

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CURSO DE FARMÁCIA

MAYARA BATÚ GONÇALVES

**CONTAMINAÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL POR ARSÊNIO: ESTUDO ATRAVÉS DO
MODELO ALTERNATIVO *Drosophila melanogaster***

Uruguaiana/RS

2018

MAYARA BATÚ GONÇALVES

**CONTAMINAÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL POR ARSÊNIO: ESTUDO ATRAVÉS DO
MODELO ALTERNATIVO *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin

Coorientador: Dr. Jefferson de Jesus Soares

Uruguaiana/RS

2018

Mayara Batú Gonçalves

**CONTAMINAÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL POR ARSÊNIO: ESTUDO
ATRAVÉS DO MODELO ALTERNATIVO
*Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Farmácia
da Universidade Federal do Pampa
(UNIPAMPA), como requisito parcial
para aprovação na disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof. Dr. Elton Luís
Gasparotto Denardin

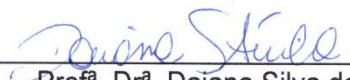
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 06/07/2018

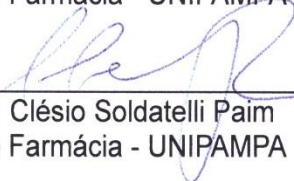
Banca examinadora:



Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin
Orientador
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Daiana Silva de Ávila
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof. Dr. Clésio Soldatelli Paim
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

Dedico este trabalho de conclusão de curso em memória ao meu querido e amado avô Adorino Pinheiro Batú, que sempre foi amável em tudo que fazia. Sei que ainda me guarda, de onde estiver. E a toda minha família por sempre me apoiarem e não me deixarem desistir. Amo vocês!

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus por me dar forças todos os dias e por me permitir concluir este trabalho com êxito.

A minha família por todo o apoio durante a graduação e por terem paciência nos momentos difíceis e por terem me feito sorrir em todas as vezes em que eu quis chorar.

Ao meu querido e amado orientador Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin por todos esses anos de dedicação, ensinamentos e por ter me dado conselhos nos meus momentos difíceis durante esse trabalho. Obrigado por todo carinho, estará sempre em meu coração!

Aos professores Dr. Clésio Soldateli Paim e Dra. Daiana Silva de Ávila por terem aceitado serem banca do meu trabalho e pelos ensinamentos dentro e fora das salas de aula. Obrigado por todas as sugestões que fizeram o meu trabalho ser aperfeiçoado. São pessoas que sempre lembrarei de modo positivo em relação a minha graduação. Vocês são incríveis!

Ao meu querido amigo e colega de Laboratório Dr. Jefferson de Jesus Soares por todos os ensinamentos durante esses anos de iniciação científica. Obrigado pelos dias de risadas e também pelos puxões de orelha! E também a doutoranda Bruna Piaia Ramborger e mestre Isadora Dias Marques por não me deixarem enlouquecer e por toda ajuda que me deram durante o trabalho. Amo vocês!

A todos meus colegas de laboratório, por terem me ajudado sempre em todas as coisas e em especial a Daiane Rodrigues e Gilieli Rodrigues, por terem ficado do meu lado e agüentado todas as minhas reclamações. Obrigado por tudo que fizeram, amo vocês!

Enfim obrigado a todos que de alguma forma fizeram parte do desenvolvimento desse trabalho!

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam”.

Salmo 23:4

RESUMO

O arsênio é um semi-metal ubiquamente disponível no meio ambiente terrestre e considerado um fator de risco para a saúde global. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 200 milhões de pessoas são expostas ao arsênio em todo mundo através da contaminação da água potável a níveis superiores permitidos por legislações ambientais. A intoxicação por arsênio é uma preocupação de saúde mundial, devido ao seu alto nível prejudicial á saúde. Esse metal pode afetar diversos órgãos do corpo mesmo em baixas concentrações, inclusive o cérebro. 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. O arsênio ocupa o primeiro lugar entre os agentes tóxicos que representam uma ameaça potencial significativa para a saúde humana com base em toxicidade conhecida ou suspeita. De ocorrência natural, é um veneno conhecido, co-cancerígeno e, em concentrações mais baixas, mostrou aumentar a susceptibilidade à disfunção cognitiva. Nesse estudo o arsênio foi administrado através de uma alimentação líquida (durante 3 dias) para as DM 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: contagem das DM vivas durante os três dias de tratamento, Atividade locomotora: através dos ensaios de geotaxia negativa, tempo de imobilização e número de cruzamentos. Além das análises de dopamina e octopamina, que foram quantificadas no homogenizado cerebral das DM utilizando HPLC-DAD. Onde demonstrou que o arsênio nas concentrações de 0,05 mM, 0,1 mM e 0,3 mM provocou diminuição na sobrevivência e na atividade locomotora das DM e também induziu a uma tendência na diminuição da dopamina, mostrando que é um modelo eficaz para o estudo da neurotoxicidade através da simulação de uma contaminação da água potável As(III).

