

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DE CONTAMINANTES NA SUB-BACIA DO RIO SIRIRI (SE), POR MEIO DO TESTE SMART EM ASA DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Jessyca Adelle Silva Santos¹, Julio Roberto Araujo de Amorim², Luciana Coêlho Mendonça³, Marcus Aurélio Soares Cruz⁴, Poliana Santos⁵, Ricardo de Aragão⁶, Thalyta Linacher Guimarães Santos Rodrigues⁷ & Silmara de Moraes Pantaleão⁸

RESUMO: O potencial lesivo ao DNA que alguns contaminantes de origem antrópica podem desempenhar, evidencia o risco proporcionado aos ecossistemas aquáticos, quando de alguma forma estes compostos atingem os cursos d'água. O presente estudo apresenta-se como parte do monitoramento das águas da sub-bacia do Rio Siriri (SE), consistindo na verificação da presença de contaminantes com potencial mutagênico e/ou recombinogênico, por meio do Teste SMART em células da asa de *Drosophila melanogaster*. Foram delimitados quatro sítios para coleta de água, realizada no período correspondente a estação chuvosa do ano de 2013. Linhagens de *D.melanogaster* portadoras dos genes para pelos mutantes foram submetidas à dois tipos de cruzamentos: Cruzamento padrão (ST) e cruzamento com alta capacidade de bioativação (HB), sendo a progênie resultante tratada em meio de cultura contendo 5 ml das amostras de água. Os resultados, mostraram-se positivos em três dos quatro pontos de amostragem para o cruzamento ST. As frequências encontradas para manchas simples pequenas (MSP) e total de manchas (TM), nos pontos 1, 2 e 4 apresentaram valores significativamente maiores que os encontrados no tratamento com água ultra-pura. Os dados obtidos fornecem um indicativo de impacto nas localidades e evidenciam a presença de contaminantes com ação direta sobre o DNA.

Palavras-chave: Impacto ambiental, Mutagênese, mosca das frutas.

INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos têm sido depósito de diferentes tipos de descargas antropogênicas, uma vez que são os primeiros a receber dejetos contendo poluentes de várias fontes (Ohe *et al.*, 2004). A descarga, acúmulo e persistência de efluentes constituem uma ameaça à vida biológica, uma vez que eles são frequentemente tóxicos e sua presença pode degradar seriamente o ambiente (White & Rasmussen, 1998; Fleeger *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2010). Como efeito, esses agentes podem interferir em vários níveis do sistema biológico de organismos, promovendo alterações no desenvolvimento, indução a carcinogênese e redução da variabilidade genética que podem surgir como danos individuais ou transferíveis às gerações futuras (Dickmann *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2011). A exposição a um genotóxico compromete primeiramente a integridade do DNA celular, o que torna o monitoramento por meio de testes biomarcadores eficiente na detecção de alterações como mutações, anormalidades cromossômicas grosseiras, erros na síntese do DNA, aductos de DNA e quebras de fitas simples ou duplas, tendo cada um deles sensibilidade e especificidade variáveis (Savva, 1998).

O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), em células de asas de *Drosophila melanogaster* apresenta-se como um teste capaz de detectar agentes indutores de mutagenicidade, bem como de ação recombinogênica, prómutágenos e procarcinógenos (Dihl *et al.*, 2014). Seu emprego em amostras ambientais tem mostrado alta sensibilidade para detectar agentes genotóxicos ambientais em

¹ Graduanda, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Avenida Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE, CEP: 49100-000, adelle.silva@hotmail.com ([apresentador do trabalho](#));

² Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Avenida Beira Mar 3250, Jardins, Aracaju, SE, CEP 49025040, julio.amorim@embrapa.br;

³ Professora, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Sergipe, lumendon@uol.com.br;

⁴ Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, marcusacruz@gmail.com;

⁵ Mestranda do curso de pós-graduação em Ecologia e Conservação da Caatinga, Universidade Federal de Sergipe, polianasantosbio@gmail.com;

⁶ Professor, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Sergipe, ricardoaragao@yahoo.com

⁷ Graduanda, Departamento de Biologia, UFS, thalyta.bio@hotmail.com;

⁸ Professora, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, spleao@yahoo.com.br.

partículas aéreas, amostras de água (Delgado-Rodriguez *et al.*,1999; Amaral *et al.*, 2005) e sedimento (Pantaleão, 2007).

