Fossett, N.G., Chen, L., Ying, Z., 2017. Exposure to Concentrated Ambient PM_{2.5} Shortens Lifespan and Induces Inflammation-Associated Signaling and Oxidative Stress in *Drosophila*. *Toxicol. Sci.*, 1-9.
- Winterbourn, C. C.; Hampton, M. B., 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 45, 549–561.
- Wooten, V., Brown, D.R., Callahan, B.G., Vetrano, K., Wadman, P., Melia, J., Mulligan, T., Schatz, R.A., 1985. Behavioral and biochemical alterations following in utero exposure to methylmercury. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7, 767-773.
- Yang, T., Xu, Z., Liu, W., Feng, S., Li, H., Guo, M., Deng, Y., Xu, B., 2016. Alpha-lipoic acid reduces methylmercury-induced neuronal injury in rat cerebral cortex via antioxidation pathways. *Environ. Toxicol.*, doi: 10.1002/tox.22294

4 CONCLUSÕES

- Neste estudo, a exposição concomitante de moscas a pequenas doses de VCH e MeHg aumentaram a mortalidade e induziram estresse oxidativo, como indicado pelo aumento na produção de espécies reativas no corpo das moscas nos dois períodos de exposição estudados sugerindo um efeito da interação entre os compostos.

- Houve aumento da atividade da enzima glutationa S-transferase na cabeça das moscas pela exposição individual ao VCH, após um dia de tratamento, e MeHg, após três dias de tratamento. No corpo, somente o MeHg induziu aumento na atividade desta enzima. Estes resultados sugerem uma ativação do mecanismo de detoxificação, principalmente induzida pelo MeHg.

- Não houve alteração na atividade da AChE na cabeça das moscas nos dois períodos de exposição testados.

- A exposição ao MeHg mostrou modular genes relacionados a resposta inflamatória. Enquanto que a exposição individual ao MeHg causou aumento na expressão do gene Relish. Deste modo, a modulação da expressão gênica pode ser um bom indicador precoce de exposição a agentes tóxicos.

- Mesmo com alterações nos marcadores bioquímicos e moleculares, o desempenho locomotor não foi alterado com a exposição ao VCH e ao MeHg.

- Sendo assim, mais estudos sobre a interação de compostos tóxicos assim como os mecanismos envolvidos na sua toxicidade são necessários a fim de se detectar precocemente alterações causadas pelos xenobióticos, evitando danos irreversíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLAJI, A. O.; KAMDEM, J. P.; LUGOKENSKI, T. H.; NASCIMENTO, T. K.; WACZUK, E. P.; FAROMBI, E. O.; LORETO, É. L.; ROCHA, J. B. T. **Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster***. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 71, p.99-108, 2014.

ABOLAJI, A. O.; KAMDEM, J. P.; LUGOKENSKI, T. H.; FAROMBI, E. O.; SOUZA, D. O.; DA SILVA LORETO, É. L.; ROCHA, J. B. **Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster***. *Redox Biology*, v. 5, p. 328–339, 2015.

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F.; GEORGE, R. A.; LEWIS, S. E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S. N.; SUTTON, G. G.; WORTMAN, J. R.; YANDELL, M. D.; ZHANG, Q.; CHEN, L. X.; BRANDON, R. C.; ROGERS, Y. H.; BLAZEJ, R. G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B. D.; WAN, K. H.; DOYLE, C.; BAXTER, E. G.; HELT, G.; NELSON, C. R.; GABOR, G. L.; ABRIL, J. F.; AGBAYANI, A.; AN, H. J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R. M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E. M.; BEESON, K. Y.; BENOS, P. V.; BERMAN, B. P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M. R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K. C.; BUSAM, D. A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J. M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L. B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A. D.; DEW, I.; DIETZ, S. M.; DODSON, K.; DOUP, L. E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B. C.; DUNN, P.; DURBIN, K. J.; EVANGELISTA, C. C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A. E.; GARG, N. S.; GELBART, W. M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J. H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T. J.; HERNANDEZ, J. R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K. A.; HOWLAND, T. J.; WEI, M. H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.;

KALUSH, F.; KARPEN, G. H.; KE, Z.; KENNISON, J. A.; KETCHUM, K. A.; KIMMEL, B. E.; KODIRA, C. D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A. A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T. C.; MCLEOD, M. P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N. V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S. M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D. M.; NELSON, D. L.; NELSON, D. R.; NELSON, K. A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D. R.; PACLEB, J. M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G. S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M. G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R. D.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE B. C.; SIDÉN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M. P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A. C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A. H.; WANG, X.; WANG, Z. Y.; WASSARMAN, D. A.; WEINSTOCK, G. M.; WEISSENBACH, J.; WILLIAMS, S. M.; WOODAGE, T.; WORLEY, K. C.; WU, D.; YANG, S.; YAO, Q. A.; YE, J.; YEH, R. F.; ZAVERI, J. S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X. H.; ZHONG, F. N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H. O.; GIBBS, R. A.; MYERS, E. W.; RUBIN, G. M.; VENTER, J. C. **The genome sequence of *Drosophila melanogaster***. *Science*, v. 287, p. 2185–2195, 2000.