Palavras-Chave: *Drosophila melanogaster*, Arsênio, água potável, metais pesados, estresse oxidativo, dopamina.

ABSTRACT

Arsenic is a semi-metal ubiquitously available in the terrestrial environment and considered a risk factor for global health. According to the World Health Organization (WHO), more than 200 million people are exposed to arsenic worldwide through the contamination of drinking water at higher levels permitted by environmental legislation. Arsenic poisoning is a worldwide health concern due to its high level of detriment to health. This metal can affect various organs of the body even at low concentrations, including the brain. Epidemiological studies have shown that exposure to low levels of arsenic can cause cognitive and neuropsychological deficits as well as difficulties in learning and memory. Arsenic is the first among toxic agents that pose a significant potential threat to human health based on known or suspected toxicity. Naturally occurring, it is a known, co-carcinogenic poison and, at lower concentrations, has been shown to increase susceptibility to cognitive dysfunction. In this study arsenic was administered through a liquid feed (for 3 days) to the DM seeking to simulate a possible contamination of drinking water by this metal. The toxicity of arsenic to the flies was evaluated through the survival parameters: live DM count during the three days of treatment, locomotor activity: through negative geotaxia, immobilization time and number of crosses. In addition to the dopamine and octopamine analyzes, they were quantified in the brain homogenate of DM using HPLC-DAD. Where it was shown that arsenic at concentrations of 0.05 mM, 0.1 mM and 0.3 mM caused a decrease in survival and locomotor activity of the DM and also induced a decrease in dopamine, showing that it is an effective model for the study of neurotoxicity through the simulation of drinking water contamination by As (III).

Keywords: *Drosophila melanogaster*, arsenic, drinking water, heavy metals, oxidative stress, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas das espécies de arsênio

Figura 2 – Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

Figura 3 – Sistema de alimentação líquida contínua

Figura 4 – Efeitos da exposição ao arsênio na sobrevivência

Figura 5 – Efeitos da exposição ao arsênio na atividade locomotora, número de cruzamentos e tempo de imobilização

Figura 6 – Efeitos da exposição ao arsênio na dopamina e octopamina

LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina difosfato

As – Arsênio 3+

ATP – Adenosina trifosfato

ChAT – Colina Acetiltransferase

DL50 – Dose letal para matar 50% dos indivíduos

DM – *Drosophila melanogaster*

DMA – Dimetil de arsênio

MMA – Monometil de arsênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GERAL	13
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
4.1 Arsênio	13
4.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	17
5 METODOLOGIA	19
5.1 Cultivo da DM	19
5.2 Exposição ao As(III)	19
5.3 Avaliação da sobrevivência e Atividade locomotora	20
5.4 Análise da Dopamina e Octopamina	21
5.5 Análise estatística dos dados	22
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7 REFERÊNCIAS	26

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 de pessoas são expostas ao arsênio em todo mundo através da contaminação da água potável a níveis superiores permitidos por legislações ambientais (OMS, 2008).

A intoxicação por arsênio é uma preocupação de saúde mundial, devido ao seu alto nível prejudicial à saúde. Esse metal pode afetar diversos órgãos do corpo mesmo em baixas concentrações, inclusive o cérebro. 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).

Alguns países são afetados pela contaminação da água potável por arsênio e a falta de conhecimento da população em relação a isso provoca diversos problemas de intoxicação, causando mal-estar e até mesmo problemas maiores que podem levar a morte devido ao acúmulo desse metal no organismo. A exposição crônica ao arsênio através da água potável está associada ao câncer, distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, anormalidades neurológicas e doenças no fígado e rins (JOMOVA et al., 2011). Entretanto, os mecanismos de neurotoxicidade do arsênio ainda não estão muito bem elucidados. Estudos envolvendo pesticidas ou metais pesados, que podem contribuir para desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, se concentram principalmente na capacidade dessas substâncias em danificar os neurônios. Porém, não foi possível ainda a determinação neuronal in vivo afetada por metais nos humanos e mamíferos devido a complexidade do sistema nervoso dos mesmos. Assim, estudo em organismos mais simples, como as *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), porém, nenhum estudo foi encontrado na literatura sobre seus efeitos no sistema nervoso da mosca.

2 JUSTIFICATIVA

O arsênio ocupa o primeiro lugar entre os agentes tóxicos que representam uma ameaça potencial significativa para a saúde humana com base em toxicidade conhecida ou suspeita. De ocorrência natural, é um veneno conhecido, co-cancerígeno e, em concentrações mais baixas, mostrou aumentar a susceptibilidade à disfunção cognitiva. Cerca de 100 milhões de pessoas em todo o mundo estão expostas a quantidades excessivas de arsênio via água potável (na faixa de ppm). Muitos desses indivíduos obtêm água potável de fontes não regulamentadas (poços) ou vivem em regiões onde os níveis de arsênio são altos, como Bangladesh e também na região de Mariana e Ouro Preto em Minas Gerais, que através de algumas coletas de água em algumas minas auríferas subterrâneas e nascentes dessas regiões, comprovou que se tem concentrações significativas de arsênio (na faixa de $\mu\text{g/L}$), onde as principais fontes naturais de arsênio estão relacionadas às rochas que contêm depósitos auríferos sulfetados. A contaminação da água pode estar relacionada a presença de pilhas de rejeitos, solos e sedimentos contaminados.

