



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL - PPGBA**

CHARLES DO NASCIMENTO SILVA

**POTENCIAL EFEITO TÓXICO-GENÉTICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*
SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS E
RADÔNIO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Recife

2020

CHARLES DO NASCIMENTO SILVA

**POTENCIAL EFEITO TÓXICO-GENÉTICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*
SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS E
RADÔNIO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração:
Zoologia Aplicada

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Recife
2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Charles do Nascimento

Potencial efeito tóxico-genético em *Drosophila melanogaster* submetida à contaminação ambiental por metais pesados e radônio no Semiárido brasileiro / Charles do Nascimento Silva – 2020.

66 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Claudia Rohde

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2020. Inclui referências.

1. *Drosophila melanogaster* 2. Genotoxicidade 3. Radiação natural I. Rohde, Claudia (orient.) II. Título

595.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 167

CHARLES DO NASCIMENTO SILVA

**POTENCIAL EFEITO TÓXICO-GENÉTICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*
SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS E
RADÔNIO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração:
Zoologia Aplicada

Aprovada em: 31/08/2020

Orientadora: Dra. Claudia Rohde
Centro Acadêmico de Vitória – UFPE

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof. Dr. **Simão Dias de Vasconcelos Filho** – FPE

Prof. Dr. **Cristiano Aparecido Chagas** – FPE

Profa. Dra. **Ana Garcia Lauer Garcia** – UFPE

Dedico este trabalho aos meus familiares em especial a minha mãe Antônia Maria Tavares da Silva, minha esposa Andresa Maria da Silva e a todas as pessoas que acreditaram neste sonho e depuseram em mim sua fé, esperança e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Ti, meu bondoso Deus, eu quero primeiramente agradecer por ser espírito e verdade em minha vida, por depositar Sua inteira bondade e amor, por me dar forças para vencer os obstáculos da vida e chegar onde estou, por sentir sua presença em todos os momentos de dificuldade, aflição e principalmente de alegria e por ser fiel com as suas promessas em minha vida.

Agradeço a minha mãe Antônia, que me acolheu primeiramente com a adoção, e a minha irmã adotiva Socorro, pois guiaram-me pelo caminho da educação para que eu me tornasse um cidadão com os princípios que tenho hoje e por tomarem meus sonhos como se fossem seus. A meu pai, Cosmo, a minha mãe biológica Eliane, aos meus irmãos e sobrinhos adotivos e biológicos, e a minha vó (*in memoriam*) conhecida como dona Biu, por todo apoio e companheirismo, amo-os.

Sou grato imensamente à nova família que conquistei desde os 16 anos, em especial a minha amada esposa Andresa, a minha sogra e segunda mãe, Luciene, meu sogro José e meus cunhados Állisson e Andrielly os quais acompanharam minha trajetória, dando-me forças nos dias difíceis e por terem acreditado na realização deste sonho, amo-os.

À minha amiga e orientadora, a professora Dra. Claudia Rohde, a qual nunca mediu esforços para me ajudar neste estágio importante de minha vida, sempre me aconselhando, entendendo minhas limitações, me incentivando e sempre participando da realização das atividades do mestrado. A ti querida orientadora, minha gratidão.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética do CAV-UFPE e da vida, em especial a Érima, Samuel, Danúbia, Cícero, Anderson, Neto, Rafaela e André, os quais me ajudaram grandemente em diversas etapas, muitas vezes ficando até os finais de semana no laboratório para realização deste trabalho. Por todo apoio, saibam que serei eternamente grato.

Serei eternamente grato ao grupo de pesquisa do Centro Regional de Ciência Nucleares-CRCN, em especial ao professor Dr. Elvis De França e aos alunos Derick, Robson, Mariana e aos demais que foram essenciais para a execução deste trabalho. Agradeço por todas as reuniões produtivas e decisivas, pelo comprometimento nas metodologias, pelo cuidado em cada análise. Enfim, por todo apoio.

Aos meus amigos da graduação em Ciências Biológicas em especial a Pérola, Fatinha, Antônio, Ewerton, Paulo, Andreza, Welington, entre outros; da especialização, como Danielle Feijó e Juliana Arandas (minha orientadora) e aos amigos da Engenharia Agrícola e Ambiental da UFRPE, em especial a Amanda, Fagner, Victor, Hédla, Ronaldo, Dérick entre outros que sempre me motivaram a buscar a realização deste sonho, mostrando-me que eu era capaz e que tudo era no seu tempo. Gratidão por todo apoio.

Gratidão também ao senhor José Maria (“Zezeu”) e a senhora Isabel (“Dona Bel”), proprietários das terras onde eu realizei a maioria dos procedimentos de campo, em Lucrécia-RN. Obrigado por todo acolhimento, carisma, cuidado, confiança, dentre outras expressões de amor que foram dadas tanto a mim quanto para minha esposa, e os demais companheiros de campo. Palavras me faltam para expressar minha gratidão.

Também sou grato aos professores que contribuíram fortemente na minha construção como cidadão crítico, autêntico e intelectual. Todos os tijolos depositados desde os anos iniciais até o mestrado foram essenciais na minha formação profissional e humana. Em especial agradeço aos professores da graduação em Ciências Biológicas do CAV-UFPE, que me mostraram com ações o poderoso valor da Educação. E aos docentes: Cristiano Chagas, Ana Garcia e Simão Vasconcelos por serem membros da banca da minha Dissertação.

Por fim, agradeço a UFPE por todo apoio financeiro e intelectual depositado com inteira confiança para a elaboração deste trabalho e também a todos que fazem parte do PPGBA, em especial o coordenador Dr. Ulisses Pinheiro, por sua paciência e atenção, e também a minha amiga de mestrado Andreza Campos, pelo companheirismo, força e por acreditar que somos capazes de ir além de nossos sonhos. Gratidão!

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.
Pessoas transformam o mundo”
Paulo Freire

RESUMO

Este estudo investigou o efeito genotóxico de poluentes ambientais naturais, tais como metais pesados e Radônio, presentes no açude do município de Lucrécia, Rio Grande do Norte, Brasil, usando o organismo-modelo *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera). Os resultados do Ensaio cometa indicaram efeito genotóxico nas células da hemolinfa de larvas que foram alimentadas por 24 horas em meio de cultivo hidratado com as amostras de água coletada na estação chuvosa (janeiro, 2019). Na repetição realizada com amostras de água da estação seca (novembro, 2019) os resultados demonstraram ausência de efeito genotóxico, sendo semelhantes estatisticamente aos obtidos no grupo controle negativo, mantido em meio hidratado com água destilada. Não houve presença de Radônio em níveis acima dos permitidos em nenhuma das amostras de água, nas duas estações do ano, e não foram registrados metais pesados (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) em níveis acima do permitido na amostra de água da estação seca. Os organismos foram também testados para um possível efeito de Radônio atmosférico, após exposição de larvas de *D. melanogaster* em caixas de populações expostas no entrono do açude de Lucrécia, por seis dias. Neste caso, amostras de indivíduos descendentes coletados tanto em Lucrécia (denominados residentes) quanto da linhagem Oregon-R (linhagem genética padrão de estudos tóxico-genéticos) não sofreram danos genotóxicos associados a uma possível presença do gás Radônio no ar. O conjunto dos resultados foi comparados aos realizados com amostras de água do açude de Parelhas, situado a 146 km de distância, gerando um artigo científico que dá destaque ao uso *D. melanogaster* como organismo sentinela para fins de bioindicação ambiental da qualidade de águas de açudes do semiárido do Brasil, onde há afloramentos superficiais de rochas ricas em Urânio e Tório.

Palavras-chave: Organismo sentinela. Águas superficiais. Ensaio cometa. Genotoxicidade. Radiação natural. Insecta.

ABSTRACT

This study investigated the genotoxic effect of natural environmental pollutants, such as heavy metals and Radon, present in the weir in the municipality of Lucrécia, Rio Grande do Norte state, Brazil, using the model organism *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera). The results of the Comet assay indicated a genotoxic effect on the hemolymph cells of larvae that were fed for 24 hours in hydrated culture medium with water samples collected from the rainy season (January, 2019). In the repetition performed with water samples from the dry season (November, 2019) the results showed no genotoxic effect, and statistically similar to those obtained in the negative control group, maintained in medium hydrated with distilled water. There was no presence of Radon at levels above those allowed in any of the water samples, in both seasons, and no heavy metals were recorded (Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) at levels above that allowed in the dry season water samples. The organisms were also tested for a possible effect of atmospheric Radon, after exposure of *D. melanogaster* larvae in population boxes in the surroundings of the Lucrécia dam, for six days. In this case, samples from descending individuals collected both in Lucrécia (called residents) and the Oregon-R line (standard genetic line in toxic-genetic studies) did not suffer DNA damage associated with a possible presence of Radon gas in the air. The set of results were compared to those carried out with water samples from the Parelhas dam, located 146 km away, generating a scientific article. These results highlight the use of *D. melanogaster* as a sentinel organism for the purpose to environmental bioindication of the quality of weir waters from the semiarid region of Brazil, where there are superficial outcrops of rocks rich in Uranium and Thorium.

Keywords: Sentinel organism. Surface water. Comet assay. Genotoxicity. Natural radiation. Insecta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fundamentação teórica

- Figura 1. Fêmea adulta de *Drosophila melanogaster*. Fonte: Kacsoh e Schlenke (2012). 21
- Figura 2. Thomas Hunt Morgan. Fonte: Lewis (1998). 21
- Figura 3. Os cinco níveis de dano genético (0 a 4) com base no comprimento e quantidade de DNA nas caudas de cometas. As imagens são de hemócitos coletados de larvas de *D. melanogaster* coradas com GelRed e fotografados em microscopia fluorescente. Fonte: Verçosa et al. (2017). 24
- Figura 4. Esquema indicando a série de decaimento do Urânio (^{238}U). As letras significam os nomes dos elementos e os números indicam a massa dos átomos. Oito elementos emitem partículas alfa (α) quando decaem. Fonte: Taylor et al. (2001). 25

Manuscrito

- Figura 1. Resultados médios do Índice de Dano (A) e da Frequência de Dano (B) após exposição aos tratamentos do controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL) e amostras de águas do açude de Parelhas (P1, P2 e P3), em duas estações do ano. 34
40
- Figura 2. Resultados médios do Índice de Dano (A) e da Frequência de Dano (B) após exposição aos tratamentos do controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL) e amostras de água do açude de Lucrécia (P4, P5 e P6) em duas estações do ano. 35
40
- Figura S1. Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste (cinza claro) e o estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro). As setas indicam a localização geográfica dos municípios de Parelhas e Lucrécia, no semiárido, e os respectivos açude e pontos de coleta das amostras de água estudadas. 38
46
- Figura S2. Indicação dos valores mensais das precipitações (mm) ocorridas no município de Parelhas (A) e Lucrécia (B), estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A linha vermelha indica as flutuações mensais de temperatura, com média anual de 26,1°C e 26,4 °C, respectivamente. Fone: Climate-data.org (<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-norte/parelhas-42622/#climate-graph>) para o período 1982-2012. As setas indicam os meses das amostragens de água no açude de Parelhas (02=fevereiro; 08=agosto) e no açude de Lucrécia ((01=janeiro; 11=novembro). 42
47
- Figura S3. Imagens representativas dos cinco níveis de dano genético (0 a 4) de acordo com o comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* coradas com GelRed e fotografados em microscopia de fluorescência. Fonte: Verçosa et al. (2017), com permissão. 42
48