ADEDARA, I. A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; FAROMBI, E. O.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. **Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea***. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 243-251, 2016.

ASCHNER, M. **Brain, kidney and liver ^{203}Hg -methyl mercury uptake in the rat: relationship to the neutral amino acid carrier**. *Basic Clinic Pharmacology and Toxicology*, v. 65, p. 17–20, 1989.

AZEVEDO, B. F.; FURIERI, L. B.; PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; VASSALLO, P. F.; SIMÕES, M. R.; FIORIM, J.; DE BATISTA, P. R.; FIORESI, M.; ROSSONI, L.; STEFANON, I.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V. **Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems**. *Journal of Biomedicine and biotechnology*. Espírito Santo, p. 1-11, 2012.

BAEUERLE, P. A.; BAICHWAL, V. R. **NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules**. *Advances in Immunology*, v. 65, p. 111–137, 1997.

BALDWIN, A. S. **The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights**. *Annual Review in Immunology*, v. 14, p. 649–681, 1996.

BARNES, P. J.; KARIN, M. **Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases**. *The New England Journal Medicine*, v. 336, p. 1066–1071, 1997.

BHATTACHARYA, P.; KEATING, A. F. **Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 261 p. 227–235, 2012.

BISEN-HERSHA, E. B.; FARINA, M.; BARBOSA, F. J.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. **Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 28, p. 117–124, 2014.

BRANCO, V.; CANÁRIO J.; LU, J.; HOLMGREN, A.; CARVALHO, C. **Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, p. 781–793, 2012.

BRAND, M. **The sites and topology of mitochondrial superoxide production.** *Experimental Gerontology*, v. 45, p. 466–472, 2010.

BRANDÃO, F.; CAPPELLO, T.; RAIMUNDO, J.; SANTOS, M. A.; MAISANO, M.; MAUCERI, A.; PACHECO, M.; PEREIRA, P. **Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress.** *Metallomics*, v. 7, p. 1352-1363, 2015.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. **Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues.** *Archives of Toxicology*, v. 91, p. 63-81, 2016.

CANNADY, E. A.; DYER, C. A.; CHRISTIAN, P. J.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. **Expression and activity of microsomal epoxide hydrolase in follicles isolated from mouse ovaries.** *Toxicological Sciences*, v. 68, n. 1, p. 24–31, 2002.

CARR, M. C. **The emergence of the metabolic syndrome with menopause.** *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 88, p. 2404–2411, 2003.

CASTELLANO, S.; MOROZOVA, N.; MOREY, M.; BERRY, M. J.; SERRAS, F.; COROMINAS, M.; GUIGÓ, R. **In silico identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome.** *Scientific Reports*, v. 2, p. 697-702, 2001.

CHEN, D.; LI, Z.; YANG, Q.; ZHANG, J.; ZHAI, Z.; SHUA, H-B. **Identification of a nuclear protein that promotes NF- κ B activation** *Biochem. Biophysical Research Communications*, v. 310, p. 720–724, 2003.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. **The Toxicology of Mercury – Current Exposures And Clinical Manifestations.** *The New England Journal of Medicine*. Rochester, v. 349, p. 1731-1737, 2003.

ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D.; BONDŽIĆ. **Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology.** *Current Neuropharmacology*, v. 11, p. 312-335, 2013.

COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. **Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sedimentt.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 50, p. 498-502, 1985.

COSTA, L. G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. P. **Developmental neuropathology of environmental agents.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, p. 87-110, 2004.

CROSS, C. E. **Oxygen radicals and human disease.** *Annals of Internal Medicine*, v. 107, p. 526–545, 1987.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. **Mechanisms of free radical-induced damage to DNA.** *Free Radical Research*, v. 46, p. 382–419, 2012.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. **Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 256, p. 405–417, 2011.

FARINA, M.; FARINA, M.; AVILA, D. S.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. **Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury.** *Neurochemistry International*, v. 62, p. 575–594, 2013.

FITSANAKIS, V. A.; ASCHNER, M. **The importance of glutamate, glycine, and γ -aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 204, p. 343–354, 2005.

FRANCO J L.; TEIXEIRA, A.; MEOTTI, F. C.; RIBAS, C. M.; STRINGARI, J.; GARCIA POMBLUM, S. C.; MORO, A. M.; BOHRER, D.; BAIROS, A. V.; DAFRE, A. L.; SANTOS, A. R.; FARINA, M. **Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury.** *Environmental Research*, v. 102, p. 122–28, 2006.