Neste sentido, este trabalho foi realizado visando observar os efeitos neurológicos provocados pelo As(III) , em uma exposição por meio da água potável em DM, uma vez que existem poucos estudos na literatura relacionado aos efeitos neurológicos do As neste modelo alternativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos provocados pela exposição ao As(III) através de uma simulação de contaminação de água potável utilizando o modelo experimental *Drosophila melanogaster*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de As (III) capaz de matar 50% das DM (DL50) expostas a esse metal.
- Avaliar se a exposição ao As é capaz de causar problemas nas DM.
- Avaliar efeitos bioquímicos da exposição ao As (III) nos níveis de dopamina e Octopamina nas DM tratadas.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Arsênio

O As (III) é largamente conhecido como um agente tóxico, tendo ganhado notoriedade pelo extenso uso como agente anti-sífilis entre a nobreza. Esse agente foi memoravelmente utilizado no conhecido conto Arsenic and Old Lace como meio de “terminar com pessoas indesejáveis”. Mesmo hoje, o arsênio continua sendo um agente tóxico perigoso, como evidenciado pelo incidente em Bangladesh, no qual centenas de pessoas se envenenaram com água de fontes contaminadas pela extração de arsênio em pedreiras. O arsênio é listado como o agente tóxico número um na lista de prioridades de substâncias perigosas do U.S. CERCLA (BURTIS et al., 2008). É um elemento traço amplamente distribuído na natureza e ocorre como um componente de mais de 245 minerais (RHAMAN et al., 2015). O arsênio

inorgânico de ocorrência é conhecido por causar sérios problemas de saúde (SUZUKI et al., 2013).

No Brasil, na região do estado de Minas Gerais, foi relatado em estudo que nas cidades de Ouro Preto e Mariana foi encontrado arsênio em águas subterrâneas, provenientes de nascentes ou mesmo de minas abandonadas. Nesses municípios o abastecimento público é feito através da captação de água superficial, de nascentes e também são utilizadas águas subterrâneas provenientes de antigas minas de ouro. Também é coletado água de pequenas nascentes nas encostas de morros, principalmente em distritos distantes da sede do município. A escolha da utilização da água subterrânea é atraente devido a melhor qualidade da mesma, porém o risco de conter arsênio é muito grande devido a rejeitos de minérios, entre outros fatores, que pode levar a possibilidade da ocorrência de arsênio nas águas subterrâneas, o que torna essas águas impróprias para consumo humano sem um tratamento específico para remoção do arsênio (BORBA et al., 2004).

O arsênio existe em inúmeras formas tóxicas e não-tóxicas. As formas tóxicas são as espécies inorgânicas As(III), os mais tóxicos As(V) e seus metabólitos parcialmente desintoxicados, monometil de arsênio (MMA) e dimetil de arsênio (DMA). As formas não-tóxicas de arsênio estão presentes em muitos alimentos. A arsenobetaína e a arsenocolina são as formas mais comuns de arsênio orgânico encontradas em alimentos. Os alimentos que normalmente contém concentrações significantes de arsênio orgânico são a ostra e outros predadores da cadeia alimentar do oceano, como o bacalhau. Conseqüentemente a taxa de excreção de arsênio em indivíduos saudáveis é aproximadamente de 120 µg em uma coleta de 24 horas. Após a ingestão, a arsenobetaína e a arsenocolina passam rapidamente pela filtração glomerular e se concentram na urina. Os arsênios orgânicos são completamente excretados após 1 a 2 dias da ingestão, e não sobram metabólitos tóxicos residuais. Aparentemente a meia-vida do arsênio orgânico é de 4 a 6 horas (BURTIS et al., 2008).

A desintoxicação ocorre no fígado, sendo que o As(V) é reduzido a As(III); ambos são metilados em MMA e DMA. Como resultado dessa desintoxicação, As(III) e As(V) são encontrados na urina logo após a ingestão, enquanto o MMA e DMA predominam após 24 horas de ingestão. O pico de concentração urinária do As(III) e

As(V) ocorre aproximadamente após 10 horas e retorna ao normal entre 20 e 30 horas após a ingestão. A concentração urinária de MMA e DMA atinge seu pico, normalmente, entre 40 e 60 horas e retorna ao nível basal entre 6 a 20 dias após a ingestão. A meia-vida do arsênio inorgânico no sangue é de 4 a 6 horas e dos seus metabólitos metilados entre 20 e 30 horas. As concentrações séricas de arsênio ficam elevadas por um período curto após ele ter sido administrado, rapidamente desaparecendo no pool de fosfato do corpo. Após a ingestão, o arsênio pode ser detectado por menos de 4 horas na corrente sanguínea (BURTIS et al., 2008).