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

- Tabela 1. Médias e desvio padrão dos danos genéticos observados em hemócitos colhidos em larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon-R dos grupos Controle negativo (CN, tratadas com água destilada), Controle positivo (CP, tratadas com Ciclofosfamida, 1 mg/mL) e tratamentos com amostras de água dos municípios de Parelhas (pontos P1 a P3) e Lucrécia (P4 a P6), na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. 39
- Tabela 2. Concentração da atividade do Radônio-222 (Bq/L) nas águas do açude de Parelhas e de Lucrécia identificadas por ponto amostral (P1 a P6), réplica (a, b, c) e época do ano. 42
- Tabela 3. Valores (mg/L) de metais pesados obtidos nas amostras de água nos três pontos do açude Boqueirão de Parelhas (P1, P2 e P3 e suas réplicas a, b, c), em comparação com os limites máximos de cada metal (WHO, 2011; CONAMA, 2005). Destaque (em vermelho) aos valores de Alumínio e Manganês detectados acima do recomendado em réplicas do ponto P1 (WHO, 2011). 43
- Tabela 4. Valores (mg/L) de metais pesados obtidos nas amostras de água da estação seca (novembro, 2019) nos três pontos do açude de Lucrécia (P4, P5 e P6 e suas réplicas a, b, c) em comparação com os limites máximos de cada metal (WHO, 2011; CONAMA, 2005). 44
- Tabela S1. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) e amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (P1 a P3). 45
- Tabela S2. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) e amostras de água do açude de Lucrécia (P4 a P5). 45
- Tabela S3. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) feitos com água do açude de Lucrécia, e grupos RE-linhagem residente, e OR-linhagem Oregon-R, expostas ao ambiente atmosférico no entorno do açude de Lucrécia, em julho de 2019. 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
Al	Alumínio
ANA	Agência Nacional de Águas
ANOVA	Análise de Variância
As	Arsênio
ATSDR	Agência Registros de Substâncias Tóxicas, do inglês <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
°C	Grau Celsius
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
Cr	Cromo
Cu	Cobre
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
FD%	Frequência de Dano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPA	Environmental Protection Agency
Fe	Ferro
Hg	Mercúrio
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID	Índice de Dano
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
LM	Baixo ponto de fusão, do inglês <i>Low Melting point</i>
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
NCGC	Instituto Nacional de Saúde, Centro de Genômica Química

NCR	<i>National Research Council</i>
NE	Nordeste
Ni	Níquel
NPL	Lista de Prioridades Nacionais, do inglês <i>National Priorities List</i>
NTP	Programa Nacional de Toxicologia, do inglês <i>National Toxicology Program</i>
Pb	Chumbo
pH	Potencial de Hidrogênio iônico
ppm	Parte por milhão
Ra	Rádio
Rn	Radônio
RN	Rio Grande do Norte
rpm	rotações por minuto
SCG	eletroforese em gel de célula única
SMART	Teste de Mutação e Recombinação Somática, do inglês <i>Somatic Mutation and Recombination Test</i>
THMs	Metal Pesado Tóxico
U	Urânio
UNSCEAR	<i>United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinco
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Reservatórios de água no semiárido do Brasil	19
3.2 <i>Drosophila melanogaster</i> (Diptera: Drosophilidae)	20
3.3 Ensaio cometa para investigação da genotoxicidade	23
3.4 Radiação natural na região Nordeste do Brasil	24
4 RESULTADOS	29
Manuscrito	29
<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo sentinela para avaliação do risco genotóxico em ambientes aquáticos do semiárido brasileiro sujeitos à radioatividade natural.	
Introdução	31
Material e Métodos	32
Resultados	37
Discussão	49
Referências	52
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os potenciais de água doce são extremamente favoráveis para diversos usos como agricultura e pecuária, porém, as características deste recurso natural renovável têm sido drasticamente acometidas pela poluição ambiental, que em um conceito mais amplo, se refere à ocorrência de alterações prejudiciais no meio, seja ele água, ar ou solo (BRASIL, 2006). Isso acontece especialmente nos estados da região Nordeste, devido não só aos processos de urbanização, industrialização e produção agrícola, mas também à escassez hídrica acentuada dos últimos anos. Diante da falta de chuvas, vários municípios do semiárido do NE construíram reservatórios e açudes para uso em atividades como a aquicultura, irrigação e recreação. Estudos realizados nos principais reservatórios do estado do Rio Grande do Norte (RN) revelaram sérios problemas de qualidade de água, incluindo a contaminação por metais pesados (MARCON et al., 2010; GARCIA et al., 2011; CHAVES et al., 2016; MARCON et al., 2017; DANTAS et al., 2020).

Metais pesados têm a capacidade de interferir nas biomoléculas, na ativação de certos receptores, na regulação de canais iônicos, na sinalização celular e na transcrição de genes, potencializando a toxicidade a nível fisiológico, celular e molecular (MARCON et al., 2010). Alguns metais pesados são considerados imprescindíveis do ponto de vista biológico. Mesmo aqueles tidos como essenciais podem causar danos a ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se, assim, em contaminantes ou poluentes da água e do solo (GUILHERME et al., 2005).

Além da presença de metais pesados nos reservatórios de água do semiárido nordestino, há também a contaminação por Radônio (^{222}Rn), um gás nobre que emite partículas alfa, oriundo do decaimento radioativo natural da série do Urânio (^{238}U) (DANTAS et al., 2020; MUHAMMAD et al., 2020). O Rn é liberado no ar pela interação dos minerais com o solo e água, o que promove sua ascensão à atmosfera através de um sistema de bolhas. O efeito do Rn pode ser devastador, por ser considerado o principal causador de câncer de pulmão, depois do cigarro (IAEA, 2015).

Sendo assim, é de suma importância realizar um biomonitoramento da população e dos organismos expostos a agentes radioativos potencialmente genotóxicos, especialmente em locais de elevado índice de câncer como é caso de alguns municípios do semiárido do estado do Rio Grande do Norte (RN). Para tanto, bioensaios podem ser empregados como o Teste de Micronúcleo (GARCIA et al., 2011; CHAVES et al., 2016), o Ensaio cometa (AHMED et al., 2011; VERÇOSA et al., 2017) e o teste de Mutação e Recombinação Somática-SMART (AMARAL et al., 2006; ACIOLE

et al., 2014), permitindo identificar alterações cromossômicas e genéticas resultantes da exposição, em células somáticas de organismos-modelo.

O Ensaio cometa tem sido uma excelente ferramenta para a investigação de danos genéticos, e para o monitoramento genético em humano (URIOL et al., 2013) e do ambiente (VERÇOSA et al., 2017; SANTANA et al., 2018). É um método sensível e de baixo custo, que permite a detecção de quebras simples ou duplas na molécula do DNA da célula, em um meio alcalino (AZQUETA; COLLINS, 2013). Neste ensaio as células são sobrepostas em lâminas de vidro, cobertas por agarose e submetidas a um processo de lise que permite que as membranas celulares sejam rompidas e que o DNA permaneça ligado à matriz celular, formando um nucleóide, composto pelos fragmentos de DNA danificados. A visualização do dano genético é feita diretamente nas lâminas, após coloração do DNA com compostos que permitem sua visualização em microscopia de fluorescência (OSTLING, JOHANSON, 1984; SINGH et. al., 1988).

Para o Ensaio cometa, *Drosophila melanogaster* Meigen (Insecta: Diptera) tem se destacado como um modelo biológico muito adequado (GAIVÃO; SIERRA, 2014; SIDDIQUE et al., 2015; VERÇOSA et al., 2017; SANTANA et al., 2018, MARCOS; CARMONA, 2019) devido ao seu rápido ciclo de vida, facilidade de manipulação em laboratório, fácil detecção de fenótipos e forte associação de ocorrência de toxicidade com seres humanos (RAND, 2010). Além disso, o genoma de *D. melanogaster* é bem conhecido e anotado, desde a publicação do sequenciamento do seu genoma completo, duas décadas atrás (ADAMS et al., 2000). Com isso, *D. melanogaster* tem se tornado organismo-modelo alternativo em experimentos de substituição ao uso de ratos e camundongos (SIDDIQUE et al., 2005), e recomendada em teste toxicológicos pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos - ECVAM (FESTING et al., 1998; BENFORT et al., 2000; AUGUSTYNIAK et al., 2016). Por realizar diversas metabólicas semelhantes às que acontecem em mamíferos *Drosophila* é um excelente modelo de estudos de doenças humanas como o câncer (BECKINGHAM et al., 2005; VILLEGAS, 2019).

O estudo de populações de *D. melanogaster* com ocorrência natural em locais de radiação na região Nordeste do Brasil tem permitido detectar uma condição adaptativa dos organismos, denominada de *radiorresistência*. Essa condição reflete a capacidade dos indivíduos em adaptarem-se à radiação do local, provavelmente associada a uma maior eficiência no reparo do DNA (BEAM et al., 1954; MATTIMORE; BATTISTA, 1996). Em Lajes Pintadas/RN, um local que apresenta níveis de radiação acima de 100 Bq/m³ (VERÇOSA et al., 2017; DANTAS et al., 2020), foi verificada a

ocorrência de baixos índices de danos genéticos em amostras de espécies residentes de *D. melanogaster* e *Zaprionus indianus*, mesmo após gerações de cultivo em condições de laboratório. (CASTRO, 2016; OLIVEIRA, 2019).

O trabalho aqui desenvolvido aplicou a metodologia do Ensaio para investigar os possíveis efeitos genotóxicos de metais pesados (ou elementos-traço) e do gás Radônio, presentes em amostras de água de um açude situado no município de Lucrécia/RN, sobre o genoma de *D. melanogaster*, visando o uso desta espécie como organismo-sentinela para o biomonitoramento ambiental. O estudo também investigou a presença de Radônio no ar e possíveis efeitos sobre os organismos de duas linhagens de *D. melanogaster*, a fim de compreender os mecanismos adaptativos frente à radiação natural.

