

BIOMARCADORES OXIDATIVOS: AVALIANDO OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO TIMEROSAL EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Anthony Renan Brum Rodrigues¹

Matheus Chimelo Bianchini²

Robson Luiz Puntel³

Resumo:

Considerando que o mercúrio é um agente causador de estresse oxidativo no organismo, sendo responsável por diferentes agravos nos mais distintos órgãos e sistemas, e que, todavia, existem formas de exposição ao Timerosal que não apresentam seus efeitos apropriadamente esclarecidos/compreendidos e/ou evidenciados, o estudo, em questão, objetiva avaliar os efeitos da exposição ao Timerosal em modelo biológico de *Drosophila melanogaster* por meio de biomarcadores oxidativos. Para isso, foram utilizadas *Drosophila melanogaster* selvagens mantidas sob ambiente controlado a 20°C; as quais foram divididas em 2 grupos: (1) controle e (2) 25M de Timerosal, concentração e tempo já pré-estabelecidos, durante 4 dias. A realização da avaliação do estresse oxidativo se deu por meio da dosagem dos níveis de espécies reativas (RS) e a quantificação das proteínas carboniladas. De acordo com os resultados do estudo, não houve indução ao dano, sendo necessários mais estudos nessa perspectiva, através de análises mais abrangentes que elucidem melhor a(s) ferramenta(s) de toxicidade desse organomercurial.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, biomarcadores oxidativos, toxicidade, timerosal

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

BIOMARCADORES OXIDATIVOS: AVALIANDO OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO TIMEROSAL EM DROSOPHILA MELANOGASTER

¹ Aluno de graduação. anthonybrum97@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. matheuscbianchini@gmail.com. Co-autor

³ Docente. robsonpuntel@unipampa.edu.br. Orientador



BIOMARCADORES OXIDATIVOS: AVALIANDO OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO TIMEROSAL EM *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um conhecido contaminante ambiental, encontrado, naturalmente, em vulcões, oceanos e gêiseres. Sua contaminação, também, advém da ação humana, através de sua utilização nas indústrias e na mineração de metais preciosos. Além disso, o Hg é um metal pesado que não possui função biológica conhecida, isto é, não é considerado essencial – um micronutriente – como outros metais (GENCHI *et al.*, 2017; YILMAZ, YANAR e ALKAN, 2017).

Devido a contaminação das águas, principalmente, em rios e mares, dá-se a conversão do Hg inorgânico em composto orgânico. As formas orgânicas, posteriormente, são incorporadas na cadeia trófica humana, por meio do consumo de peixes e frutos do mar contaminados; isso, sem contar, é claro, a utilização do Hg em produtos farmacêuticos, como as vacinas. Ou seja, forma-se, assim, uma abrangente fonte de exposição humana aos organomercuriais, como o metilmercúrio (metHg), o qual tem sido estudado, exaustivamente, devido ao seu alcance em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC), causando neurotoxicidade. Por sua vez, o tiosalicilato de etilmercúrio sódico, também conhecido como Timerosal, ou, ainda, Merthiolate, é um composto que, desde 1930, é utilizado como conservante em vacinas. A partir daí, através das décadas, vem sendo discutido os efeitos causados por esse composto em organismos vivos (POWELL e JAMIESON, 1931). Nesse contexto, o etilmercúrio, segundo Pletz *et al.* (2016), que há décadas vem sendo usado como conservante para diversos tipos de vacinas, tem sido associado há diversos distúrbios comportamentais e interpessoais, como mostra o estudo de Uno *et al.* (2015). No entanto, permanecem diversas incógnitas a respeito dos mecanismos pelos quais o mesmo atua.

Bianchini *et al.* (2016), relatam que o uso de modelos biológicos alternativos em pesquisas se mostram vantajosos quando comparados aos tradicionais, como um ciclo curto de vida, menores custos de manutenção e fácil manipulação. Dessa forma, a *Drosophila melanogaster* se torna vastamente utilizada em estudos que visam a compreensão das alterações fisiológicas associadas à exposição a xenobióticos e a fitoquímicos, bem como, também, doenças neurodegenerativas, como o Parkinson (MORA *et al.*, 2014), o qual, entre outros motivos, é ocasionado pelo estresse oxidativo. Esse estado de desequilíbrio entre os mecanismos de defesa contra radicais livres endógenos (antioxidantes) e a geração de compostos oxidantes, agravado pelos maus hábitos alimentares de um indivíduo, torna-se um dos grandes causadores conhecidos de morte celular (apoptose e/ou necrose) (ABBAS *et al.*, 2016, p. 436; BARBOSA *et al.*, 2010).