A toxicidade do arsênio se deve a três mecanismos diferentes, dois dos quais são relacionados à transferência de energia. O arsênio liga-se avidamente a ácidos dihidrolipóicos, que são cofatores da piruvato-desidrogenase. A ausência do cofator inibe a conversão do piruvato em acetil-coenzima A o primeiro passo da gliconeogênese. O arsênio também compete com o fosfato para reagir com a adenosina difosfato (ADP), resultando na formação de ADP com menos energia que a adenosina trifosfato (ATP). O arsênio também se liga com qualquer grupo sulfidril hidratado de proteínas, distorcendo a configuração tridimensional da proteína e levando à perda de sua atividade; também interfere na atividade de diversas enzimas da via de síntese do grupo Heme. Também há evidência do aumento do risco de câncer de bexiga, pele e pulmão após o consumo de água muito contaminada. O arsênio é um conhecido carcinógeno, mas o mecanismo de seus efeitos ainda é pouco conhecido. (BURTIS et al., 2008).

Os metais pesados podem causar estresse oxidativo, perturbando o equilíbrio dos radicais livres (ZHOU et al., 2015). As mitocôndrias estão envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo, vários passos no processo de redução do oxigênio na mitocôndria tem a possibilidade de produzir radicais livres muito reativos que podem danificar as células. A passagem dos elétrons de QH₂ para o citocromo b1, através do Complexo III e a passagem dos elétrons do Complexo I para o QH₂ envolvem o radical .Q⁻ como intermediário. Este radical pode, com baixa probabilidade, passar um elétron para o O₂ na reação $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$.

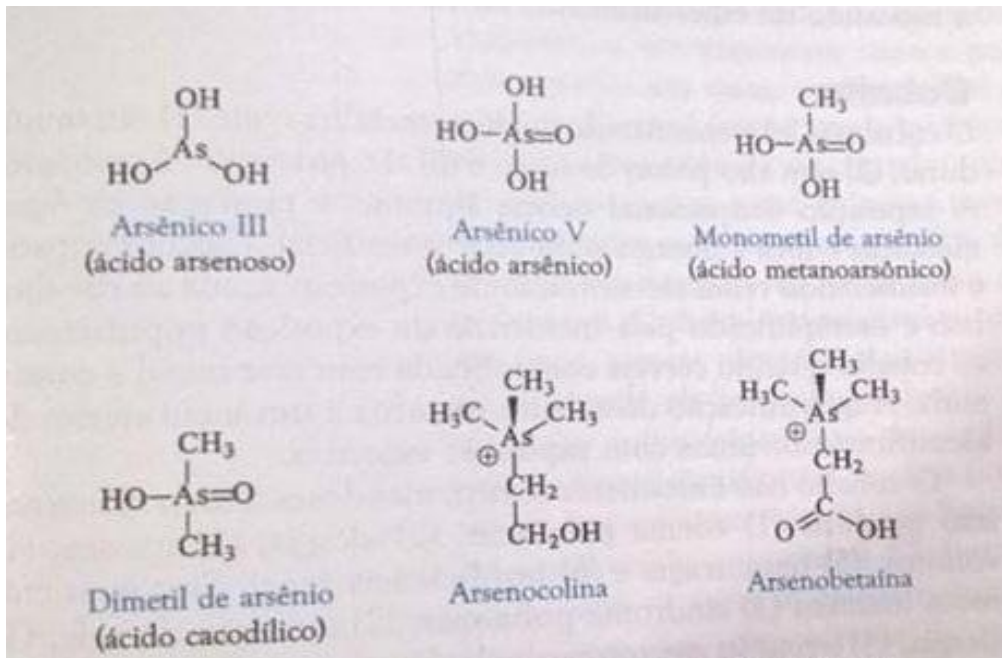
O radical superóxido, O₂⁻ é muito reativo e pode danificar as enzimas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos. De 0,1% até tanto quanto 4% do oxigênio empregado pela mitocôndria que está respirando forma superóxido, quantidade mais que suficiente para provocar efeitos letais na célula, a menos que os radicais livres

assim formados sejam rapidamente neutralizados. Para prevenir a lesão oxidativa de O_2^- as células têm várias formas da enzima superóxido dismutase que catalisa a reação: $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado por essa reação é tornado inócuo pela ação da glutathione peroxidase. A glutathione redutase recicla a glutathione oxidada para sua forma reduzida usando elétrons do NADPH formado pela ação da nicotinamina nucleotídeo transidrogenase ou pela via das pentoses fosfato. A glutathione reduzida também funciona na manutenção no estado reduzido dos grupos sulfidrílica de proteínas, prevenindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (LEHNINGER et al., 2006).