Os resultados estão apresentados em um artigo científico, que reuniu dados deste estudo - feito para amostras de água coletadas em 2019 em Lucrécia – com o estudo de Carmo-Neto (2019) - com amostras de água do açude de Parelhas/RN, em 2018. Os resultados conjuntos servem de suporte científico para futuras políticas e planos de ação por parte das autoridades, e para o uso de *D. melanogaster* em estudos de genotoxicidade de fontes hídricas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar em diferentes linhagens do organismo-modelo *Drosophila melanogaster*, a presença e o potencial efeito tóxico-genético de metais pesados e Radônio presentes em amostras de água de um açude do semiárido do Nordeste do Brasil.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial efeito tóxico-genético de amostras de água do açude de Lucrécia, Rio Grande do Norte, de um período chuvoso e de estiagem, sobre o material genético de hemócitos de *Drosophila melanogaster* (linhagem Oregon-R);
2. Analisar a presença de Radônio e de 11 metais pesados nas amostras de água do período de estiagem, a fim de estimar os riscos potenciais do seu consumo;
3. Avaliar a presença de Radônio atmosférico no entorno do açude de Lucrécia e o potencial efeito tóxico-genético desse gás em uma linhagem residente de *D. melanogaster*, e na linhagem padrão Oregon-R;
4. Comparar e integrar os resultados obtidos para o açude de Lucrécia com o de Parelhas, colaborando para o uso de *Drosophila melanogaster* como organismo sentinela para bioindicação ambiental.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Reservatórios de água no semiárido do Brasil

Com um pouco mais de 53 milhões de habitantes e uma densidade populacional humana de 34 habitantes por quilômetro quadrado (IBGE, 2010), o semiárido brasileiro é considerado a região de terra seca mais populosa do mundo (MARENGO, 2017, 2018). As terras secas são resultantes de fenômenos naturais que ocorrem devido aos desvios do clima em longo prazo, como a variação da frequência das chuvas e a degradação e desertificação da terra. Quando combinados, estes fatores podem tornar uma região bastante vulnerável às mudanças climáticas (IPCC, 2012). Isso porque os processos hidrológicos, incluindo precipitação, vazão e evaporação, também são intensamente influenciados pelas mudanças do clima e pelas atividades humanas, como a construção de reservatórios de água e a retirada de água doce (MAO; CHERKAUER, 2009). No Nordeste do Brasil, os organismos são afetados por estes eventos, que desencadeiam deficiências hídricas e riscos de contaminação das fontes de água (EAKIN et al., 2014).

A seca intensiva ocorrida na região Nordeste do Brasil entre os anos de 2010-2016 tem sido considerada uma das piores das últimas décadas. A situação, agravada pelo fenômeno El Niño de 2015-2016, trouxe aumento das temperaturas continentais e marinhas, acometendo drasticamente mais de 9 milhões de pessoas (KOGAN; GUO, 2017; MARENGO et al. 2018).

A intensiva seca de 2015 atingiu cerca de 1.190 municípios brasileiros, localizados principalmente na região semiárida (ANA, 2016). Esta condição extrema foi intensificada pelas atividades antropogênicas, como desmatamento, aumento da frequência de incêndios e excessiva exploração de águas subterrâneas (MARENGO et al., 2018). As atividades antropogênicas são consideradas a principal fonte de degradação da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, devido à descarga de efluentes industriais, domésticos e agrícolas, dentre outros (RATTNER, 2009; CHIGOR et al., 2012; JIANG et al., 2014; PATEL et al., 2014; MANZANO et al., 2015). Independentemente da fonte, a contaminação dos ecossistemas aquáticos transforma a água em fonte de propagação de substâncias tóxicas para diversos organismos que dela dependem (DATTA et al., 2009; VERMA; DWIVEDI, 2013).

A presença de agentes geogênicos nos corpos d'água compromete a

qualidade da água e deve ser considerado um problema de saúde ambiental (AMINI, 2011; EGBINOLA; AMANAMBU, 2014).

Elementos como Urânio e vários metais pesados podem ser encontrados naturalmente nos ecossistemas aquáticos. Porém, quando presentes em níveis elevados, podem ser um risco para a integridade celular de diversos organismos, de acordo com o Comitê Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica (UNSCEAR, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) estima que pelo menos 2 milhões de pessoas morrem por ano em decorrência de doenças vinculadas ao uso da água sem qualidade. De acordo com a Agência Nacional das Águas (ANA, 2016), 81% dos municípios do Brasil despejam pelo menos 50% do esgoto que produzem diretamente em cursos de água próximos aos municípios, sem submetê-los a nenhum tratamento (COSTA, 2017).

A fim de monitorar a presença de possíveis contaminantes da água e seus efeitos sobre os seres vivos, diversos ensaios biológicos e organismos, tal como *Drosophila melanogaster*, tornaram-se ferramentas fundamentais para a análise da qualidade da água e para estimativas dos efeitos de substâncias isoladas ou de uma mistura de compostos em diferentes ecossistemas (OSSANA; SALIBIÁN, 2013).

3.2 *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)

Depois de revisada a classificação da família Drosophilidae por Grimaldi (1990), baseada em análise cladística de 217 caracteres morfológicos de indivíduos adultos, o autor concluiu que as espécies mais representativas desta família formam um grupo monofilético. O gênero mais estudado dentro desse grupo é *Drosophila* com mais de 1.200 espécies conhecidas, e com origem provável nos trópicos (BÄCHLI, 2020), onde há uma diversidade de ambientes a serem explorados, como as florestas úmidas, os ambientes semiáridos e até mesmo, as zonas urbanas onde, *Drosophila melanogaster* é encontrada (GOTTSCALK et al., 2008; BÄCHLI, 2020).

Drosophila melanogaster (**Figura 1**) vem sendo estudada há mais de um século, quando Thomas Hunt Morgan (**Figura 2**) desenvolveu uma linha derivada dos estudos do geneticista Gregor Mendel (1822-1884), sustentando a teoria da evolução (MORGAN, 1909; MARTINS; BRITO, 2006) e introduzindo, pela primeira vez, *Drosophila* como organismo modelo para análises genéticas.



Figura 1. Fêmea adulta de *Drosophila melanogaster*. Fonte: Kacsoh e Schlenke (2012).



Figura 2. Thomas Hunt Morgan. Fonte: Lewis (1998).

Drosophila melanogaster é também conhecida como mosca das frutas (FREIRE- MAIA; PAVAN, 1949), por ser encontrada comumente em volta das frutas em putrefação. O seu genoma encontra-se distribuído em oito cromossomos, sendo três pares de autossomos e um par sexual (XX ou XY), contém aproximadamente 13.600 genes e quase a metade do número de genes conhecidos em humanos. (ADAMS et al., 2000).

A espécie apresenta grandes vantagens para variados testes biológicos devido a seu rápido ciclo de vida (em cerca de 10 dias), elevado número de indivíduos por progênie, pouca exigência nutritiva, baixo custo de manutenção e facilidade de cultivo em condições de laboratório, e facilidade na detecção de fenótipos (ROHDE, 2012).

Com isso, *D. melanogaster* é cada vez mais vista como um organismo alternativo ao uso de pequenos mamíferos em testes toxicológicos, solucionando impasses envolvendo questões de bioética (SIDDIQUE et al. 2005; AUGUSTYNIAK et al., 2016).

Drosophila melanogaster destaca-se também como um organismo alternativo para examinar os fatores de risco à saúde, uma vez que o seu genoma é 60% homólogo ao dos humanos, menos redundante, e cerca de 75% dos genes responsáveis por doenças humanas têm homólogos nas moscas (UGUR et al., 2016). Assim a utilidade de *D. melanogaster* em um teste *in vivo* é cada vez mais requisitada também em testes de genotoxicidade (CARMONA et al., 2011; GAIVÃO; SIERRA, 2014; MARCOS; CARMONA, 2019).

Em pouco mais de um século, *D. melanogaster* foi alvo de investigações em mais de 100.000 artigos científicos (GILBERT, 2008) e a mais de 50 anos vem sendo utilizada em pesquisas científicas visando investigar danos causados ao DNA por agentes químicos (NEPOMUCENO, 2015). *Drosophila* se destaca ainda por sua capacidade de fornecer informações sobre processos biológicos complexos, como o câncer e, assim, muitos dos avanços históricos no entendimento da base genética do desenvolvimento e do comportamento vieram e continuarão a vir dos estudos com espécies de *Drosophila* (BECKINGHAM et al., 2005; VILLEGAS, 2019).

Nos estudos de genotoxicidade, *D. melanogaster* foi o primeiro organismo usado para detectar o efeito prejudicial ao DNA da radiação ionizante (MÜLLER, 1927). Foi utilizada também como modelo biológico para estudos toxicológicos de poluentes ambientais, como pesticidas (BASHEER et al., 1999; RAND 2010; TIWARI et al., 2011; MARCUS; FIUMERA, 2016; ALARABY et al., 2016), poluição do ar (SANTANA et al., 2018), na detecção de genotoxicidade e mutagenicidade de nanopartículas de metal e óxido de metal (CARMONA et al., 2015) entre outros estudos.

Carmona et al. (2011) propuseram o uso de hemócitos da hemolinfa de *D. melanogaster* para estudos de genotoxicidade, uma vez que, em mamíferos, e especialmente em humanos, estudos *in vivo* em geral usam linfócitos do sangue periférico como as principais células-alvo para medir a indução de danos no DNA

A importância do uso de *D. melanogaster* para testes toxicológicos foi evidenciada também por Pandey e Nichols (2011), que afirmaram que a espécie é um modelo adequado para estudos genômicos em larga escala, na suscetibilidade/resistência a substâncias tóxicas. Uma prerrogativa para um bom sistema modelo é compartilhar fisiologia nas vias moleculares com seres humanos, e é natural que aproximadamente 75% dos genes associados a doenças humanas tenham

homólogos em *Drosophila* e compartilhem semelhanças em suas funções, fato de particular interesse para fins médicos (ZHOU et al., 2017).

Os ensaios somáticos são as ferramentas normalmente usadas em *D. melanogaster* para estudar danos no DNA e detectar agentes ou exposições suspeitas de genotoxicidade (MARCOS; CARMONA, 2019). A incorporação desses ensaios em testes toxicológicos é uma resposta direta à solicitação de uma mudança de paradigma nos testes propostos conjuntamente pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA), Centro de Genômica Química (NCGC) e pelo *National Toxicology Program* (NTP) (COLLINS et al., 2008). Além disso, as recomendações do *National Research Council Committee on Toxicology*, dos Estados Unidos, declaram *D. melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Danio rerio* (zebrafish), como modelos de escolha para avaliação de riscos de tóxicos que afetem o desenvolvimento (RAND, 2010).

Por fim, existe uma diversidade de bioensaios que podem ser empregados com a finalidade de identificar alterações cromossômicas e genéticas oriundas da exposição a agentes contaminantes como o Urânio e seus derivados dos quais se destaca o Ensaio cometa (AHMED et al., 2011; VERÇOSA et al., 2017; COLLINS et al., 2020).

