

Exposição ao arsênio através da água potável: efeitos na sobrevivência e locomoção em *Drosophila melanogaster*

Mayara Batu Gonçalves ¹

Rafael Roehrs ²

Jefferson de Jesus Soares ³

Daiane Raquel de Freitas Rodrigues ⁴

Mateus Cristofari Gayer ⁵

Matheus Bianchini ⁶

Elton Luis Gasparotto Denardin ⁷

Resumo:

O arsênio é um semi-metal ubiquamente disponível no meio ambiente terrestre e considerado um fator de risco para a saúde global (ABDUL et al., 2015). A exposição crônica ao arsênio através da água potável está associada a câncer, distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, anormalidades neurológicas e doenças no fígado e rins. Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição a baixos níveis de arsênio pode causar déficits cognitivos e neuropsicológicos além de dificuldades na aprendizagem e memória, entretanto, os mecanismos de neurotoxicidade ainda não estão completamente elucidados. A determinação in vivo da população neuronal afetada por metais é muitas vezes complicada pela complexidade dos sistemas nervosos humanos e mamíferos. Assim, organismos com sistemas nervosos mais simples, como a *Drosophila melanogaster* (DM), estão sendo utilizados com maior frequência em estudos de neurotoxicidade induzida por metais. Em DM, o arsênio já demonstrou ser genotóxico. Entretanto pouco se sabe sobre os efeitos do arsênio sobre o sistema nervoso das moscas. Objetivo desse trabalho foi avaliar o possível efeito tóxico e neurotóxico do arsênio em moscas expostas a esse metal através de uma alimentação líquida simulando uma contaminação da água potável. As DM selvagens foram cultivadas em frascos de vidro com meio de manutenção padrão de farinha de milho com extrato de levedura como fonte de proteínas e mantidos em temperatura e umidade constante. Soluções contendo arsênio nas concentrações 0,5; 1 e 2 mM, além do grupo controle (sem arsênio, somente com solução controle de 1% sacarose e 1% leite em pó). A exposição foi realizada através de uma alimentação líquida contínua conforme descrito por SOARES et al., (2017). Foi realizado o teste de geotaxia negativa e avaliação da sobrevivência. Após a análise estatística dos dados. A água potável é a principal rota de exposição humana ao arsênio. A contaminação de águas subterrâneas por arsênio foi relatado em países como Tailândia, China, Gana, Argentina Chile, México e Hungria (KAPAJ et al., 2006). A toxicidade do arsênio sobre as moscas foi avaliada através dos parâmetros de sobrevivência e atividade locomotora. Nesse estudo, as moscas expostas ao arsênio na concentração de 1 mM demonstraram uma redução significativa da capacidade locomotora no ensaio de geotaxia negativa quando comparadas com o grupo controle. Já o grupo tratado com 0,05 mM de arsênio não demonstrou diferença significativa em relação ao controle nesse ensaio. A perda da capacidade locomotora das moscas expostas ao arsênio na concentração de 1 mM também foi observado no ensaio do número de cruzamentos. Houve uma redução do número de quadrados percorridos pelas moscas desse grupo quando comparado com o grupo controle. Consequentemente, também houve um aumento do tempo de imobilização desse grupo em relação ao grupo controle. A coordenação locomotora alterada pode estar relacionada com problemas no funcionamento do sistema colinérgico. Nesse estudo, o arsênio administrado através de uma alimentação líquida simulando uma contaminação da água potável, causou uma diminuição da sobrevivência e redução da atividade locomotora das moscas expostas a esse metal. Entretanto, mais ensaios serão realizados para confirmar essas hipóteses. Por fim, a DM

mostrou-se um modelo eficaz para o estudo da contaminação da água potável por metais.

Palavras-chave: Intoxicação, arsênio, *Drosophila melanogaster*, água potável

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

Exposição ao arsênio através da água potável: efeitos na sobrevivência e locomoção em *Drosophila melanogaster*

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

² Docente. rafael.roehrs@gmail.com. Co-autor

³ Técnico Administrativo em Educação. jefferjsoares@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de graduação. daianeraquel6@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de graduação. mateusgayer@gmail.com. Co-autor

⁶ Aluno de pós-graduação. matheus_cbianchini@gmail.com. Co-autor

⁷ Docente. eltondenardin@unipampa.edu.br. Orientador



Exposição ao arsênio através da água potável: efeitos na sobrevivência e locomoção em *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

O arsênio é um semi-metal ubiquamente disponível no meio ambiente terrestre e considerado um fator de risco para a saúde global (ABDUL et al., 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 200 milhões pessoas são expostas ao arsênio em todo mundo através da contaminação da água potável a níveis superiores permitidos por legislações ambientais (OMS, 2008). A exposição crônica ao arsênio através da água potável está associada a câncer, distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, anormalidades neurológicas e doenças no fígado e rins (JOMOVA et al., 2011). Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição a baixos níveis de arsênio pode causar déficits cognitivos e neuropsicológicos além de dificuldades na aprendizagem e memória (PRAKASH & KUMAR, 2011). Entretanto, os mecanismos de neurotoxicidade do arsênio ainda não estão completamente elucidados.