Estudos apresentam relação com dano oxidativo, alteração no estado de metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e comprometimento de seu mecanismo de reparo, instabilidade genômica, apoptose, necrose e alteração nos mecanismos de regulação da proliferação celular (ATSDR, 2007; ROSSMAN, 2003). Os danos observados na molécula de DNA não são causados pela ligação direta do elemento, mas sim pela ação de espécies reativas geradas que poderão causar quebras no DNA, aberrações cromossômicas, formação de adutos e ligações cruzadas (HALLIWELL, 2007).

As espécies trivalentes de arsênio são consideradas tíois reativas, ou seja, possuem elevada reatividade com compostos sulfidrílicos. Assim, irão interagir prontamente com moléculas como glutathione (GSH) e cisteína, com outros sítios de proteínas e enzimas alterando reações bioquímicas essenciais, estado redox das células, podendo ocasionar citotoxicidade (ATSDR, 2007; HUGHES, 2002). O arsênio e o fósforo possuem propriedades físico-químicas similares (HUGHES, 2011). Desta forma, o As(V) pode substituir o fosfato em inúmeras reações bioquímicas, sendo considerado um desacoplador da fosforilação oxidativa na mitocôndria e um substituinte do fosfato inorgânico na formação do ATP. Esta espécie também atua desacoplando o fosfato da glicose-6-fosfato, da bomba de sódio e no sistema transportador de troca iônica das células vermelhas do organismo humano (ATSDR, 2007; HUGHES, 2011).

Figura 1: Estruturas das espécies de arsênio.



Fonte: TIETZ (2008).

4.2 *Drosophila melanogaster*

A DM tem sido amplamente estudada como modelo alternativo no estudo de toxicidade de metais, devido a facilidade de cultivo e manutenção, curto tempo de vida e genoma completamente sequenciado possuindo homologia com mamíferos (SOARES et al., 2017A). Além disso, esse modelo não necessita de aprovação de comitês de ética, algo necessário para outros modelos como ratos e camundongos. Suas características morfológicas nos permitem diferenciar facilmente os machos das fêmeas podendo assim se trabalhar com ambos ou somente um dos sexos.

Conhecidas mais comumente como “mosca da fruta” a *Drosophila melanogaster* do tipo selvagem vive livremente no ambiente, alimentando-se de restos de frutos em decomposição. Sua alimentação baseia-se principalmente em fungos e bactérias, de onde retira os açúcares necessários à sua alimentação. As fêmeas necessitam de uma grande quantidade de glicídios e lêvedos para a produção de ovos e as larvas alimentam-se também de líquidos e leveduras bem como os adultos (ROVENKO et al., 2015).

O desenvolvimento deste inseto, incluindo a fertilização e a formação do zigoto, ocorre dentro das membranas do ovo. Sofre metamorfose completa (figura: ovo, larva, pupa e fase adulta). A duração de seu desenvolvimento varia de acordo com a temperatura. Possuem características tais como: serem amareladas, possuírem receptáculos ventral relativamente longo, testículos espiralados mediamente longos, as larvas não saltam, pentes sexuais presentes nos machos. Nativas das regiões tropicais e subtropicais da Europa, sendo que algumas delas hoje estão amplamente distribuídas (STEIN, 2003).

Esse modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar os efeitos tóxicos de diferentes metais. Em um estudo desenvolvido por Venkareddy e Muralidhara (2015), moscas jovens e adultas foram expostas a diferentes concentrações de chumbo por 7 dias. Ao fim do tratamento foi possível observar que a exposição ao chumbo causou estresse oxidativo e neurotoxicidade nas moscas tratadas. Outros estudos utilizando a DM como modelo experimental também já demonstraram que outros metais como manganês, cobre e ferro podem causar estresse oxidativo e neurotoxicidade (KLIMACZEWSKI et al., 2018; VENKAREDDY et al., 2015; POETINI et al., 2018).

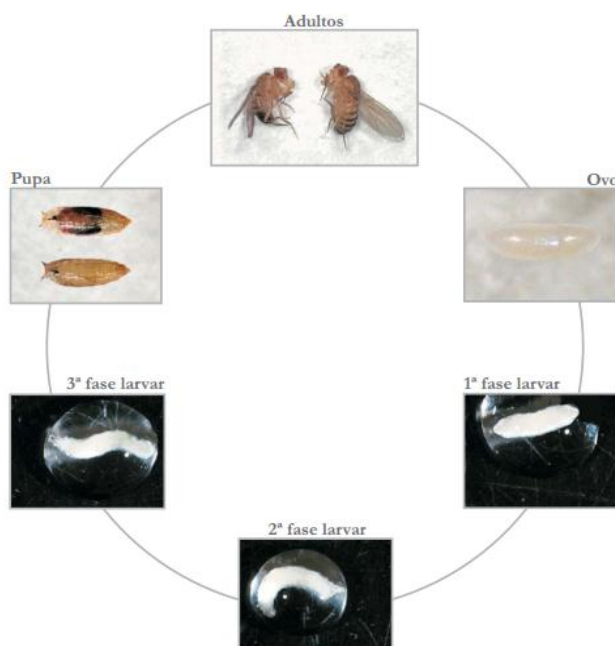


Figura 2: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

Fonte: Estaleiro da Ciência: Guia Prático – Faculdade de Ciências – Universidade do Porto, 2010.