3.3 Ensaio cometa para investigação da genotoxicidade

O Ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única (SCG), foi introduzido pela primeira vez por Ostling e Johanson, em 1984, como uma técnica para a visualização direta de danos no DNA (OSTLING, JOHANSON, 1984; SINGH et. al., 1988). Este método também tem o potencial de detectar os danos no DNA de forma qualitativa e quantitativa, em células eucarióticas individuais (TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2020). Este ensaio demonstrou ser altamente sensível, permitindo a detecção de baixos níveis de vários tipos de danos ao DNA, como quebras de DNA de fita simples e dupla (SPEIT; HARTMANN, 2006).

Após a aplicação de uma corrente elétrica nas células dispostas sobre lâminas com gel de agarose, os fragmentos do DNA migram e formam uma imagem de cometa, o que dá nome ao teste. Os danos no DNA são observados em microscopia de fluorescência, e são qualificados em função do tipo de dano, podendo variar, de 1 a 4 (do menor ao maior dano) (**Figura 3**). No dano tipo 1, o núcleo é facilmente visualizado e a cauda não existe, enquanto no dano tipo 4, a cauda é bem longa e o núcleo é pouco definido.

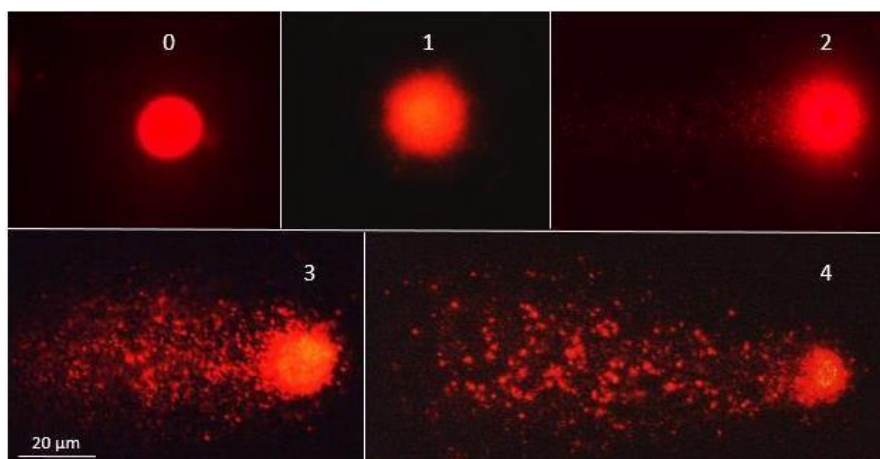


Figura 3. Os cinco níveis de dano genético (0 a 4) com base no comprimento e quantidade de DNA nas caudas de cometas. As imagens são de hemócitos coletados de larvas de *D. melanogaster* coradas com GelRed e fotografados em microscopia fluorescente. Fonte: Verçosa et al. (2017).

O ensaio cometa foi aplicado pela primeira vez no modelo *Drosophila melanogaster* em 1999 e, desde então, os estudos com esta metodologia têm crescido exponencialmente (GAIVÃO; SIERRA, 2014; AUGUSTYNIAK et al., 2016; VERÇOSA et al., 2017; MARCOS; CARMONA, 2019; AMORIM et al., 2020) em estudos *in vitro* e *in vivo* do potencial genotóxico de vários compostos químicos e poluentes ambientais, revolucionando o campo da ecotoxicologia (SIDDIQUE et al., 2005; RAND, 2010, 2014).

O ensaio cometa também tem sido aplicado em bactérias (procariontes) (JHA, 2008) e em diferentes grupos animais, como mamíferos, a exemplo os humanos (GODSCHALK et al., 2013; COLLINS et al., 2013, 2020), em peixes (HARTMANN et al., 2004; LEMOS et al., 2005), diferentes espécies de insetos (AUGUSTYNIAK et al., 2016; BRITO et al., 2020), entre outros organismos.

3.4 Radiação natural na região Nordeste do Brasil

Isótopos radioativos ocorrem naturalmente em rochas, ou podem ser liberados de forma descontrolada durante os testes nucleares, na manutenção normal de usinas nucleares, ou em acidentes como os de Chernobyl e Fukushima Daiichi (SOWMITHRA et al., 2015).

Quando o nível natural de radiação excede os níveis basais baixos em áreas não contaminadas em escala de centenas de vezes, resulta em taxas significativas de doenças em humanos e outros organismos (LUBIN; BOICE, 1997; GHIASSI-NEJAD et al., 2002; SOWMITHRA et al., 2015). A reprodução é considerada um dos pontos finais

mais sensíveis aos efeitos da radiação, e não apenas determina o destino de um único organismo, mas também influencia a dinâmica populacional e a estabilidade de unidades ecológicas relacionadas (SOWMITHRA et al., 2015).

O Urânio (^{238}U) é um radionuclídeo instável, caracterizado como uma das principais fontes de exposição humana à radiação natural (UNSCEAR, 2017). No seu processo de decaimento ocorre a emissão de partículas radioativas ionizantes (alfa, beta e níveis amenos de partículas gama), e geração de diferentes subprodutos (**Figura 4**) como metais pesados e gás radônio, ambos considerados cancerígenos para seres humanos (BARILLET et al., 2011; CARVER; GALLICCHIO, 2017).

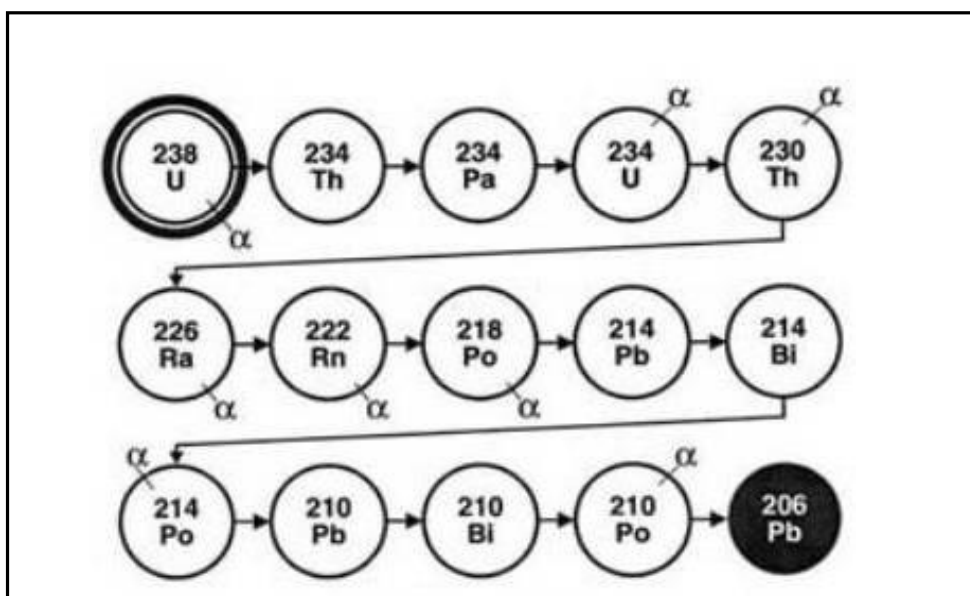


Figura 4. Esquema indicando a série de decaimento do Urânio-238 (^{238}U). As letras significam o nome do elemento e os números indicam a massa dos átomos. Oito elementos emitem partículas alfa (α) quando decaem. Fonte: Taylor et al. (2001).

O Urânio possui caráter ionizante, pois suas ondas eletromagnéticas se propagam a uma determinada velocidade após serem geradas por fontes naturais ou por artefatos manufaturados (CICCIA; ELLEDGE, 2010). O Brasil possui um dos principais reservatórios geológicos de U do mundo segundo pesquisas realizadas pela *International Atomic Energy Agency* (IAEA, 2009). Na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, onde está localizada a Província de Pegmatítica da Borborema, foram relatados altos níveis de U (variando entre 0,4 ppm e 7,8 ppm), além de Tório (0,1–21,0 ppm) e Potássio (2,0% e 5,2%) (SILVA et al. 2010). A formação geológica nessas regiões promove a presença de minérios de importância econômica, que são explorados por empresas de mineração para a produção de materiais de construção (ARAÚJO; SOUZA, 2012).

Devido à existência de rochas pegmatíticas, minerais radioativos como o urânio também podem ser encontrados na região e no solo sob uma barragem, juntamente com vários metais pesados como níquel, cobalto, prata, cobre e chumbo (CPRM, 2013). Com o aumento dos processos de industrialização, a exposição a metais pesados cresceu em todo o mundo, devido a operações relacionadas com o ciclo do combustível nuclear, uso dos radioisótopos na medicina, na indústria e em pesquisas, ou relacionadas a atividades agrícolas, urbanas, de construção e mineração, resultando em efeitos deletérios à saúde humana (REHMAN et al., 2017).

Os efeitos da radiação resultam na indução de lesões no material genético como formação de sítios apurínicos ou apirimídicos, ou quebra de fita simples ou dupla de DNA (BARILLET et al., 2011; WILSON et al., 2014), promovendo a perda de importantes funções celulares e processos degenerativos, como doenças hereditárias e câncer, dentre outros (FRIEDBERG et al., 2006). A irradiação interna ocorre quando os radionuclídeos estão dentro do corpo dos organismos, incorporados pela inalação, ingestão ou inoculação (SOWMITHRA et al., 2015).

Rehman et al. (2017) destacaram que o mecanismo geral envolvido na toxicidade induzida por metais pesados está associado à produção de espécies reativas de oxigênio, que vão originar danos oxidativos e efeitos adversos relacionados à saúde. Assim, a exposição às substâncias tóxicas pode causar efeitos diferentes no corpo humano, interferindo nos principais processos metabólicos e fisiológicos (MUHAMMAD et al., 2011).

A exposição prolongada ao U pode resultar em efeitos adversos aos invertebrados aquáticos, como insetos, anfípodes e crustáceos com valores de concentração de efeitos não observados (NOEC) variando de 1,5 a 2250 µg de U/L (MUSCATELLO; LIBER, 2009; BURNETTSEIDEL; LIBER, 2012). Derivados do U, como os metais pesados, após serem liberados da crosta terrestre, persistem no ambiente por tempo indeterminado porque não são degradáveis (WU et al. 2010), causando efeitos tóxicos em microrganismos, plantas e animais. Por esses motivos, a contaminação por metais pesados tornou-se uma preocupação para o futuro (RAHMAN; SINGH, 2019).

Metais pesados, incluindo Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo) e Zinco (Zn) são cruciais para a atividade metabólica, pois em baixas concentrações são micronutrientes essenciais (PERALTA-VIDEA et al., 2009). Não obstante, quando em concentrações consideradas acima dos limítrofes, produzem efeitos adversos na saúde (ALI et al., 2013; RAHMAN; SINGH, 2019).