Estudos envolvendo toxinas ambientais, como pesticidas ou metais pesados, que podem contribuir para a etiologia de doenças neurodegenerativas, concentram-se principalmente na capacidade dessas substâncias em danificar os neurônios. Infelizmente, a determinação *in vivo* da população neuronal afetada por metais é muitas vezes complicada pela complexidade dos sistemas nervosos humanos e mamíferos. Assim, organismos com sistemas nervosos mais simples, como a *Drosophila melanogaster* (DM), estão sendo utilizados com maior frequência em estudos de neurotoxicidade induzida por metais (NEGGA et al., 2012). Em DM, o arsênio já demonstrou ser genotóxico (RIZKI et al., 2006). Entretanto pouco se sabe sobre os efeitos do arsênio sobre o sistema nervoso das moscas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o possível efeito tóxico e neurotóxico do arsênio em moscas expostas a esse metal através de uma alimentação líquida simulando uma contaminação da água potável.

2. METODOLOGIA

-Cultivo da *Drosophila melanogaster* (DM): DM do tipo selvagem foram criadas em frascos de vidro contendo uma alimentação padrão de farinha de milho com extrato de levedura como fonte de proteína. Esses frascos de criação foram mantidos em uma incubadora com temperatura e umidade constantes (22°C e 60%, respectivamente).

-Exposição ao As (III): Moscas machos de 3-4 dias de idade (n=30) foram divididas em 4 grupos: (1) controle, (2) 0,5 mM As (III), (3) 1 mM As (III) e (4) 2 mM As (III). As moscas foram colocadas em frascos para o tratamento com uma alimentação líquida conforme descrito por SOARES et al., (2017). O arsenito de sódio (III) foi dissolvido em uma solução padrão (1% de sacarose e 1% de leite em pó) sendo o grupo controle alimentado somente com a solução padrão. O tratamento durou 2 dias.

-Avaliação da sobrevivência e atividade locomotora: A sobrevivência foi avaliada através da contagem do número de moscas vivas diariamente até o final do

tratamento. Cerca de 120 moscas por grupo foram incluídas nos dados de sobrevivência e o número total de moscas representa a soma de 4 experimentos independentes (30 moscas por replicata). A atividade locomotora das moscas tratadas foi avaliada através dos ensaios de geotaxia negativa, número de cruzamentos e tempo de imobilização (SOARES et al., 2017). Após o tratamento, as moscas foram anestesiadas em banho de gelo e colocadas em provetas de vidro de 50 mL (comprimento 20 cm/ diâmetro 1.5 cm/ 10 moscas). Logo após o tempo de recuperação da anestesia, a proveta contendo as moscas foi gentilmente batida contra uma superfície para manter as moscas nas bases. Em seguida foram contadas as moscas que conseguiram subir até a marca de 14 cm em 7s. Para os ensaios de número de cruzamentos e tempo de imobilização, as moscas tratadas (n = 5) foram colocadas em um arena de 9 cm de diâmetro que foi dividida por quadrados (1 x 1 cm) e coberta com uma placa de Petri. O número de cruzamento (quadrados cruzados pela mosca) e o tempo de imobilização (tempo onde a mosca permaneceu parada em um quadrado) foram avaliados através de uma filmagem de 60 s das moscas na arena.

-Análise estatística dos dados: Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < *0,05$, $**0,001$ e $***0,001$ em relação grupo controle. As análise estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A água potável é a principal rota de exposição humana ao arsênio. A contaminação de águas subterrâneas por arsênio foi relatado em países como Tailândia, China, Gana, Argentina Chile, México e Hungria (KAPAJ et al., 2006). Nesse estudo o arsênio foi administrado através de uma alimentação líquida para as moscas buscando simular uma possível contaminação da água potável por esse metal. A toxicidade do arsênio sobre as moscas foi avaliada através dos parâmetros de sobrevivência e atividade locomotora. A Figura 1A mostra que a toxicidade do arsênio é dose dependente uma vez que com o aumento da concentração há uma diminuição na sobrevivência das moscas expostas a esse metal. Um dos principais mecanismos de toxicidade do arsênio é através da produção direta e indireta de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxil . A produção excessiva dessas espécies gera um estado de estresse oxidativo que causa danos a lipídios, proteínas e ao DNA o que leva a morte celular (FLORA, 2011). Ensaios como avaliação da peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e atividade de enzimas antioxidantes serão realizados ainda nesse estudo para confirmar se a alta mortalidade ocasionada pela exposição ao As é devido à geração de estresse oxidativo. Como houve uma alta mortalidade das moscas expostas a concentração de 2 mM de arsênio não foi possível realizar os ensaios de comportamento com esse grupo.

