

TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADA À BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO POTI EM TERESINA-PI UTILIZANDO O TESTE DE DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA EM *Drosophila melanogaster* – SMART

Hudson Fernando Nunes MOURA (1); Nilmara de Oliveira ALVES (2); Viviane Souza do AMARAL (3);

(1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, Rua Equador, 250, Cidade Nova, Teresina-PI, 64017-600, e-mail: nandonunez@yahoo.com.br

(2) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, e-mail: nilmara1@yahoo.com.br

(3) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, e-mail: vi.mariga@gmail.com

RESUMO

A bacia do rio Poti começa no Ceará, tendo 16.901 Km² ou 31,7% de sua área total pertencente a esse Estado. Segundo PERH, a capacidade de acumulação de águas superficiais dessa parte da bacia atinge 631,35 Km³, que respondem por mais de 70% do potencial de preservação. O presente estudo está centrado na avaliação experimental de amostras de água superficial coletadas em seis pontos distribuídos no Rio Poti que sofrem influência de atividade urbana. Foi realizada uma coleta representativa no período da seca: junho de 2007. Tais amostras foram avaliadas através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Mitótica (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Nas condições experimentais aplicadas, as amostras dos seis pontos de coleta, no período da seca, não induziram lesões no material genético das células somáticas, relacionadas com: mutação gênica e recombinação, uma vez que as frequências de manchas não foram, significativamente, superiores às aquelas observadas nos controles negativos (água destilada). Cabe salientar que esses dados ainda são preliminares e referentes a apenas uma coleta. Desta forma, os dados obtidos pelo SMART podem servir como um alerta à poluição por genotoxinas pelas águas do Rio Poti - o que comprometeria o abastecimento de água potável proporcionado por esse rio.

Palavras-chave: SMART, rio Poti, Genotoxicidade, *Drosophila melanogaster*, poluentes.

1. INTRODUÇÃO

A Genética Toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e, mais recentemente, eventos aneuploidogênicos. Devido o aprimoramento dessa área, foi possível o desenvolvimento de sistemas-testes voltados para a detecção de um novo parâmetro genético – a recombinação mitótica – que poderia estar envolvida na promoção de diversos tipos e câncer(Andrade *et al.*, 2004).

A demanda por água de boa qualidade é um dos maiores desafios da atualidade. O crescimento urbano acelerado - representado por intenso êxodo rural e assentamento desordenado - a maior necessidade de alimentos e a conseqüente intensificação das atividades rurais – com consumo de cerca de 70% da água de boa qualidade para irrigação - assim como a industrialização e a decorrente liberação de dejetos não tratados nos corpos de água são inquestionavelmente os maiores responsáveis pela poluição dos recursos hídricos (Grassi, 2001).

A bacia do rio Poti localiza-se, aproximadamente, entre as coordenadas 4°20' e 6°56' de latitude sul e entre 40°05' de longitude a oeste de Greenwich. A área da bacia é da ordem de 36.430 km², correspondente a 14,5% da área total do Estado.

O rio Poti nasce no estado do Ceará, pela junção dos riachos Santa Maria e algodões sobre rochas cristalinas pré-cambrianas, nas proximidades da cidade de Algodões indo ao norte, num percurso em torno de 105 km, até a cidade de Crateús (CE). Daí, o rio segue para o noroeste, por um trecho aproximado de 20 km, até receber, pela sua direita, o rio Jatobá, vindo do leste, partindo então, em direção leste-oeste, em um percurso de 20 km até a cidade de Ibiapaba. Nesta região elevada chamada Serra Grande esculpiu a sua entrada na bacia Sedimentar do Parnaíba, até cruzar a fronteira entre o estado do Ceará e Piauí. Neste estado, o rio Poti continua rumo oeste até a cidade Olho d'água, onde muda sua direção para o norte, por influências geoestruturais, recebendo pela margem direita do lado nordeste, o rio Macambira (IBGE, 1996).

A região de Teresina encontra-se inserida na bacia do Parnaíba ao qual é sempre alimentada por águas subterrâneas do aquífero da Serra Grande, cuja formação se dá pelo arenito saraiva da formação Pedra de Fogo. Os mananciais hídricos subterrâneos são de grande relevância, porque possuem diversas condições de aproveitamento, onde suas águas são, em geral, de boa potabilidade.

No período chuvoso, há formação de inúmeras lagoas que, às vezes, se estendem por diversos bairros, devido à existência de depressões naturais nas áreas marginais dos rios Parnaíba e Poti. Quando chega o inverno seco, suas águas abaixam e chegam a formar praias, chamadas 'coroas'.