Metais pesados como Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg) e Cromo (Cr) são toxinas não limiaries, descritos como os metais pesados que mais causam danos (RAHMAN; SINGH, 2019). A Agência Registros de Substâncias Tóxicas dos Estados Unidos (ATSDR, 2015), por exemplo, classificou As, Pb, Hg, Cd e Cr em 1º, 2º, 3º, 7º e 17º lugares, respectivamente, na lista prioritária de substâncias perigosas para o perfil toxicológico. A lista é baseada em uma combinação da frequência, toxicidade e potencial de exposição do metal pesado em locais da Lista de Prioridades Nacionais do mesmo país.

O metal pesado Pb foi categorizado em primeiro lugar entre todas as substâncias tóxicas da Terra, por ser o que mais ameaça e impacta à saúde, seguido por Hg, Cr (VI) e Cd (PURE EARTH, 2015). A contaminação do corpo humano pode ocorrer por via dérmica ou inalatória, pela ingestão através de alimentos ou água contaminados, e pelo ar, de forma que é impossível ter um ambiente totalmente livre de metais pesados (REHMAN et al., 2017).

Outro derivado importante do ^{238}U é o gás Radônio (^{222}Rn), considerado bastante tóxico e produzido a partir do elemento Rádio (^{226}Ra), com meia-vida de 3,8 dias (UNSCEAR, 2008). A exposição ao Rn é a segunda causa mais comum de câncer de pulmão, sendo o principal fator de risco desse câncer em pessoas que nunca fumaram (SHEEN et al., 2016).

As principais fontes de Radônio são encontradas nas rochas, que se propagam para o solo, a água potável, e até aos materiais de construção e ao gás natural (MIKAYILOVA, 2018). A maior exposição desse gás ao ser humano se dá dentro das residências, por inalação do ar de locais fechados (*Radon in-door*) e por ingestão de água com Rn dissolvido (UNCEAR, 2017; KIM; RA, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere como nível máximo de exposição 100 Bq/m³ para reduzir os efeitos na saúde devido à inalação interna de ^{222}Rn (TING, 2010).

Em um estudo de revisão de trabalhos que avaliaram locais no Brasil com radiação natural, Dantas et al. (2020) reúnem dados do estado do Rio Grande do Norte, onde os índices limítrofes de subprodutos oriundos do decaimento de U chegam a 2893 Bq/m³ (CAMPOS et al., 2013; MARCON et al., 2010, 2017), valores altíssimos de acordo com o CONAMA, que é de no máximo 100 Bq/m³.

Diante desta realidade, este estudo aplicou metodologias na área da mutagênese sobre o organismo sentinela *Drosophila melanogaster*, a fim de avaliar os efeitos de substâncias poluentes (metais pesados) que foram medidos em amostras de água do açude de Lucrécia. Os resultados estão apresentados a seguir, na forma de

um artigo científico que combinou dados deste estudo com dados prévios do mesmo grupo de pesquisa para o açude de Parelhas/RN (CARMO-NETO, 2019).

RESULTADOS

Manuscrito

A ser submetido à revista **Current Zoology**

A2 (Qualis único), Fator de Impacto: 2,07



***Drosophila melanogaster* como organismo sentinela para avaliação do risco genotóxico em ambientes aquáticos do semiárido brasileiro, sujeitos à radioatividade natural**

Drosophila melanogaster as a sentinel organism to assess genotoxic risk in aquatic environments in the Brazilian semiarid region, subject to natural radioactivity

Charles do Nascimento Silva,^a Edson Francisco do Carmo-Neto,^a Samuel Lima de Santana,^a Érika Maria de Amorim,^a Rafaela Alves de Oliveira,^a Déric Soares de Amaral,^b Matheus Andrade Rocha Costa,^b Alesxandro Francisco do Nascimento,^b Robson Alves Dos Santos,^b Elvis Joacir De França,^b Claudia Rohde,^a

^a Laboratório de Genética, Centro Acadêmico da Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil;

^b Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência: Claudia Rohde. Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, CEP 51608-680, Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, e-mail claudia.rohde@yahoo.com.br Telefone: +55 81 3114.4100

Resumo

Foi objetivo deste estudo investigar o efeito genotóxico em *Drosophila melanogaster* submetida a amostras de água de dois açudes situados no semiárido do Brasil, avaliando o uso do organismo para bioindicação ambiental. Amostras de água foram avaliadas para presença de Radônio e metais pesados (como Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn), elementos que podem alterar várias funções fisiológicas e serem prejudiciais para a saúde humana e para sobrevivência de outros organismos. Neste estudo foi aplicada a metodologia do Ensaio cometa *in vivo* em hemócitos de larvas de *D. melanogaster* que se alimentaram por 24 h em meio de cultivo hidratado com as amostras de água de açudes dos municípios de Parelhas (em 2018) e de Lucrécia (em 2019), Rio Grande do Norte-Brasil, após coletas feitas em duas estações do ano (seca e chuvosa). Os metais pesados avaliados estiveram dentro dos limites permitidos, assim como as medidas do gás Radônio dissolvido na água. Apesar disso, danos genotóxicos foram observados. Houve ocorrência de danos genotóxicos após exposição dos organismos às amostras de água de Parelhas, no período de chuvas, e às amostras de água de Lucrécia, no período da seca. Devido à inerente complexidade da água e às dificuldades em avaliar todos os compostos naturais presentes (metais pesados, substâncias orgânicas dissolvidas ou agentes tóxicos naturais provenientes de cianobactérias) ou aqueles de origem antropogênica (pesticidas, compostos farmacêuticos e outros poluentes químicos) sugere-se *D. melanogaster* como organismo sentinela ideal para a bioindicação ambiental e avaliação global da qualidade das águas de reservatórios da região semiárida do Brasil.

Palavras-chave: Ensaio cometa, hemócitos, radiação natural, genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A radiação natural pode afetar negativamente os diferentes organismos e a população humana, devido ao possível efeito mutagênico causado por minerais radioativos (radionuclídeos) e gás Radônio, após absorção e metabolização (CPRN, 2006; Verçosa et al., 2017; Dantas et al., 2020). Essa problemática ambiental da radiação natural é uma realidade na região Nordeste do Brasil, onde se encontra a Província Pegmatítica da Borborema (IAEA, 2009; Dantas et al., 2020) com fontes rochosas ricas em radionuclídeos da cadeia do Urânio e Tório. Nesta região brasileira encontra-se o bioma Caatinga formado por uma floresta seca, adaptada aos longos períodos de restrição hídrica, que ocorrem entre meses de junho e dezembro (Marengo et al., 2017, 2018; IBGE, 2019).

Dentre os estados brasileiros mais afetados pela radiação natural e seca está o Rio Grande do Norte, com 91% de seu território situado em região semiárida, baixas precipitações médias anuais (abaixo de 871 mm) (IANAS, 2019), e com mais de 3 milhões de pessoas. Para minimizar a baixa oferta hídrica na região, foram construídos diversos reservatórios de água potável, regionalmente chamados de açudes, para o enfrentamento do fenômeno da seca (Pereira-Neto, 2017; Lucena et al., 2018).

Estudos prévios realizados nos açudes de municípios da região revelam problemas da qualidade da água, incluindo a contaminação por metais pesados e Radônio (^{222}Rn), detectados em concentrações acima dos limites nacionais estabelecidos como seguros para fontes hídricas e atmosféricas (Barbosa et al., 2010; Marcon et al., 2010; Garcia et al., 2011; Chaves et al., 2016; Marcon, et al., 2017; Dantas et al., 2017, 2020).

Embora nos sistemas biológicos os metais pesados e radionuclídeos sejam constituintes naturais da crosta terrestre, as atividades humanas indiscriminadas alteraram drasticamente seus ciclos geoquímicos (Singh et al. 2011; IANAS, 2019). Esses compostos têm a capacidade de interferir nas biomoléculas, na ativação de receptores, na regulação de canais iônicos, na sinalização celular e na transcrição de genes, potencializando a toxicidade de águas contaminadas (Marcon et al., 2010; Singh et al., 2011; Masindi e Muedi, 2018; IANAS, 2019).

A gestão e controle bem-sucedido da qualidade da água dependem da geração de dados apropriados e, nesse sentido, espécies sentinela são monitores biológicos muito úteis, capazes de fornecerem importantes informações da resposta biológica aos

contaminantes (Beeby, 2001).

Dentre as ferramentas utilizadas para investigar os potenciais riscos genotóxicos destaca-se o Ensaio cometa aplicado ao organismo *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) (Siddique et al., 2005; Gaivão e Sierra, 2014; Verçosa et al., 2017; Santana et al., 2018, Marcos e Carmona 2019). Esta espécie tem sido utilizada na genética toxicológica devido as suas similaridades genéticas com outros organismos eucariotos, em especial aos seres humanos, com quem compartilha propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas, em mais de 60% dos genes que causam doenças (Rand, 2010; Pandey e Nichols, 2011; Gladstone e Su, 2011; Lenz et al., 2013; Panchal e Tiwari, 2017; Mirzoyan et al., 2019).

Diversos estudos recomendam *D. melanogaster* como organismo alternativo ao uso de pequenos mamíferos, uma escolha que não só minimiza questões de bioética, mas que se apoia na facilidade do cultivo e manipulação laboratorial da espécie, que tem rápido ciclo de vida rápido e baixo custo de manutenção. Além de ser um organismo modelo com alto rendimento, usado há mais de 110 anos para estudar diferentes aspectos biológicos relacionados ao desenvolvimento, às doenças, e aos estudos genômicos (Beckingham et al., 2005), são cultivadas em laboratório linhagens genéticas endocruzadas e compartilhadas por laboratórios de todo mundo, tal como Oregon-R, que é essencial para estudos comparativos e confirmação de resultados, nas mais diversas áreas, incluindo a mutagênese (Mukhopadhyay et al. 2004; Siddique et al., 2005, 2008; Carmona et al., 2011; Sharma et al., 2011; Shukla et al., 2011; Mishra et al., 2011; Verma et al., 2012; Gaivão e Sierra, 2014; Augustyniak et al., 2016; Verçosa et al., 2017; Santana et al., 2018; Amorim et al., 2020).