A sub-bacia do Rio Siriri, localizado no Estado de Sergipe – Brasil é um importante afluente do Rio Japarutuba, situando-se na sua porção oeste. A ocupação das margens ao longo de toda a sub-bacia, principalmente pela expansão habitacional, agricultura e agropecuária tem sido responsável pela alteração da paisagem e introdução de compostos de diversas origens, o que durante anos vem conferindo à área um quadro visível de degradação. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de possíveis agentes genotóxicos disponíveis na água do Rio Siriri por meio teste SMART em células de asas de *D. melanogaster*.

MATERIAIS E MÉTODO

A coleta de água concentrou-se na sub-bacia do Rio Siriri – SE no mês de abril de 2013, sendo quatro, os pontos de amostragem delimitados ao longo da sub-bacia: Ponto 1 (10° 31' 46.4" S e 37° 6' 18.9" W), Ponto 2 (10° 36' 34.2" S e 37° 5' 54.6" W), Ponto 3 (10° 38' 15.4" S e 37° 5' 18.5" W) e Ponto 4 (10° 41' 2.2" S e 37° 4' 45.6" W). Após a coleta as amostras foram acondicionadas em recipiente fechado e transportadas para o Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais – UFS, onde foram armazenadas até a realização dos tratamentos.

Na execução do teste SMART de asa foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* 1) multiple wing hairs (mwh):*mwh/mwh*; 2) flare-3 (*flr³/In (3LR)TM3, rip^D sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*; e 3) ORR; flare-3 (*ORR/ORR; flr³/In (3LR)TM3, rip^D sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*). Considerando-se uma proporção de 2:1 para fêmeas e machos, foram realizados dois tipos de cruzamento: cruzamento padrão (ST) que identifica compostos de ação direta e cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) capaz de identificar compostos que exigem metabolização para o desempenho de atividade mutagênica (Graf & Van Schaik, 1992; Graf *et al.*,1989). As larvas resultantes destes cruzamentos foram então, submetidas à tratamento em meio contendo 1,5g de purê de batata e 5ml da amostra de água para cada sitio do rio Siriri, até o fim do desenvolvimento larval.

Após este período, os adultos emergentes foram coletados e armazenados em etanol 70%. Em seguida as lâminas foram confeccionadas a partir das asas de 30 indivíduos para cada ponto, utilizando-se como fixador a solução de Faure (30g de goma arábica, 20mL de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50mL de água). As asas foram então, submetidas à secagem em placa aquecedora a 25°C por um período de quatro dias (1h/dia). Para a análise dos pelos mutantes, utilizou-se o microscópio óptico (400x). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman.



Figura 1. Pontos de coleta. Em 1 área a jusante de usina de álcool e açúcar; 2 área sob influência da estação Siriri (ANA); 3 e 4 áreas com poços de petróleo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de mutação em *D. melanogaster* para os cruzamentos ST e HB está demonstrada na **Tabela 1**. As frequências de manchas obtidas nos controles negativo e positivo

de ambos os cruzamentos apresentaram valores dentro do esperado por Graf & Van Schaik (1992).

Dentre os pontos de amostragem, os valores demonstraram-se positivos para os pontos 1, 2, e 4, apenas no cruzamento padrão (ST) o que indica a presença de genotoxinas nestas áreas. Como descrito por Andrade & Lehmann (2003) valores positivos expressos pelo número total de manchas (TM) fornecem dados quantitativos sobre o potencial genotóxico do composto; já os valores positivos para manchas simples pequenas (MSP) caracterizam tanto eventos recombinogênicos quanto mutações pontuais, mutações cromossômicas do tipo aneuploidia e/ou grandes deleções, assim como indica um efeito tardio do composto, que promove danos ao DNA apenas no estágio final do desenvolvimento da pupa.

Tabela 1. Frequência de manchas nas asas de *D. melanogaster*, descendentes do tipo trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) originários do cruzamento padrão (ST) e cruzamento com alta capacidade de bioativação (HB).