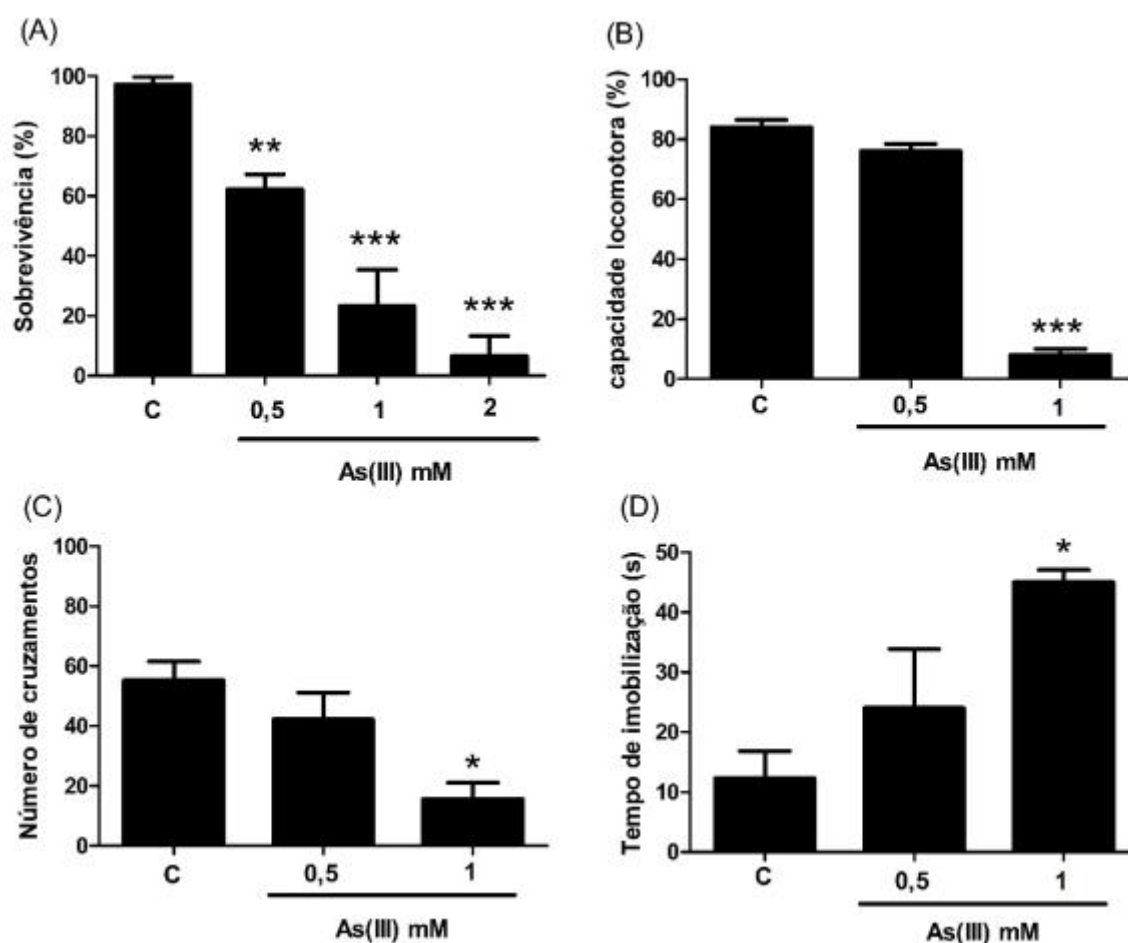


Fig. 1. Efeitos da exposição ao arsênio na (A) sobrevivência, (B) geotaxia negativa, (C) número de cruzamentos e (D) tempo de imobilização. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