Neste trabalho, apresentamos resultados dos danos genéticos induzidos por amostras de água em *D. melanogaster* indicando a espécie como organismo sentinela adequado para estudos dos riscos e impactos genotóxicos de fontes hídricas contaminadas, na região semiárida do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Locais do estudo e coleta das amostras de água

No município de Parelhas (20.354 habitantes, segundo IBGE, 2010), Rio Grande do Norte-Brasil (**Figura S1, Material Suplementar**), situa-se o açude Boqueirão de Parelhas, construído em 1988 com capacidade para represar 85,012 milhões de m³ de água do rio Seridó, pertencente à bacia hidrográfica Piranhas/Açu, a

maior do estado (IGARN, 2020). A região tem clima BSW'h' (Koppen) com precipitação média anual de 500 mm (Climate-Data, 2020) e chuvas concentradas apenas nos meses de fevereiro a abril (**Figura S2, Material Suplementar**). De junho a dezembro as chuvas são escassas, marcando o período sazonal da estação de estiagem (Lucena et al., 2018). Amostras de água do açude de Parelhas foram coletadas em fevereiro/2018, no início da estação das chuvas, e em agosto/2018, no início da estação de estiagem. Seleccionamos aleatoriamente três estações de coleta às margens do açude. Os pontos de coleta foram identificados como P1 (06°41'48.2"S, 036°37'39.6"W), P2 (06°41'37.7"S, 036°37'43.4"W) e P3 (06°41'25.2"S, 036°37'37.3"W).

Exposição dos organismos às amostras de água e realização do ensaio cometa

Larvas de terceiro estágio, com 72 h de vida, oriundas de criação em massa mantidas em laboratório, foram contadas e transferidas para cada um dos tubos de tratamento, previamente preparados 0,9 g de purê de batata desidratado (Yoki SA) e 3 mL de água de cada amostra dos locais estudados (P1 a P6). Foram também estabelecidos dois grupos controle por local: um grupo controle negativo, exposto ao meio de cultivo hidratado com água destilada; e um grupo controle positivo, exposto ao meio hidratado com Ciclofosfamida (1 mg/mL), diluído em água destilada. Para cada ponto amostral dos açudes (três em Parelhas e três em Lucrécia) foram realizadas três réplicas. O material foi submetido à metodologia do Ensaio cometa, seguindo as descrições prévias de Verçosa et al. (2017).

Após a exposição das larvas aos tratamentos por 24 h, foram extraídas células da hemolinfa (hemócitos) de um grupo de 60 larvas de cada réplica. Os indivíduos foram colocados em uma placa de Petri e resfriados a 4 °C durante 1 min para diminuir a taxa metabólica e facilitar a manipulação. Passado este tempo, cada larva foi devidamente transferida para um poço de uma placa escavada, contendo 150 µL de solução de EDTA para impedir a coagulação da hemolinfa. Após rompimento da cutícula de um grupo de 60 larvas por réplica, a hemolinfa exposta foi coletada em microtubos e homogeneizada com uma solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37 °C, na ausência de luz. O homogeneizado (60 µL) foi aplicado em lâminas previamente banhadas em agarose padrão (Verçosa et al. 2017), mantidas a 4 °C durante 10 min e em seguida imersas em solução de lise a 4 °C por 72 h. Após, foi realizada a corrida de eletroforese por 20 min a 40 V e 300 mA, em cuba de 40 cm,

seguido das etapas de neutralização e fixação (Verçosa et al. 2017). Para observação e análise dos danos genéticos, as lâminas foram coradas com GelRed e observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com filtro AlexaFluor 546 e objetiva de 40x. A quantificação dos danos genéticos (cometas) foi feita em pelo menos duas lâminas (50 células em cada, total 100 células por cada réplica), seguindo os padrões visuais mostrados na **Figura S3 (Material Suplementar)** (Verçosa et al., 2017). Na imagem, a classe 0 representa a ausência de dano, e as classes 1 até 4 a ordem crescente dos danos genéticos observados (sendo 4 o dano máximo), de acordo a quantidade de DNA na cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Após a quantificação dos danos, duas medidas foram calculadas por cada réplica dos experimentos: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$FD\% = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de danos} - \text{n}^\circ \text{ de danos } 0) \cdot 100}{\text{n}^\circ \text{ total de danos}}$$

$$ID = 0 \cdot (\text{n}^\circ \text{ danos } 0) + 1 \cdot (\text{n}^\circ \text{ danos } 1) + 2 \cdot (\text{n}^\circ \text{ danos } 2) + 3 \cdot (\text{n}^\circ \text{ danos } 3) + 4 \cdot (\text{n}^\circ \text{ danos } 4)$$

Os resultados médios dos valores obtidos nas três réplicas, em cada ponto amostral (P1 até P6) foram comparados com os respectivos valores médios de ID e FD% dos grupos controle negativo e positivo. Por fim, os resultados foram comparados entre si, por local, pela análise da variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa estatístico STATA, versão 12.0.

Exposição dos organismos ao Radônio atmosférico em Lucrécia e realização do Ensaio cometa

A fim de investigar uma possível presença de efeito genotóxico do gás Radônio, resultante da exposição ao ambiente atmosférico do entorno do açude de Lucrécia, no mês de janeiro de 2019 foi feita uma coleta de organismos adultos de *Drosophila melanogaster* residentes no local. A espécie foi coletada por meio de armadilhas contendo isca de banana, que permaneceram por 24 horas no município a fim de atrair adultos da família Drosophilidae. Depois de atraídos, os adultos foram levados para identificação taxonômica no Laboratório de Genética do CAV-UFPE. Cerca de 30 adultos identificados como *D. melanogaster* foram cultivados em um *pool* massal, em tubos contendo meio de cultivo, dando início à linhagem denominada

residente. Após seis meses de cultivo, os descendentes da linhagem residente e da linhagem Oregon-R foram expostos ao ambiente atmosférico no entorno do açude de Lucrécia. Oregon-R é uma linhagem genética muito utilizada em testes do ensaio cometa, especialmente os realizados por nosso grupo de pesquisa (Verçosa et al., 2017; Santana et al., 2018, Amorim et al., 2020). Seus representantes são sensíveis ao efeito de doses elevadas de radiação induzidas pelo gás Radônio, assim como são populações selvagens, como avaliado por Verçosa et al. (2017).

Para a exposição de indivíduos ao ambiente atmosférico de Lucrécia, foram repetidos os procedimentos definidos por Castro (2016). Após cultivo em laboratório, 120 adultos de cada linhagem (residentes e Oregon-R) foram levados a Lucrécia, acondicionados em cada uma das três caixas de populações (confeccionada de acordo com Verçosa et al. 2015), que continham meio de cultivo para a criação de larvas descendentes. As três caixas permaneceram por seis dias em local sombreado, tempo suficiente para o desenvolvimento do estágio embrionário até o terceiro estágio larval. O local escolhido para exposição dos organismos foi no entorno do açude de Lucrécia, próximo aos pontos de coleta da água. Ao sexto dia, o material foi levado ao laboratório para o processamento (60 larvas por réplica), seguindo a metodologia do Ensaio cometa conforme a descrição já apresentada.

Análises dos metais tóxicos e Radônio nas amostras de água

Radônio e os metais foram determinados nas amostras de água dos dois açudes, Parelhas e Lucrécia, no CRCN-NE, por meio das respectivas metodologias de Cintilação Líquida de Ultrabaixa Radiação de Fundo (CLURF), para detecção de Radônio na água, e por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) com Chama (FAAS) e com Forno de Grafite (GFAAS) para a quantificação dos elementos químicos essenciais, Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Zinco (Zn), e os metais tóxicos, Alumínio (Al), Cádmiio (Cd), Chumbo (Pb), Cromo (Cr) e Prata (Ag).

Cintilação Líquida de Ultra-Baixa Radiação de Fundo

Para a técnica LSC, a amostra de água é diretamente injetada no coquetel de cintilação, misturados homogeneamente (cintilador miscível) e a energia das radiações é absorvida pelo meio de três formas: térmica, iônica e excitação de moléculas da solução. Esta última excita os elétrons das camadas eletrônicas das moléculas do cintilador e estes, posteriormente, perdem a energia em excesso, emitindo fótons com intensidade proporcional à energia da radiação absorvida (Oliveira, 2014). Os

procedimentos de preparação prévia do coquetel cintilador, da coleta e mistura com as amostras de água feitas em Parelhas e Lucrécia e a análise final de ^{222}Rn nas amostras em água em Contador de Cintilação Líquida (LSC) da Perkin Elmer, modelo Quantulus 1220, foram realizadas de acordo com a descrição detalhada apresentada em Carmo-Neto et al. (*em preparação*). Resumidamente, as medições são realizadas por 100 minutos, assim como a obtenção da eficiência de contagem a partir de padrão interno com atividade de Ra-226 conhecida (20 Bq). As concentrações de atividade de ^{222}Rn (A_{Rn}) nas amostras foram calculadas a partir da Equação a seguir, de acordo com a *American Society for Testing and Materials – ASTM - 1998*:

$$A_{\text{Rn}} = \frac{R_A - R_B}{60 \times V \times E \times 3} e^{-\lambda t}$$

Espectrometria de Absorção Atômica

Na técnica AAS, é feita a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A partir desse fenômeno são determinadas as quantidades dos elementos químicos (metais ou não) na amostra. A espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) é a técnica mais utilizada para análises elementares, em nível de mg/L, enquanto que a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) é utilizada para determinação de baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g/L}$ (Krug et al., 2004). As análises químicas por FAAS e GFAAS foram realizadas de acordo com a descrição detalhada apresentada em Carmo-Neto et al. Os padrões internos das curvas analíticas de Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram obtidos utilizando soluções Merck (1000 mg/L) para obtenção de curvas analíticas e os comprimentos de onda foram selecionados de acordo com a sensibilidade necessária (Rothery, 1988). Para controle da qualidade do procedimento analítico, foram analisadas soluções padrões independentes intercaladas com as amostras de água.

Análise de Radônio (^{222}Rn) atmosférico

Foi feita a monitoração passiva do gás Radônio em uma residência do município de Lucrécia, com a exposição de dois detectores CR-39 em câmaras de difusão. Os dosímetros permaneceram por seis meses no local (entre janeiro a julho, 2019), considerado tempo suficiente para fornecer os dados necessários e evitar a sobreposição de traços produzidos pela partícula alfa. A revelação química foi feita com solução NaOH, em banho-maria, e solução 6 M de NaOH a 90 °C, utilizando banho termostático por um período de 5 h (Ahn e Lee, 2005). A contagem de número de

traços por unidade de campo foi feita em microscópio óptico e câmara de vídeo (Leica), em aumento de 40x, por meio de métodos quantitativos. A determinação da quantidade de traços por unidade de área dos dosímetros fornece a densidade (traços/cm²), parâmetro que é proporcional à concentração de ²²²Rn. Foram realizadas 30 leituras de campos por dosímetro. As imagens fotografadas foram armazenadas para posterior contagem de traços no programa MATLAB. A densidade de traços obtidos, descontado o *background* e o fator de calibração do sistema, serviram para o cálculo da concentração de atividade de ²²²Rn, como mostra a fórmula abaixo:

$$CRn = D/Kt$$

CRn	=	Concentração de ²²² Rn (Bq/m ³)
K	=	fator de calibração (traços/cm ² por Bq/m ³ /h ¹)
D	=	Densidade de traços líquida (descontada a densidade relativa à radiação de fundo no detector) (traços/cm ²)
t	=	tempo de exposição (h)

Para determinação do fator calibração dos CR-39 foram realizadas 19 exposições dos dosímetros, inseridos na câmara de calibração do CRCN-NE (RN1-CRCN) e expostos a uma atividade de 5,00 k/Bq/m³, com tempos de exposição variando de 24 a 850 h para obtenção do fator de calibração médio em traços cm²/h¹/Bq/m³, em função da exposição dos dosímetros ao ²²²Rn.