Dessa maneira, considerando que o mercúrio é um agente causador de estresse oxidativo no organismo, sendo responsável por diferentes agravos nos mais distintos órgãos e sistemas (MEINERZ *et al.*, 2011; ZEMOLIN *et al.*, 2012), e, ainda, existem formas de exposição ao Timerosal que não possuem seus efeitos devidamente elucidados/conhecidos e/ou postulados, o presente estudo tem por

objetivo avaliar os efeitos da exposição ao Timerosal em modelo biológico de *Drosophila melanogaster* sobre biomarcadores oxidativos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas *Drosophila melanogaster* selvagens mantidas sob ambiente controlado a 20 °C; as mesmas foram divididas em 2 grupos: (1) controle e (2) 25 µM de Timerosal, concentração e tempo já pré-estabelecidos em estudos anteriores (BIANCHINI *et al.*, 2016), durante o período de 4 dias; ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados para a realização dos testes de avaliação do estresse oxidativo; para isso, foram dosados os níveis de espécies reativas (RS) e quantificadas as proteínas carboniladas.

A dosagem de RS foi realizada pela técnica espectrofluorimétrica, descrita pelo pesquisador Perez-Severiano (2004), que consiste na reação de oxidação da sonda diclorofluoresína pelas RS. A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada pela técnica espectrofotométrica, que, de acordo com Levine (1990), a reação colorimétrica se dá pela substituição do agrupamento cetona pelo composto 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), dando a coloração amarela ao ensaio.

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 6. Os ensaios bioquímicos foram analisados estatisticamente com o Teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Nos resultados encontrados por nós, os níveis de RS se demonstraram, tanto na cabeça (Fig. 1A), quanto no corpo (Fig. 1B), sem alterações significativas nas moscas expostas ao Timerosal pelo período de 4 dias.

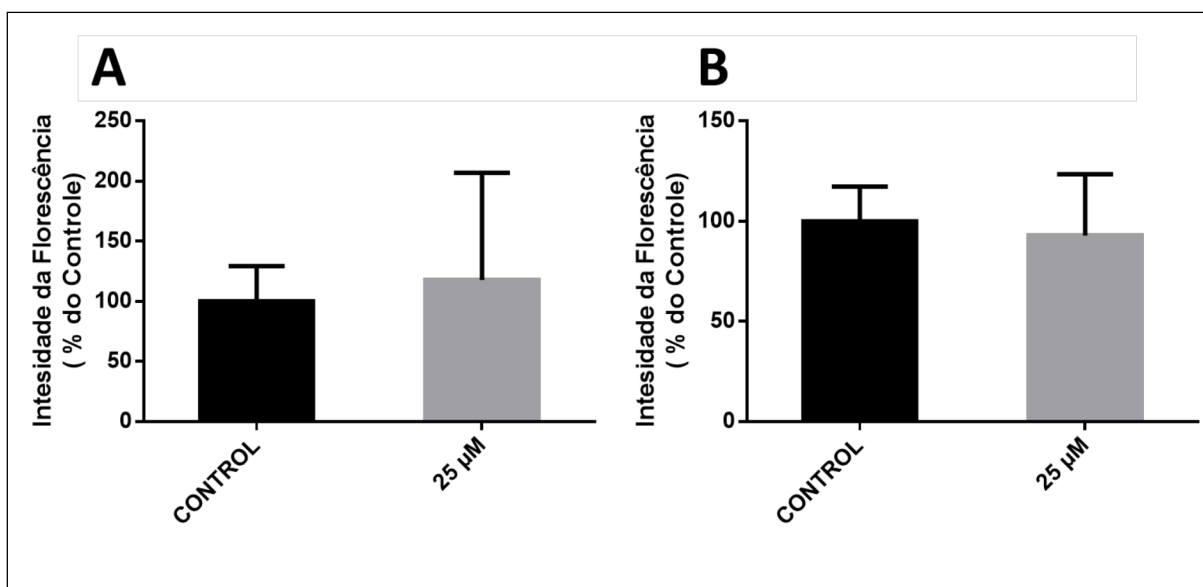


Figura 1. Níveis de espécies reativas de oxigênio em *Drosophila melanogaster* expostas ao Timerosal nas regiões da cabeça (A) e do corpo (B).