FUJIYAMA, J.; HIRAYAMA, K.; YASUTAKE, A. **Mechanism of methylmercury efflux from cultured astrocytes.** *Biochemical Pharmacology*, v. 47, p. 91525–1530, 1994.

GABRIELLE, P.; JEANA, M.; LORENZA, E. C. **Cytosolic choline acetyltransferase binds specifically to cholinergic plasma membrane of rat brain synaptosomes to generate membrane-bound enzyme.** *Neurochemical Research*, v. 28, p. 543-549, 2003.

GAZARYAN, I. G.; THOMAS, B. **The status of Nrf2-based therapeutics: current perspectives and future prospects.** *Neural Regeneration Research*, Nov; v. 11, p. 1708–1711, 2016.

GRANDJEAN, P.; HERZ, K. T. **Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans.** *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, v. 78, p. 107–118, 2011.

HAN, J.; YANG, X.; CHEN, X.; LI, Z.; FANG, M.; BAI, B.; TAN, D. **Hydrogen sulfide may attenuate methylmercury-induced neurotoxicity via mitochondrial preservation.** *Chemico- Biological Interactions*, v. 1, p. 66-73, 2017.

HATFIELD, D. L.; TSUJI, P. A.; CARLSON, B. A.; GLADYSHEV, V. N. **Selenium and selenocysteine: Roles in cancer, health, and development.** *Trends in Biochemical Science*, v. 39, p. 112-120, 2014.

HINTELMANN, H. **Organomercurials. Their formation and pathways in the environment.** *Metal Ions in Life Sciences*, v. 7, p. 365–401, 2010.

HIROSAWA-TAKAMORI, M.; JÄCKLE, H.; VORBRÜGGEN, G. **The class 2 selenophosphate synthetase gene of *Drosophila* contains a functional mammalian-type SECIS.** EMBO Reports, v. 1, p. 441-446, 2000.

HU, X.; ROBERTS, J. R.; APOPA, P. L.; KAN, Y. W.; MA, Q. **Accelerated ovarian failure induced by 4-vinyl cyclohexene diepoxide in Nrf2 null mice.** Molecular and Cellular Biology, v. 26, p. 940-954, 2006.

HUFF, J. **Carcinogenicity Bioassays of Bisphenol A, 4-Vinylcyclohexene Diepoxide, and 4-Vinylcyclohexene.** Toxicological Sciences, v. 64, p. 281-284, 2001.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.** Science, v. 327, p. 291-295, 2010.

JOHANSSON C.; CASTOLDI, A. F.; ONISHCHENKO, N.; MANZO, L.; VAHTER, M.; CECCATELLI, S. **Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development.** Neurotoxicity Research, v. 11, p. 241-260, 2007.

KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. **4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity.** Systematic Biology Reproductive Medicine, v. 58 p. 57-62, 2012.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. **Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes.** NeuroToxicology, v. 27, p. 492-500, 2006.

KONG, X.; THIMMULAPPA, R.; CRACIUN, F.; HARVEY, C.; SINGH, A.; KOMBAIRAJU, P.; REDDY, S. P.; REMICK, D.; BISWAL, S. **Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis.** American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, v. 184, p. 928-938, 2011.

KORGE, P.; CALMETTES, G.; WEISS, J. N. **Increased reactive oxygen species production during reductive stress: the roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1847, p. 514-525, 2015.

KUMAGAI, Y.; KANDA, H.; SHINKAI, Y.; TOYAMA, T. **The Role of the Keap1/Nrf2 Pathway in the Cellular Response to Methylmercury.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2013, p. 1-8, 2013.

LAMBETH, J. D. **NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.** Nature Reviews Immunology, v. 4, p. 181-189, 2004.

MANFROI C. B.; SCHWALM, F. D.; CERESER, V.; ABREU, F.; OLIVEIRA, A.; BIZARRO, L.; ROCHA, J. B.; FRIZZO, M. E.; SOUZA, D. O.; FARINA, M. **Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system.** Toxicology Sciences, v. 81, p. 172-178, 2004.

MARSH, D. O.; TURNER, M. D.; SMITH, J. C.; ALLEN, P.; RICHDAL, N. **Fetal methylmercury study in a Peruvian fish-eating population.** Neurotoxicology, v. 16, p. 717-726, 1995.

MAYER, L. P.; PEARSALL, N. A.; CHRISTIAN, P. J.; DEVINE, P. J.; PAYNE, C. M.; MCCUSKEY, M. K.; MARION, S. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. **Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide.** *Reproductive Toxicology*, v. 16, p. 775–781, 2002.

NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, O. **The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury — effect of selenomethionine.** *Toxicology*, v. 74, p. 233–241, 1992.