RESULTADOS

Análise da genotoxicidade das amostras de água dos açudes

O resultado do Ensaio cometa em células somáticas de *D. melanogaster* expostas às amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas e do açude de Lucrécia, nas diferentes épocas do ano amostradas (de 2018 e de 2019), estão descritos na **Tabela 1**, assim como os resultados dos tratamentos dos grupos controle negativo (água destilada) e controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL). Tanto o grupo controle negativo quanto o grupo controle positivo apresentaram danos significativamente diferentes, conforme o esperado, validando a metodologia para a comparação com os experimentos com as amostras de água. Na tabela 1 estão apresentados os valores da média e desvio padrão de cada nível de dano genético observado (de 0 a 4), os valores calculados de Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) e se ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos e seu respectivo controle negativo. A análise estatística feita pelo pós-

teste de Bonferroni, com comparações par a par entre dos valores médios obtidos nos tratamentos e os grupos controle, podem ser vistos nas **Tabelas S1 e S2 (Material Suplementar)**. Os resultados médios de ID e FD% estão destacados para cada ponto dos açudes (P1 a P6) (**Figuras 1 e 2**).

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos danos genéticos observados em hemócitos colhidos em larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon-R dos grupos Controle negativo (CN, tratadas com água destilada), Controle positivo (CP, tratadas com Ciclofosfamida, 1 mg/mL) e tratamentos com amostras de água dos municípios de Parelhas (pontos P1 a P3) e Lucrécia (P4 a P6), na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

Tratamentos		Nível de Dano (média ± DP)					ID	FD%
		0	1	2	3	4		
Parelhas								
Controle negativo	CN ^P	82,33 ± 3,06	14,33 ± 0,58	3,33 ± 2,52	0	0	21,00 ± 5,57	17,67 ± 3,06
Controle positivo	CP ^P	33,00 ± 10,54	17,67 ± 3,06	18,33 ± 13,05	22,00 ± 2,65	9,00 ± 3,00	156,33* ± 9,50	67,00* ± 10,54
Açude - período de chuvas (fev./2018)								
	P1	76,33 ± 2,08	17,33 ± 1,53	6,33 ± 1,15	0	0	30,00 ± 3,00	23,67 ± 2,08
	P2	79,00 ± 2,00	16,33 ± 1,53	4,67 ± 0,58	0	0	25,67 ± 2,52	21,00 ± 2,00
	P3	81,67 ± 1,53	15,67 ± 1,53	2,67 ± 1,53	0	0	21,00 ± 2,65	18,33 ± 1,53
Açude - período de estiagem (ago./2018)								
	P1	60,67 ± 1,15	25,00 ± 1,00	13,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	0	54,00* ± 4,58	39,33* ± 1,15
	P2	32,67 ± 2,31	26,00 ± 2,00	22,33 ± 0,58	19,00 ± 2,65	0,67 ± 0,58	130,33* ± 5,86	67,33* ± 2,31
	P3	69,67 ± 1,53	24,67 ± 1,53	5,67 ± 1,53	0	0	36,00 ± 2,65	30,33 ± 1,53
Lucrécia								
Controle negativo	CN ^L	86,67 ± 1,53	13,33 ± 1,53	0	0	0	13,33 ± 1,53	13,33 ± 1,53
Controle positivo	CP ^L	44,33 ± 4,04	25,00 ± 2,00	9,67 ± 2,25	8,33 ± 2,08	12,67 ± 2,89	120,00* ± 14,11	55,67* ± 4,04
Açude - período de chuvas (jan./2019)								
	P4	54,67 ± 4,51	18,67 ± 3,06	8,67 ± 3,21	8,67 ± 1,53	9,33 ± 2,08	99,33* ± 6,66	45,33* ± 4,51
	P5	63,00 ± 4,36	17,67 ± 1,15	9,67 ± 3,06	5,00 ± 1,73	4,67 ± 1,15	70,67* ± 9,29	37,00* ± 4,36
	P6	57,67 ± 1,15	20,00 ± 3,00	11,33 ± 2,52	5,33 ± 0,58	5,67 ± 1,53	81,33* ± 6,11	42,33* ± 1,15
Açude - período de estiagem (nov./2019)								
	P4	81,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00	0	0	0	19,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00
	P5	82,00 ± 2,00	18,00 ± 2,00	0	0	0	18,00 ± 2,00	18,00 ± 2,00
	P6	80,67 ± 1,53	17,33 ± 1,15	2,00 ± 1,00	0	0	21,33 ± 2,31	19,33 ± 1,53

Nível de Dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético.

Abreviações: ID, Índice de Dano; FD%, Frequência de Dano; DP, desvio padrão.

* representa as diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle negativo (CN).

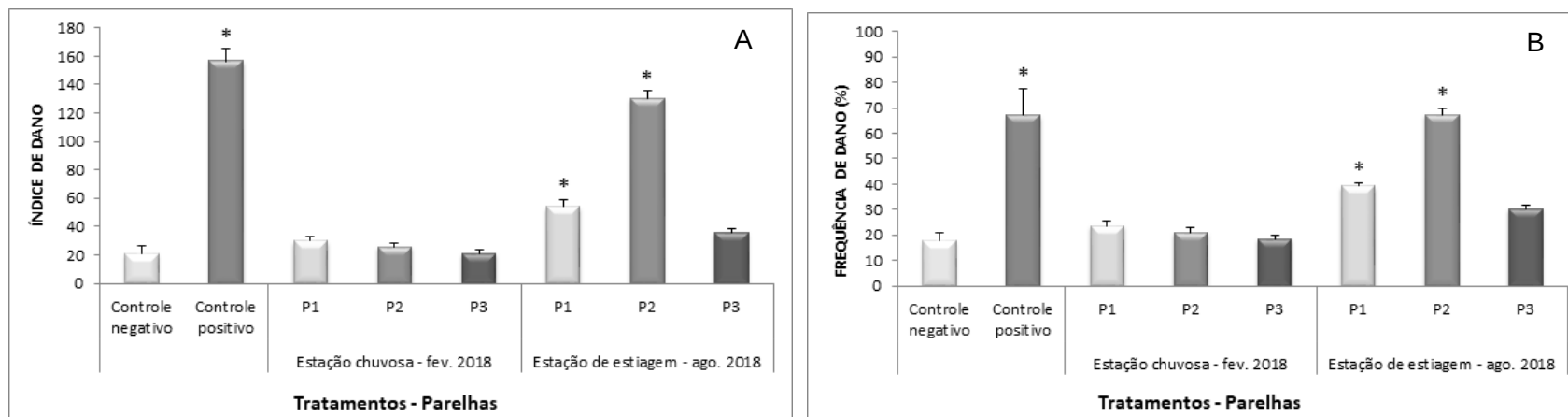


Figura 1. Resultados médios do Índice de Dano (A) e da Frequência de Dano (B) após exposição aos tratamentos do controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL), amostras de águas do açude de Parelhas (P1, P2 e 3), em duas estações do ano * (os valores foram significativos).

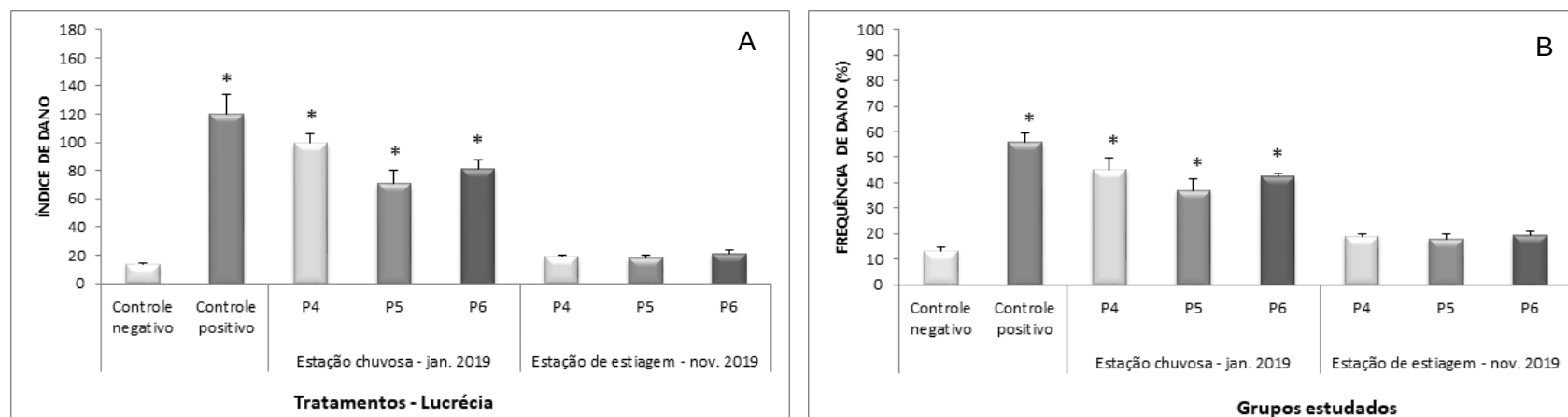


Figura 2. Resultados médios do Índice de Dano (A) e da Frequência de Dano (B) após exposição aos tratamentos do controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 1 mg/mL), amostras de águas do açude de Lucrécia (P4, P5 e P6), em duas estações do ano * (os valores foram significativos).

Como indicado na **Tabela 1** e na **Figura 1**, os valores médios mais elevados de ID e FD% foram obtidos no ponto P2, seguido de P1, na amostragem feita na estação de estiagem no açude de Parelhas (agosto, 2018), sendo superiores aos valores do grupo controle negativo. O efeito genotóxico observado em P1 e P2, na estação de estiagem, foram também superiores às amostras feitas na estação chuvosa (fevereiro, 2018) (**Tabela S1, Material Suplementar**). Nos resultados do açude de Lucrécia, os valores médios de ID e FD% (**Tabela 1** e na **Figura 2**) dos pontos amostrais, na estação chuvosa (janeiro, 2019), foram superiores não apenas aos valores do grupo controle negativo, mas também aos respectivos valores obtidos na estação de estiagem (novembro, 2019) (**Tabela S2**).