5 METODOLOGIA

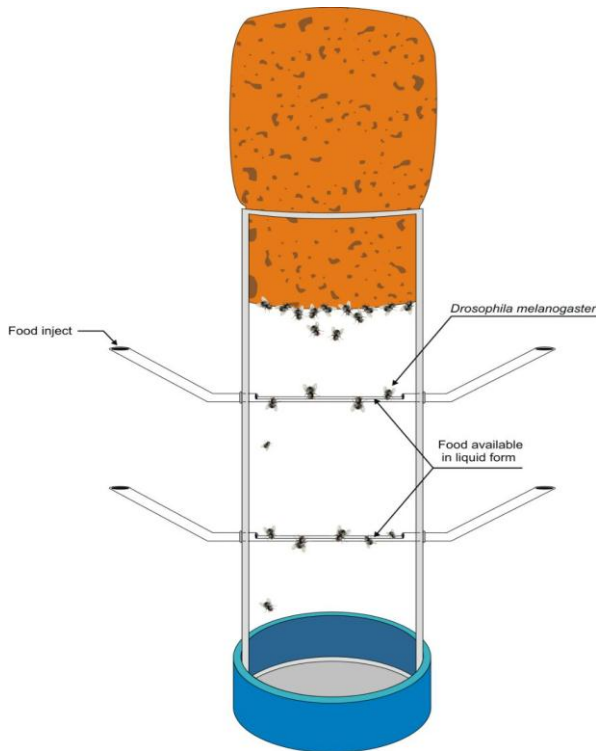
5.1 Cultivo da DM

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), com ciclo de 12 horas claro/escuro (SOARES et al., 2017B).

5.2 Exposição ao As(III)

Moscas machos de 3-4 dias de idade (n=30) foram divididas em 4 grupos: (1) controle, (2) 0,05 mM, (3) 0,1 mM, (4) 0,3 mM As(III). As moscas foram colocadas em frascos para o tratamento com uma alimentação líquida conforme descrito por SOARES et al., (2017A). 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. A exposição foi realizada durante 3 dias.

Figura 3: Sistema de alimentação líquida contínua.



Fonte: SOARES et al., 2017A

5.3 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., 2017A). 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 uma 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.

5.4 Análise da Dopamina e Octopamina

O ensaio da análise da dopamina e octopamina com o homogeneizado cerebral foi realizado de acordo com o procedimento descrito por SOARES et al., (2017B), somente com algumas alterações.

Preparo da amostra (sempre em água com gelo):

- Adicionou-se 385 µL de NaCl 0,09% e 15 µL de HCl 0,5M nas cabeças das 30 moscas dentro do Eppendorf já pesado – vazio e cheio
- Realizou-se a homogeneização das cabeças com essa solução em dois ciclos de 10 segundos (o intervalo entre os ciclos contou-se 10 segundos no gelo)
- Centrifugou-se essa solução por 10 minutos por 10.000 rpm à 4°C
- Filtrou-se o sobrenadante com filtro de PTFE 0,22 µm para um novo Eppendorf - 200 µL do sobrenadante foram colocados dentro de um insert em um tubo de vial para ser analisado por HPLC-DAD.

Método HPLC: Método Isocrático e fase móvel: Água ultrapura + metanol 12,5% - solução em pH3.

Fluxo: De 0 até 5 minutos = 0,8mL/min; de 5 até 6 minutos = 0,85 mL/min; de 6 até 15 minutos = 0,8 mL/min

Comprimento de onda para dopamina e octopamina = 198 nm

Coluna analítica utilizada: Inertsil ODS-3. 5µm; 4,6x250 mm – GL Sciences

Para construção da curva analítica desses neurotransmissores, foram utilizados os seguintes pontos: 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg.L⁻¹

Equipamento: Cromatografia Líquida de alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), do inglês: High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD), modelo: Young Lin (YL 9100) equipado com bomba quaternária e auto sampler.

5.5 Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < *0,05$, $**0,01$ e $***0,001$ em relação ao grupo controle.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água potável é a principal rota de exposição humana ao arsênio. A contaminação de águas subterrâneas por arsênio foi relatada em países como Tailândia, China, Gana, Argentina e Chile, México e Hungria (KAPAJ et al., 2006). Também foi encontrado arsênio em águas subterrâneas no Brasil, que eram utilizadas para o abastecimento humano na região do estado de Minas Gerais, nas cidades de Ouro Preto e Mariana (BORBA et al., 2004).

Nesse estudo o arsênio foi administrado através de uma alimentação líquida para as DM 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, além das análises de dopamina e octopamina. Foi possível observar na figura 3A e 3B que a toxicidade do arsênio é dose dependente, conforme a concentração foi aumentando ocorreu 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).