OLIVEIRA, C. S.; PICCOLI, B. C.; ASHNER, M.; ROCHA, J. B. T. **Chemical speciation of selenium and mercury as determinant of their neurotoxicity.** *Advances in neurobiology*, under review.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. **Human disease models in drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery.** *Pharmacological Reviews*, v. 63, p. 411–436, 2011.

POHANKA, M. **Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review.** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 22, p. 871–886, 2012.

RAJAPAKSA, K. S. **The role of ovarian metabolism in 4-vinylcyclohexene metabolites and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovotoxicity in mice.** Department of Physiology, University of Arizona. Dissertation, 2007.

RASTOGI, V.; SANTIAGO-MORENO, J.; DORÉ, S. **Ginseng: a promising neuroprotective strategy in stroke.** *Frontiers in Cell Biology*, v. 8, p. 1–13, 2015.

REITER L. T.; POTOCKI, L.; CHIEN, S.; GRIBSKOW, M.; BIER, E. **A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster.** *Genome Research*, v. 11, p. 1114–1125, 2001.

RHEE, S. **Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling.** *Science*, v. 312, p. 1882–1883, 2006.

RIZZO, A.; ROSCINO, M. T.; BINETTI, F.; SCIORSCI, R. L. **Roles of reactive oxygen species in female reproduction.** *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.

ROCHA, J. B. T.; PICCOLI, B. C.; OLIVEIRA, C. S. **Biological and chemical interest in selenium: a brief historical account.** *Arkivoc*, 2017, DOI 10.3998/ark.5550190.p009.784

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. **ROS function in redox signaling and review oxidative stress.** *Current Biology*, v. 24, p. 453–462, 2014.

SIEBENLIST, U.; FRANZOSO, G.; BROWN, K. **Structure, regulation and function of NF- κ B.** *Annual Review in Cellular Biology*, v. 10, p. 405–455, 1994.

SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** *Experimental Physiology*, v. 82, p. 291–295, 1997.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. **Acetylcholinesterase: how is structure related to function?** *Chemical Biological Interactions*, v.175, p. 3-10, 2008.

SMITH, B. J.; MATTISON, D. R.; GLENN SIPES, I. G. **The Role of Epoxidation in 4-Vinylcyclohexene-Induced Ovarian Toxicity.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 105, p. 372-381, 1990.

SOHAL, R. S.; ARNOLD, L.; ORR, W. C. **Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 56, p. 223-235, 1990.

SONENSHEIN, G. E. **Rel/NF- κ B transcription factors and the control of apoptosis.** *Seminars in Cancer and Biology*, v. 8, p. 113-119, 1997.

SOWERS, M. F. R.; LAPIETRA, M. T. **Menopause: Its epidemiology and potential association with chronic diseases.** *Epidemiologic Reviews*, v. 17, p. 287-302, 1995.

SPRINGER, L. N.; MCASEY, M. E.; FLAWS, J. A.; TILLY, J. L.; SIPES, I. G.; HOYER, P. B. **Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in rats.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 139, p. 394-401, 1996.

VANDERHYDEN, B. C. **Loss of ovarian function and the risk of ovarian cancer.** *Cellular Tissue Research*, v. 322, p. 117-124, 2005.

WARING, S. C.; ROCCA, W. A.; PETERSEN, R. C.; O'BRIEN, P. C.; TANGALOS, E. G.; KOKMEN, E. **Postmenopausal estrogen replacement therapy and risk of AD: A population-based study.** *Neurology*, v. 52, p. 965-970, 1999.

WEVERS, A. **Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain.** *Behavioral Brain Research*, v. 221, p. 341-355, 2011.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. **Thiol chemistry and specificity in redox signaling.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, p. 549-561, 2008.

WOOTTEN, V.; BROWN, D. R.; CALLAHAN, B. G.; VETRANO, K.; WADMAN, P.; MELIA, J.; MULLIGAN, T.; SCHATZ, R. A. **Behavioral and biochemical alterations following in utero exposure to methylmercury.** *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, v. 7, p. 767-773, 1985.

YIN, Z.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, J. L.; SYVERSEN, T.; ROCHA, J. B.; SOUZA, D. O.; SIDORYK, M.; ALBRECHT, J.; ASCHNER, M. **Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes.** *Brain Research*, v. 1131, p. 1-10, 2007.

YIN, Z.; LEE, E.; NI, M.; JIANG, H.; MILATOVIC, D.; RONGZHU, L.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. **Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen.** *Neurotoxicology*, v. 32, p. 291-299, 2011.

ZAREBA, G.; CERNICHIARI, E.; HOJO, R.; NITT, S. M.; WEISS, B.; MUMTAZ, M. M.; JONES, D. E.; CLARKSON, T. W. **Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury.** *Journal of Applied Toxicology*, v. 27, p 511–518, 2002.