A ingestão de arsênio ativa as vias de excreção, resultando em metabólitos orgânicos mono e dimetilados de arsênio, que podem ser mais tóxicos que o arsênio inorgânico ingerido. Todas as formas de arsênio, tanto inorgânica como orgânica, se acumulam em diversas partes do cérebro causando neurotoxicidade. A exposição aguda ao arsênio pode induzir neuropatia e redução da velocidade locomotora com manifestação de dor de cabeça e inconsciência (FLORA, 2011). Nesse estudo, as moscas expostas ao arsênio na concentração de 1 mM demonstraram uma redução significativa da capacidade locomotora no ensaio de geotaxia negativa (Fig. 1B) quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,001$). Isto pode estar relacionado com o fato de que a exposição ao arsênio pode causar uma encefalopatia periférica de neurônios sensoriais e motores, causando sinais de dormência, perda de reflexos e fraqueza muscular (ZHAO et al., 2017). Já o grupo tratado com 0,05 mM de arsênio não demonstrou diferença significativa em relação ao controle nesse ensaio. A perda da capacidade locomotora das moscas expostas ao arsênio na concentração de 1 mM também foi observado no ensaio do número de cruzamentos. Houve uma redução do número de quadrados percorridos pelas moscas desse grupo (Fig. 1C) quando

comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Consequentemente, também houve um aumento do tempo de imobilização desse grupo (Fig. 1D) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A coordenação locomotora alterada pode estar relacionada com problemas no funcionamento do sistema colinérgico. Alguns estudos demonstraram a redução das atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e colina acetiltransferase (ChAT) após a exposição ao arsênio. Além disso, o arsênio também pode afetar vários sistemas transportadores de monoaminas como a dopamina que é um neurotransmissor diretamente relacionado com o movimento (TYLER & ALLAN, 2014). Mais ensaios como avaliação da atividade da AChE e conteúdo de dopamina nas cabeças das moscas tratadas com arsênio serão realizados dentro desse estudo para compreender melhor de que forma esse metal influencia na capacidade locomotora das moscas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, o arsênio administrado através de uma alimentação líquida simulando uma contaminação da água potável, causou uma diminuição da sobrevivência e redução da atividade locomotora das moscas expostas a esse metal. Esses resultados podem estar diretamente relacionados com a geração de estresse oxidativo ocasionado pela exposição a esse metal o que pode levar a morte celular e neurotoxicidade. Entretanto, mais ensaios serão realizados para confirmar essas hipóteses. Por fim, a DM mostrou-se um modelo eficaz para o estudo da contaminação da água potável por metais.

5. REFERÊNCIAS

ABDUL, K. S.; JAYASINGHE, S. S.; CHANDANA, E. P.; DE SILVA, P. M. Arsenic and human health effects: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 40, n. 3, p. 828-846, 2015.

OMS, Guidelines for drinking-water quality, in: third ed. Incorporating 1st and 2nd Addenda, vol. 1, WHO, Geneva, 2008, p. 306-308.

JOMOVA, K.; JENISOVA, Z.; FESZTEROVA, M.; BAROS, S.; LISKA, J.; HUDECOVA, D.; RHODESD, C. J.; VALKOC, M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease, *Journal Applied Toxicology*, v. 31, p. 95-107, 2011.

PRAKASH, C.; KUMAR, V. Arsenic-induced mitochondrial oxidative damage is mediated by decreased PGC-1 α expression and its downstream targets in rat brain, *Chemico-Biological Interactions*, v. 256, p. 228-235, 2016.

NEGGA, R.; STUART, J. A.; MACHEN, M. L.; SALVA, J.; LIZEK, A. J.; RICHARDSON, S.J.; OSBORNE A. S.; MIRALLAS, O.; MCVEY, K. A.; FITSANAKIS, V. A. Exposure to glyphosate and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of γ -aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*, *Neurotoxicology Research*, v. 21, p. 281-290, 2012.

RIZKI, M.; KOSSATZ, E.; VELÁZQUEZ, A.; CREUS, A.; FARINA, M.; FORTANER, S.; SABBIONI, E.; MARCOS R. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47, n. 3, p. 162-168.

SOARES, J. J.; GONÇALVES, M. B.; GAYER, M. C.; CAURIO, A. C.; SOARES, S. J.; PUNTEL, R. L.; ROEHRS, R.; DENARDIN, E. L. G. Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*, v. 537, p. 60-62, 2017.

KAPAJ, S.; PETERSON, H.; LIBER, K.; BHATTACHARYA, P. Human health effects from chronic arsenic poisoning – a review. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 41, p. 2399-2428.

FLORA, S. J. S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, p. 257–281, 2011.

ZHAO, P.; GUO, Y.; ZHANG, W.; CHAI, H.; XING, H.; XING, M. Neurotoxicity induced by arsenic in *Gallus Gallus*: Regulation of oxidative stress and heat shock protein response. *Chemosphere* v. 166, p. 238-245, 2017.

TYLER, C. R.; ALLAN, A. M. The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Current Environmental Health Reports*, v. 1, p. 132-147.