Já, na Figura 2, é possível observar que os níveis de carbonilação proteica, tanto na cabeça (Fig. 2A), quanto no corpo (Fig. 2B), não sofreram alterações, isto é, a exposição ao Timerosal não causou a elevação significativa desses níveis.

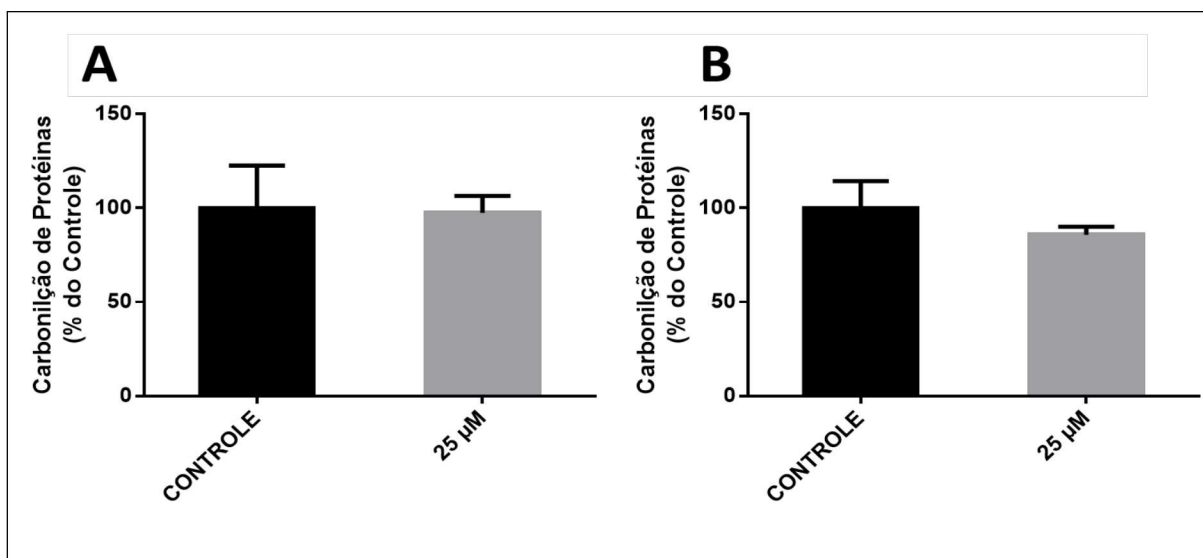


Figura 2. Níveis de carbonilação proteica em *Drosophila melanogaster* expostas ao Timersal nas regiões da cabeça (A) e do corpo (B).

Tais resultados se deram, provavelmente, pelo tempo de exposição ao Timersal ser em curto período, e/ou, ainda, a concentração do mesmo ser considerada baixa (25µM), não causando, dessa maneira, alterações nos parâmetros avaliados.

Nesse contexto, ressaltamos que a intoxicação crônica por Hg é resultado da exposição permanente e por períodos prolongados de tempo a quantidades pequenas desse metal (RIZZETTI, 2012, p. 21). Sendo, essa intoxicação, comum em pessoas que trabalham em atividades que utilizam os mercúrios orgânico ou inorgânico (AZEVEDO, 2003).