O rio Poti é um dos maiores efluentes do rio Parnaíba; sua bacia possui uma extensão total referente a 52.370 km² sendo 38.797km² localizado no estado do Piauí. O rio Poti que possui como principais afluentes pela margem esquerda, os rios Berlangas e Sambito e, pela margem direita pelos rios Canudos e Capivara.

O clima predominantemente na área, segundo Koeppen, é do tipo Aw, tropical, quente e úmido, com chuvas de verão. No lado sudeste, o clima é do tipo Bsh, clima quente e semi-árido, com chuva no verão. A precipitação média anual é da ordem de 1.250 mm, sendo o trimestre fevereiro/abril o mais chuvoso, com aproximadamente 56% do total anual, destacando-se o mês de março com cerca de 20% do total precipitado anualmente. O trimestre mais seco é julho/setembro, chovendo somente cerca de 3% do total anual. A temperatura média anual situa-se em torno dos 27,9° C, variando com a estação chuvosa. A média das máximas mensais está na faixa dos 30° C, enquanto a média das mínimas fica em torno de 26,7° C.

Diante disto, esse trabalho pretende avaliar os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais do rio Poti em certos pontos urbanos de Teresina-PI, pelo SMART. Tendo em vista, a deficiência de informação a respeito da genotoxicidade das águas do rio Poti nestes pontos, após receber efluentes dos esgotos sanitários e agroindustriais.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

As amostras foram obtidas de corpos d'água que sofrem contínua influência de efluentes industriais de dejetos urbanos, de atividades agrícolas. Foram amostrados aproximadamente 500 ml de água de uma profundidade de 20 cm da superfície, e armazenados em garrafas de vidro, devidamente identificadas e vedadas. As amostras foram então conservadas a 4°C por até quatro dias, divididas em alíquotas de 50 ml e congeladas a -20°C (Vargas *et al.*, 1993).

Tais amostras de águas superficiais foram coletadas em seis pontos de referência urbana, monitorados por GPS – com o auxílio do Corpo de Bombeiros – onde foram auferidos os valores físico-químicos na estação da seca (junho de 2007) conforme ilustrado na tabela 1.

Pontos de Coleta	Referências
1	Encontro dos rios Poti e Parnaíba
2	Ponte dos Cem Dias
3	Bairro Mocambinho
4	Ponte do bairro Primavera
5	Hospital Meduna
6	Ponte Juscelino Kubtscheck

Tabela 1 – Pontos de coleta

2.2 SMART

Dentre os bioensaios ainda pouco utilizados para avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais, encontra-se o teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática - SMART - em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. O SMART, além de utilizar um organismo experimental eucarioto, com estreita similaridade genética e bioquímica quando comparado aos mamíferos (St. John e Xu, 1997), possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas – representadas por eventos aneugênicos e clastogênicos – e/ou recombinação somática (Vogel e Zijlstra, 1987). Permite, também, a detecção de genotoxinas de ação direta, assim como daquelas que, somente quando metabolizadas exercem sua atividade genotóxica (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995).

O SMART, descrito por Graf *et al.*, (1984), tem sido empregado para investigar genotoxicidade de compostos simples (Frölich e Würgler, 1990a) de várias origens (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Sousa *et al.*, 2003; Sarakaya e Çakir, 2005). A versatilidade do SMART permite avaliar compostos estáveis e instáveis, como também possibilita testar não só compostos químicos, mas também compostos dissolvidos em água e no ar (Graf *et al.*, 1984). O SMART se mostrou ser altamente sensível para descobrir os agentes genotóxicos presentes no ambiente aquático (Amaral *et al.*, 2006), inclusive em águas fluviais (Pantaleão *et al.*, 2007).

A análise dos possíveis danos causados é feita pela observação de grupos celulares (manchas) com fenótipo marcador específico (*flr³* ou *mwh*), que se manifestam visualmente na forma de tricomas mutantes. Estes fenótipos expressam-se devido à perda da heterozigose, induzida pelos diferentes tipos de eventos genotóxicos: mutação gênica, cromossômica e/ou recombinação mitótica. Enquanto o número de manchas fornece resultados quantitativos sobre os danos induzidos, os tipos de manchas dão informações sobre a natureza da lesão que os originou.

Aproximadamente 400 compostos – documentados em aproximadamente 100 publicações - já foram analisados através do teste SMART de asa, sendo, na sua maioria, produtos puros. Da mesma forma, misturas complexas também já foram testadas, dentre elas algumas bebidas – alcoólicas ou não – extratos de chás, diferentes tipos de cafés, vinhos e conhaque (Andrade *et al.*, 2004). Este bioensaio foi ainda aplicado para investigar o potencial genotóxico de partículas aéreas (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1999). Os

resultados destes estudos – que apresentaram uma boa correlação com aqueles obtidos através do Teste de Ames - demonstraram a sensibilidade do teste SMART em relação à fração orgânica de amostras ambientais (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995).

As linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas no teste são as seguintes:

- flr^3 - $flr^3/In(3LR)TM3,ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$
- **ORR;** flr^3 – **ORR;** $flr^3/In(3LR)TM3,ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aabx^{34e}\ e\ Bd^S$
- *mwh* - *mwh/mwh*

2.2.1 Cruzamentos

Nesta abordagem experimental foi empregado tanto o cruzamento padrão no qual fêmeas virgens flr^3 serão cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450 como o cruzamento aprimorado, que se baseia no cruzamento de fêmeas virgens ORR; flr^3 com machos *mwh*. As fêmeas ORR; flr^3 são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon (R) resistente ao DDT (Dapkus e Merrell, 1977; Fröllic e Würigler, 1989). Um gene principal (R), presente no cromossomo 2, juntamente com genes menores existentes no cromossomo 1, confere a esta linhagem alto nível constitutivo de citocromo P450 (Hällstron e Blanck, 1985).

Estes cruzamentos originam larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3:

- **larvas *mwh* +/+ flr^3** - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e flr^3 .
- **larvas *mwh* +/*TM3*,*Bd*^S** - heterozigotas para o cromossomo *TM3*, necessário para balancear o marcador flr^3 , já que este é letal em homozigose (Garcia-Bellido e Dapena, 1974). Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd*^S - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos que apresentam asas com formato normal.

2.2.2 Análise Microscópica

São analisadas as asas de pelo menos 20 indivíduos de cada sexo, por ponto de tratamento, observando-se os fenótipos dos tricomas ou pêlos existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas dos indivíduos trans-heterozigotos. Estes pêlos originam-se de células dos discos imaginais de larvas de terceiro estágio que foram expostas aos diferentes tratamentos. A ocorrência - ao longo do desenvolvimento larval - de alterações no material genético destas células leva ao aparecimento, nas asas dos adultos, de manchas com os fenótipos pêlos múltiplos e/ou pêlos com a base alargada - refletindo a expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou flr^3 , respectivamente. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou flr^3 , quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pêlos múltiplos (*mwh*), como pêlos com a base alargada (flr^3) estão presentes dentro de uma mesma mancha. São considerados clones independentes aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (Graf *et al.*, 1984).

2.2.3 Análise Estatística

As diferentes diluições serão comparadas com seus respectivos controles negativos. A análise estatística será feita através do programa de computador SMART 4 MAC 2.0 (Zordan, não publicado) que emprega o teste de X^2 para proporções e segue o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

3. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos a partir do emprego desta metodologia caracterizaram o rio Poti como destituído de ação genotóxica direta e indireta, já que foram analisados os indivíduos provenientes do cruzamento padrão e do

aprimorado (Tabelas 1 e 2 abaixo). Estes achados sugerem que, nas condições experimentais aplicadas, as amostras dos seis pontos de coleta, referentes a estação da seca, não induziram lesões no material genético das células somáticas, relacionadas com: mutação gênica e recombinação, uma vez que as frequências das diferentes categorias de manchas não foram significativamente superiores àquelas observadas nos controles negativos (água destilada). Cabe salientar que esses dados ainda são preliminares e referentes a apenas uma coleta.

Genótipos	N. de	Manchas por indivíduo (n°. de manchas) diag. estatístico										
e Conc.	Indiv.	MSP			MSG			MG			TM	
(mM)	(N)	(1-2 céls)^b			(>2 céls)^b							
		m = 2			m = 5			m = 5			m = 2	
<i>mwh/flr³</i>												
Contr. Neg.	20	0,75	(15)		0,20	(04)		0,00	(00)		0,95	(19)
PONTO1	20	0,45	(09)	-	0,25	(05)	i	0,00	(00)	I	0,70	(14)
PONTO 2	20	0,50	(10)	-	0,10	(02)	i	0,00	(00)	I	0,60	(12)
PONTO 3	20	0,70	(14)	-	0,15	(03)	i	0,00	(00)	I	0,85	(17)
PONTO 4	20	0,65	(13)	-	0,05	(01)	-	0,00	(00)	I	0,70	(14)
PONTO 5	20	0,45	(09)	-	0,10	(02)	i	0,05	(01)	I	0,60	(12)
PONTO 6	20	0,00	(00)	-	0,00	(00)	-	0,00	(00)	I	0,00	(00)

^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. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr3*.