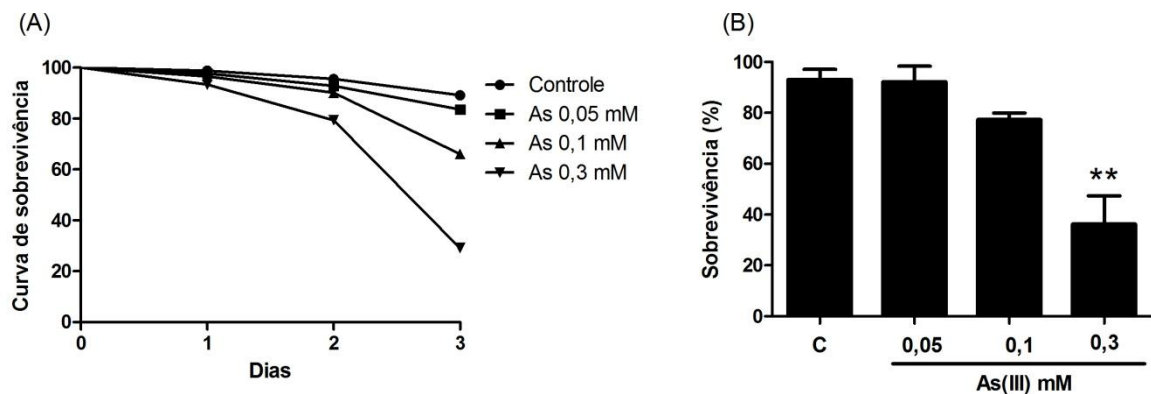


Figura 4: Efeitos da exposição ao arsênio na sobrevivência. *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

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). As DM expostas ao arsênio nas concentrações de 0,1 mM e 0,3 mM demonstraram diminuição na atividade locomotora no ensaio de geotaxia negativa (figura 5A) quando comparados com o grupo controle. Isso 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 grupo controle nesse ensaio. A perda da capacidade locomotora das moscas expostas ao arsênio na concentração de 0,3 mM também foi observada no ensaio do número de cruzamentos. Houve uma redução do número de quadrados percorridos pelas moscas desse grupo (figura 5B) quando comparado ao grupo controle. Conseqüentemente, também houve um aumento do tempo de imobilização dos grupos de concentração 0,1 mM e 0,3 mM (figura 5C) em relação ao grupo controle.

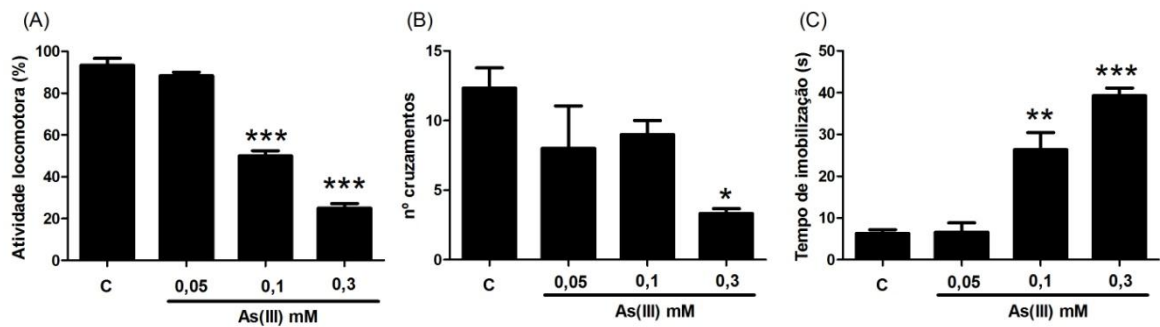


Figura 5: Efeitos da exposição ao arsênio na (A) atividade locomotora, (B) número de cruzamentos e (C) tempo de imobilização. *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

As análises da dopamina e octopamina não tiveram diferenças significativas (figura 6A e 6B), porém há uma tendência na diminuição da dopamina. Isso pode ser um indicativo de que o arsênio pode estar interferindo de alguma forma no sistema nervoso das moscas nos níveis de neurotransmissores, talvez com um tratamento crônico possa se visualizar mais claramente a influência do As(III). 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. Além disso, estudos *in vitro* que utilizaram células cultivadas com concentrações variadas de arsênio demonstraram que o arsênio inibiu a formação de células musculares e neuronais durante a diferenciação, de maneira dose-dependente conforme as concentrações aumentavam, além de reduzir a proliferação de células progenitoras neuronais e o número de neurônios maduros (TYLER & ALLAN, 2014). Essa tendência na diminuição pode estar relacionada à redução da proliferação de células neuronais e redução de neurônios maduros, além de que o arsênio parece ter um impacto na sinalização colinérgica e monoaminérgica, embora os mecanismos não sejam bem compreendidos.