O sistema nervoso central (SNC) é, de acordo com Rizzetti (2012, p. 21), atingido através dessa intoxicação crônica pelo mercúrio inorgânico, e seus sinais clínicos são comumente relatados como mudanças comportamentais, tremores, distúrbios sensoriais e dificuldades auditivas e visuais (FRIBERG e VOSTAL, 1972; MILLER *et al.*, 1975; XING, *et al.*, 2009). Nas exposições crônicas, é observado o quadro clínico cognominado de mercurialismo crônico, o qual consiste, essencialmente, em alterações provocadas no SNC (autônomo e periférico) representadas por tremor de extremidades (principalmente dedos), eretismo psíquico e distúrbios vasomotores (RIZETTI, 2012, p. 21).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Retomando o que fora apresentado como objetivo, os presentes resultados, do estudo em questão, podem demonstrar que o tempo de exposição e a concentração não foram capazes de induzir ao dano, avaliado, aqui, sob ensaios de RS e carbonilação de proteínas. Entretanto, faz-se necessário mais estudos nesse intuito, com análises que abranjam uma maior quantidade de testes para que, assim, melhor se entenda o(s) mecanismo(s) de toxicidade desse organomercurial.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. Robbins & Contran – Patologia – Bases patológicas das doenças. Elsevier. 9.ed. Rio de Janeiro, 2016. 1440p.

AZEVEDO, B. F. A. Toxicologia do mercúrio. 1.ed. São Carlos, Rima, 2003. 272p.

ASCHNER, M.; CECCATELLI, S. Are neuropathological conditions relevant to ethylmercury exposure? Neurotoxicology Research, v. 18, n. 1, p. 59-68, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, 2010.

BIANCHINI, MC. et al. Avaliação da toxicidade induzida por timerosal (ETHg) em *Drosophila melanogaster*. In: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão; novembro 2016. Uruguaiana. Uruguaiana: Universidade Federal do Pampa; 2016.

FRIBERG, L.; VOSTAL, J. Mercury in the environment. Cleveland, CRC Press., Inc., 1972. 215p.

GENCHI, G. et al. Mercury exposure and heart diseases. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 14, n. 1, 2017.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymology, v. 186, p. 464-478, 1990.

MEINERZ, D. F. et al. Protective effects of organoselenium compounds against methylmercury-induced oxidative stress in mouse brain mitochondrial-enriched fractions. Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line, v. 44, n. 11, p. 1156-1163, 2011.

MILLER, J. M. et al. Subclinical psychomotor and neuromuscular changes in workers exposed to inorganic mercury. American Industrial Hygiene Association Journal, v. 36, n. 10, p. 725-733, 1975.

MORA, M. et al. Minocycline increases the activity of superoxide dismutase and reduces the concentration of nitric oxide, hydrogen peroxide and mitochondrial malondialdehyde in manganese treated *Drosophila melanogaster*. Neurochemical Research, v. 39, n. 7, p. 1270-1278, 2014.

PEREZ-SEVERIANO, F. et al. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. European Journal of Pharmacology, v. 489, n. 3, p. 197-202, 2004.

PLETZ, J. et al. Dose-response analysis indicating time-dependent neurotoxicity caused by organic and inorganic Mercury-Implications for toxic effects in the developing brain. Toxicology, v. 347-349, p. 1-5, 2016.

POWELL, H. M.; JAMIESON, W. A. Merthiolate as a germicide. American Journal of Epidemiology, v. 13, n. 1, p. 296-310, 1931.

RIZZETTI, D. A. Efeito do tratamento antioxidante sobre a reatividade vascular da artéria aorta e estresse oxidativo de ratos expostos cronicamente ao cloreto de mercúrio (HgCl₂). 106f. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2012.

YILMAZ, A. B.; YANAR, A.; ALKAN, E. N. Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: some essential metals. *Reviews on Environmental Health*, v. 32, n. 1-2, p. 119-163, 2017.

UNO, Y. et al. Early exposure to the combined measles-mumps-rubella vaccine and the thimerosal-containing vaccines and risk of autism spectrum disorder. *Vaccine*, v. 33, n. 21, p. 2511-2516, 2015.

XING, X. J. et al. Exposure to lead and mercury in young larvae induces more severe deficits in neuronal survival and synaptic function than adult nematodes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 56, n. 4, p. 732-741, 2009.

ZEMOLIN, A. P. P. et al. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. *Toxicology*, v. 302, n. 1, p. 60-67, 2012.