Tabela 1 – Diagnóstico estatístico das frequências de indução de clones mutantes após tratamento das larvas provenientes do cruzamento padrão com amostras de água do Rio Poti coletadas em junho de 2007.

Genótipos	N. de	Manchas por indivíduo (n°. de manchas) diag. Estatístico										
e Conc.	Indiv.	MSP			MSG			MG			TM	
(mM)	(N)	(1-2 céls)^b			(>2 céls)^b							
		<i>m = 2</i>			<i>m = 5</i>			<i>m = 5</i>			<i>m = 2</i>	
<i>mwh/flr³</i>												
Contr. Neg.	20	1,15	(23)	-	0,30	(06)	-	0,00	(00)	-	1,45	(29)
PONTO 1	20	1,00	(20)	-	0,15	(03)	-	0,05	(01)	i	1,20	(24)
PONTO 2	20	0,80	(16)	-	0,15	(03)	-	0,00	(00)	i	0,95	(19)
PONTO 3	20	0,70	(14)	-	0,00	(00)	-	0,05	(01)	i	0,75	(15)
PONTO 4	20	1,05	(21)	-	0,10	(02)	-	0,05	(01)	i	1,20	(24)
PONTO 5	20	1,00	(20)	-	0,15	(03)	-	0,05	(01)	i	1,20	(24)
PONTO 6	20	0,55	(11)	-	0,00	(00)	-	0,00	(00)	i	0,55	(11)

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (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. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene mutante *flr3*.

Tabela 2 – Diagnóstico estatístico das frequências de indução de clones mutantes após tratamento das larvas provenientes do cruzamento aprimorado com amostras de água do Rio Poti coletadas em junho de 2007.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Coletivamente, uma gama de compostos com potencial tóxico e/ou genotóxico interage entre si formando misturas complexas que se distribuem nos corpos hídricos. Esta interação entre diferentes genotoxinas pode levar a efeitos aditivos, sinérgicos e até mesmo antagonistas (Müller *et al.*, 2002). Em função disto é crucial o uso de bioensaios em genotoxicidade para a avaliação da toxicidade genética de mananciais que recebem descargas contínuas de efluentes urbanos, industriais e/ou agrícolas. Com a perspectiva de estimar o risco genético induzido por misturas heterogêneas presentes nas amostras de água do rio Poti, faz-se necessária a continuação do teste SMART para a análise dos efeitos tóxico-genéticos de amostras totais de origem urbana, industrial e/ou rural.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí (CEFET-PI) que, através da Gerência de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão (GPPE), deliberou apoio financeiro concedido através da bolsa de iniciação científica, contribuindo para o desenvolvimento tecnológico e científico, ampliando os horizontes da pesquisa na instituição.

6. REFERÊNCIAS

Amaral VS, Sinigaglia M, Reguly ML, Andrade HHR. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the Drosophila Wing-Spot Test. **Environmental Pollution** 139: 469-476. 2006.

Andrade HHR, Reguly ML, Lehmann, M Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson DS (ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols*. **Humana Press Inc.**, Totowa, pp 389-412. 2004.

- Dapkus,J. and Merell,D.J. Chromosomal analysis of DDT-resistence in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, **87**, 685-697. 1977.
- Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Marttelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res** 341: 235-247. 1995.
- Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Marttelo 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.
- Frei,H. and Würgler,F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutat Res**. 203, 97-308. 1988.
- Frölich A. and Würgler FE. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutat. Res.**, 216, 179-187. 1989.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen** 6: 153-188. 1984.
- Grassi MT. As águas do planeta Terra. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, Edição Especial, pp 31-40. 2001.
- Guzmán-Rincón J, Graf U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterwort FM et al., editors. **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: Plenum Press. p169-181. 1995.
- Hällstron,I. and Blanck, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. **Chem-Biol Interact**, .56: 157-171. 1985.
- Müller P, Stock T, Bauer S, Wolff I. Genotoxicological characterization of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. **Mutat Res** 515: 99-109. 2002.
- Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Pavanin LA, Graf U, Rezende AAA, Valadares BLB, Fragiorge EJ, Souza NC, Guterrez ZR, Spanó MA. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* Wing Spot Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 48(2): 96-105. 2007.
- Sarakaya R, Çakir S. Genotoxicity using of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 20: 424-430. 2005.
- Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U. Absence of a genotoxicity of a phytotherapeutic extracts from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology** 41: 293-299. 2003.
- St. John MAR, Xu T. Insights from model systems-Understanding human cancer in a fly? **Am J Hum Genet** 61: 1006-1010. 1997.
- Vargas VMF, Motta VEP, Henriques JAP. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutat. Res** 319: 31-45. 1993.
- Vogel EW, Zijlstra JA. Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res** 182: 243-264. 1987.