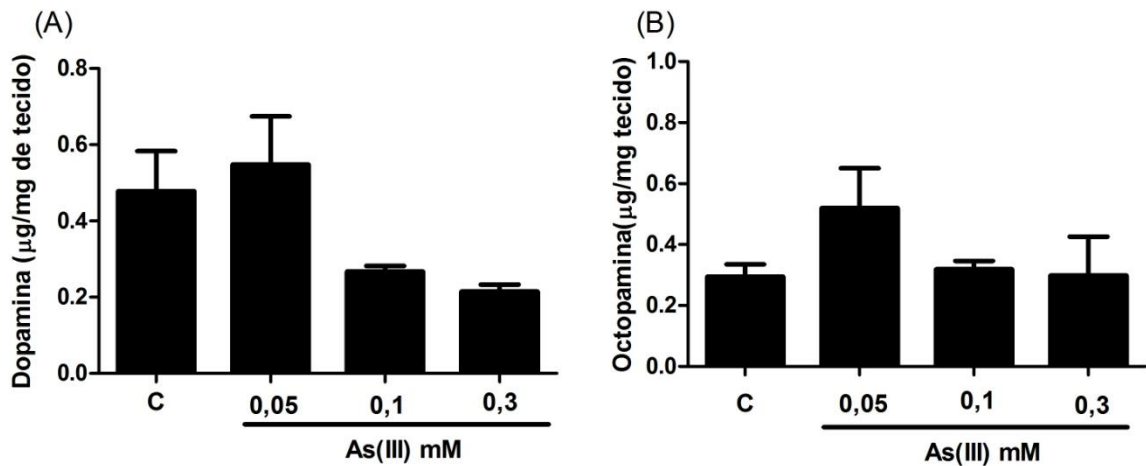


Figura 6: Efeitos da exposição ao arsênio na (A) dopamina e (B) octopamina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, a administração do arsênio através de uma alimentação líquida simulando uma contaminação da água potável, causou uma diminuição da sobrevivência e redução da atividade locomotora nas DM, além de uma tendência na diminuição da concentração da dopamina das moscas expostas a esse metal. Esses resultados podem estar relacionados com a geração de estresse oxidativo causado pela exposição a esse metal, o que pode levar a morte celular e neurotoxicidade. Por fim, a DM mostrou-se que é um modelo eficaz para o estudo da neurotoxicidade através da simulação de uma contaminação da água potável por As(III).

7 REFERÊNCIAS

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

ATSDR, **Agency for toxic substances and disease registry**. *Toxicological profile for Arsenic*. Atlanta, 2007.

BIANCHINI, M. C.; GULARTE, C. O. A.; ESCOTO, D. F.; PEREIRA, G.; GAYER, M. C.; ROEHRS, R.; PUNTEL, R. L.; **Peumus boldus (boldo) aqueous extract present better protective effect than boldine against manganese-induced toxicity in *Drosophila melanogaster***. *Neurochemical research*, 41(10), 2699-2707, 2016.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E.; TIETZ **Fundamentos de Química Clínica**. 6. Ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda, cap. 32, p. 621, 2008.

HALLIWELL, B.; **Oxidative stress and cancer: have we moved forward**. *Biochemical*, 401 (1), p. 1-11, 2007.

HUGHES, M.; **Arsenic toxicity and potential mechanisms of action**. *Toxicology Letters*, 133 (1), p. 1-16, 2002.

HUGHES, M.; BECK, B.; CHEN, Y.; **Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective**. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 123 (2), 305-32, 2011.

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

KLIMACZEWSKI, C. V.; ECKE, A.; PICCOLI, B.; ASCHNER, M.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T. **Peumus boldus attenuates copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 97, p. 1-8, 2018.

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 g-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*.** Neurotoxicology Research, v. 21, p. 281-290, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger princípios de bioquímica.** 4. Ed. São Paulo: SAVIER, 2006.

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

POETINI, M. R.; ARAUJO, S. M.; DE PAULA, M. T.; BORTOLOTTI, V. C.; MEICHTRY, L. B.; DE ALMEIDA, F. P.; JESSE, C. R.; KUNZ, S. N.; PRIGOL, M. **Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease.** Chemico-Biological Interactions, v. 279, p. 177-186, 2018.

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

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

ROSMAN, T.; **Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach.** *Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533 (1-2), p. 37-65, 2005.

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*.** *Analytical Biochemistry*, v. 537, p. 60-62, 2017A.

SOARES, J. J.; RODRIGUES, D. T.; GONÇALVES, M. B.; LEMOS, M. C.; GALLARRETA, M. S.; BIANCHINI, M. C.; GAYER, M. C.; PUNTEL, R. L.; ROEHRS, R.; DENARDIN, E. L. G.; **Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* : Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 95, p. 245-251, 2017B.

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, 2014.

VENKAREDDY, L. K.; MURALIDHARA. **Potential of casein as a nutrient intervention to alleviate lead (Pb) acetate-mediated oxidative stress and neurotoxicity: First evidence in *Drosophila melanogaster*.** NeuroToxicology, v. 48, p. 142-151, 2015.

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.