Tabela de resultados com diagnóstico estatístico pelo teste binomial condicional (Kastembaum e Bowman)							
Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	
		MSP (1-2 cêls) ^b m = 2	MSG (>2 cêls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2		
Cruzamento padrão <i>mwh/flr³</i>							
Contr. Neg.	20	0,05 (01)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,10 (02)	2	
URETANO	20	1,70 (34) +	0,35 (07) +	0,20 (04) i	2,25 (45) +	45	
P1	30	0,37 (11) +	0,10 (03) i	0,03 (01) i	0,50 (15) +	15	
P2	30	0,43 (13) +	0,10 (03) i	0,00 (00) i	0,53 (16) +	16	
P3	30	0,20 (06) i	0,10 (03) i	0,03 (01) i	0,33 (10) i	10	
P4	30	0,37 (11) +	0,07 (02) i	0,03 (01) i	0,47 (14) +	14	
Cruzamento com alta capacidade de bioativação <i>mwh/flr³</i>							
Contr. Neg.	20	0,30 (06)	0,10 (02)	0,05 (01)	0,45 (09)	9	
URETANO	10	8,30 (83) +	2,90 (29) +	1,60 (16) +	12,80 (128) +	128	
P1	27	0,41 (11) i	0,04 (01) i	0,00 (00) i	0,44 (12) i	12	
P2	30	0,20 (06) i	0,00 (00) i	0,03 (01) i	0,23 (07) -	7	
P3	30	0,13 (04) -	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,13 (04) -	4	
P4	30	0,07 (02) -	0,10 (03) i	0,03 (01) i	0,20 (06) -	6	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$; ^bIncluindo manchas simples *flr3* raras; ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

CONCLUSÕES

1. A avaliação por meio do teste SMART demonstra a presença de compostos com potencial lesivo ao DNA na área em estudo.

2. A atividade mutagênica verificada pode ser originária de um composto isolado ou do efeito sinérgico entre os contaminantes disponíveis.

3. Com a continuidade do monitoramento da área, espera-se que os próximos resultados confirmem e/ou esclareçam a presença de genotoxinas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi desenvolvido a partir do convênio FINEP 1830/10 e contou com a parceria da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE), Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos – SEMARH, Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Japaratinga, Instituto de Tecnologia e Pesquisas do Estado de Sergipe – ITPS e EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. Os autores agradecem à Profa. Dra. Jeanylle Nilin (UFS) pela participação nas coletas e ao apoio técnico de Márcia Barreto (UFS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL V.S., SILVA R.M., REGULY M.L., ANDRADE H.H.R. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.*, 583: 67-74, 2005.

ANDRADE, H.H.R. & LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagenese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ANDRADE, H.H.R.; DIHL, R.R.; JACOCIUNAS, L.V.; LEHMANN, M.; REGULY, M.L. Recombinogenic activity of water and sediment from Sinos River and Araçá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. *Science of the Total Environment*, 408: 571–577, 2010.

AZEVEDO, J.S.; FERNANDES, W.S.; DIAS, J.F.; RIBEIRO, C.A.O. Liver Damages And Nuclear Abnormalities In Erythrocytes Of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidae) From Two Beaches In Southeast Of Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59(2):163-169, 2011.

DELGADO-RODRIGUEZ A, ORTÍZ-MARTELLO R, VILLALOBOS-PIETRINI R, GÓMEZ-ARROYO S, GRAF U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 39:33-43, 1999

DICKMANN M., WALDMANN P., SCHNURSTEIN A., GRUMMT T., BRUNDBECK T. & NAGEL, R. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat Toxicol.* 68: 27-37, 2004.

DIHL, R.R. In vivo and in vitro genotoxicity assessment of 2-methylisoborneol, causal agent of earthy–musty taste and odor in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100: 282–286, 2014.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R. & NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 317:207–233, 2003.

FREI, H. e WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203:297-308, 1988.

GRAF U, FREI H, KÄGI A, KATZ AJ, WÜRGLER FE. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, 222:359-373,1989.

GRAF U, VAN SCHAİK N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 271:59-67, 1992.

OHE T.; WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.*, 567:109–149, 2004.

PANTALEAO, S. M. ; ALCANTARA, A.V; ALVES, JPH; PAVANIN, LAo ; GRAF, U. ; REZENDE, AA; VALADARES, BLB ; GRAGIORGE, EJ ; SOUZA, NC ; GUTERREZ, Z R ; SPANÓ, MA . Assessing the impact of pollution on the Japarutuba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48:71-157, 2007.

SAVVA, D. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41:103-6, 1998.

WHITE, P. A. & RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.*, 410:223-236, 1998.