Medidas de Radônio nas amostras de água

A maioria das análises radiométricas de Radônio (^{222}Rn) dissolvido nas amostras de água dos açudes registraram valores baixos, menores que o limite de detecção ($<0,3 \text{ Bq/L}$) do equipamento utilizado (**Tabela 2**). Esses resultados dão sinais para o consumo seguro das águas, dentro dos limites permitidos pela USEPA (1999), abaixo de $11,1 \text{ Bq/L}$. Entretanto, três réplicas analisadas do açude de Lucrécia (P4 b, P5 b e P6 a) apresentaram valores elevados de ^{222}Rn , conforme indicado na **Tabela 2**.

Para melhor compreender a presença de Radônio, uma análise adicional da sua presença na atmosfera foi realizada em uma residência (*in-door*) do município de Lucrécia, e foi também avaliado seu possível efeito em larvas expostas ao ar atmosférico, por seis dias, em local no entorno do açude de Lucrécia. Os resultados da medição de ^{222}Rn no ar foram feitos por dois dosímetros CR-39 em local fechado, uma no centro urbano da cidade e outro em residência rural (no entorno do açude), que ficaram expostos entre janeiro e julho de 2019.

Os resultados indicaram valores de 78 Bq/m^3 e 40 Bq/m^3 , que estão abaixo do valor mínimo de risco ($<100 \text{ Bq/m}^3$), corroborando os resultados do Ensaio cometa, feitos com larvas expostas ao ar atmosférico no entorno do açude de Lucrécia (linhagens residente e Oregon-R). Os baixos níveis de ID obtidos nas duas linhagens testadas, residentes e Oregon-R (ID=43,33 e ID=24,00, respectivamente) e de FD% (FD%= 28,33 e FD%=15,67, respectivamente) não diferiram dos valores dos grupos controle negativo (para $P \leq 0,05$) (**Tabela S3, Material Suplementar**).

Tabela 2. Concentração da atividade do Radônio-222 (Bq/L) nas águas do açude de Parelhas e de Lucrécia identificadas por ponto amostral (P1 a P6), réplica (a, b, c) e época do ano.

Açudes		Rn-222 Fevereiro, 2018		Rn-222 Agosto, 2018	
		Média	U*	Média	U*
Parelhas					
P1	a	< 0,3		< 0,3	
	b	< 0,3		< 0,3	
	c	< 0,3		< 0,3	
P2	a	< 0,3		< 0,3	
	b	< 0,3		< 0,3	
	c	< 0,3		< 0,3	
P3	a	< 0,3		< 0,3	
	b	< 0,3		< 0,3	
	c	< 0,3		< 0,3	
Lucrécia					
P4	a	< 0,2		< 1,6	
	b	< 0,2		155 ±	3
	c	< 0,2		< 1,6	
P5	a	< 0,2		< 1,6	
	b	< 0,2		24,6 ±	1,1
	c	< 0,2		< 1,6	
P6	a	< 0,2		109 ±	2
	b	< 0,2		< 1,6	
	c	< 0,2		< 1,6	

U* incerteza analítica expandida no nível de confiança de 95%.

Análise da contaminação por metais nas amostras dos açudes

Na **Tabela 3** estão apresentadas as medidas de 11 metais em amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas, juntamente aos valores máximos permitidos para consumo humano pelo WHO (2011) e CONAMA (2005). A análise foi realizada apenas nas amostras de água da estação de estiagem (agosto, 2018). A maioria dos metais pesados (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) estiveram dentro dos limites permitidos nas amostras de água, e apenas Alumínio (0,11 mg/L) e Manganês (0,13 a 0,14 mg/L), no ponto P1 estiveram acima dos limites permitidos. Na **Tabela 4** estão apresentadas as medidas dos elementos traços para as amostras do açude de Lucrécia, todos com valores estiveram abaixo do recomendado.

Tabela 3. Valores (mg/L) de metais pesados obtidos nas amostras de água da estação seca (agosto, 2018) nos três pontos do açude Boqueirão de Parelhas (P1, P2 e P3 e suas réplicas a, b, c), em comparação com os limites máximos de cada metal (WHO, 2011; CONAMA, 2005). Destaque (em vermelho) aos valores de Alumínio e Manganês detectados acima do recomendado em réplicas do ponto P1 (CONAMA, 2005).

Parelhas		Metais essenciais e tóxicos (mg/L)										
		Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Al	Cd	Pb	Cr	Ag
WHO		-	2,0	0,3	0,4	0,07	-	-	0,003	0,01	0,05	-
CONAMA		0,05	0,009	0,3	0,1	0,025	0,18	0,1	0,001	0,01	0,05	0,01
Ponto	Réplica											
P1	A	<0,0014	0,0029 (0,0007)	0,09 (0,02)	0,14 (0,04)	<0,003	<0,008	0,11 (0,04)	<0,0004	<0,001	<0,0012	<0,0001
	B	<0,0014	0,0015 (0,0004)	0,10 (0,02)	0,13 (0,03)	<0,003	0,010 (0,002)	0,09 (0,03)	0,0005 (0,0002)	<0,001	<0,0012	0,00014 (0,00003)
	C	<0,0014	0,0011 (0,0003)	0,12 (0,02)	0,13 (0,03)	<0,003	0,028 (0,006)	0,10 (0,03)	0,0022 (0,0007)	<0,001	<0,0012	<0,0001
P2	A	<0,0014	0,0012 (0,0003)	0,017 (0,003)	0,09 (0,02)	0,0026 (0,0009)	<0,008	0,028 (0,009)	<0,0004	<0,001	0,0025 (0,0009)	<0,0001
	B	<0,0014	0,0012 (0,0003)	0,015 (0,003)	0,09 (0,02)	<0,003	<0,008	0,021 (0,007)	<0,0004	<0,001	<0,0012	<0,0001
	C	<0,0014	0,0009 (0,0002)	0,011 (0,002)	0,09 (0,02)	<0,003	0,010 (0,002)	0,043 (0,014)	0,0007 (0,0002)	<0,001	<0,0012	<0,0001
P3	A	0,0020 (0,0008)	0,0010 (0,0002)	0,060 (0,012)	0,09 (0,02)	<0,003	0,017 (0,004)	0,08 (0,003)	0,0016 (0,0005)	<0,001	<0,0012	<0,0001
	B	<0,0014	0,0010 (0,0002)	0,076 (0,015)	0,09 (0,02)	<0,003	0,012 (0,003)	0,08 (0,003)	<0,0004	<0,001	<0,0012	<0,0001
	C	<0,0014	0,0008 (0,0002)	0,085 (0,017)	0,09 (0,02)	<0,003	<0,008	0,07 (0,002)	<0,0004	<0,001	<0,0012	<0,0001

Valores entre parênteses são referentes às incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança.

Tabela 4. Valores (mg/L) de metais pesados obtidos nas amostras de água da estação seca (novembro, 2019) nos três pontos do açude de Lucrécia (P4, P5 e P6 e suas réplicas a, b, c) em comparação com os limites máximos de cada metal (WHO, 2011; CONAMA, 2005).

Lucrécia		Metais essenciais e tóxicos (mg/L)										
		Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Al	Cd	Pb	Cr	Ag
WHO		-	2,0	0,3	0,4	0,07	-	-	0,003	0,01	0,05	-
CONAMA		0,05	0,009	0,3	0,1	0,025	0,18	0,1	0,001	0,01	0,05	0,01
Ponto	Réplica											
P1	a	<0,0004	<0,0014	0,066 (0,016)	0,0058 (0,0016)	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
	b	<0,0004	<0,0014	0,12 (0,02)	0,013 (0,004)	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	0,00014 (0,00003)	<0,010	<0,0004
	c	<0,0004	<0,0014	0,13 (0,03)	<0,0018	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
P2	a	<0,0004	<0,0014	0,090 (0,019)	<0,0018	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
	b	<0,0004	<0,0014	0,080 (0,016)	<0,0018	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
	c	<0,0004	<0,0014	0,079 (0,019)	0,009 (0,002)	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	0,00013 (0,00002)	<0,010	<0,0004
P3	a	<0,0004	<0,0014	0,096 (0,019)	0,0031 (0,0009)	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
	b	<0,0004	<0,0014	0,087 (0,017)	0,0026 (0,0009)	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004
	c	<0,0004	0,0024 (0,0009)	0,16 (0,03)	<0,0018	<0,0010	<0,012	<0,02	<0,00002	<0,00012	<0,010	<0,0004

Valores entre parênteses são referentes às incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) e amostras de água do açude Boqueirão de Parelhas (P1 a P3).

Tratamentos		CN	CP	Estação chuvosa (Fevereiro, 2018)			Estação de estiagem (Agosto, 2018)		
				P1	P2	P3	P1	P2	P3
Fevereiro 2018	CN		0.0001*	1.000	1.000	1.000	0.0001*	0.0001*	0.053
	CP	0.0001*		0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	1.000	0.0001*
	P1	1.000	0.0001*		1.000	1.000	0.009*	0.0001*	1.000
	P2	1.000	0.0001*	1.000		1.000	0.002*	0.0001*	0.413
	P3	1.000	0.0001*	1.000	1.000		0.0001*	0.0001*	0.081*
Agosto 2018	P1	0.0001*	0.0001*	0.001*	0.0001*	0.0001*		0.0001*	0.504
	P2	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*		0.0001*
	P3	0.064	0.0001*	1.000	0.671	0.064	0.014*	0.0001*	

* Valores significativos (P <0.05).

Tabela S2. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) e amostras de água do açude de Lucrécia (P4 a P5).

Tratamentos		CN	CP	Estação chuvosa (Janeiro, 2019)			Estação de estiagem (Novembro, 2019)		
				P4	P5	P6	P4	P5	P6
Janeiro 2019	CN		0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.803	1.000	0.605
	CP	0.0001*		0.013*	0.0001*	0.001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*
	P4	0.0001*	0.057		0.077	1.000	0.0001*	0.0001*	0.0001*
	P5	0.0001*	0.0001*	0.003*		1.000	0.0001*	0.0001*	0.0001*
	P6	0.0001*	0.0001*	0.156	1.000		0.0001*	0.0001*	0.0001*
Novembro 2019	P4	1.000	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*		1.000	1.000
	P5	1.000	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	1.000		1.000
	P6	1.000	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	1.000	1.000	

* Valores significativos (P <0.05).

Tabela S3. Análise estatística (pós teste de Bonferroni) dos valores médios do Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos de *Drosophila melanogaster* CN-controle negativo (água destilada), CP-controle positivo (Ciclofosfamida) feitos com água do açude de Lucrécia, e grupos RE-linhagem residente, e OR-linhagem Oregon-R, expostas ao ambiente atmosférico no entorno do açude de Lucrécia, em julho de 2019.

Tratamentos	CN	CP	Julho, 2019	
			RE	OR
CN		0.003*	0.478	1.000
CP	0.0001*		0.004*	0.039*
RE	1.000	0.001*		0.772
OR	0.406	0.004*	1.000	

* Valores significativos ($P < 0.05$).

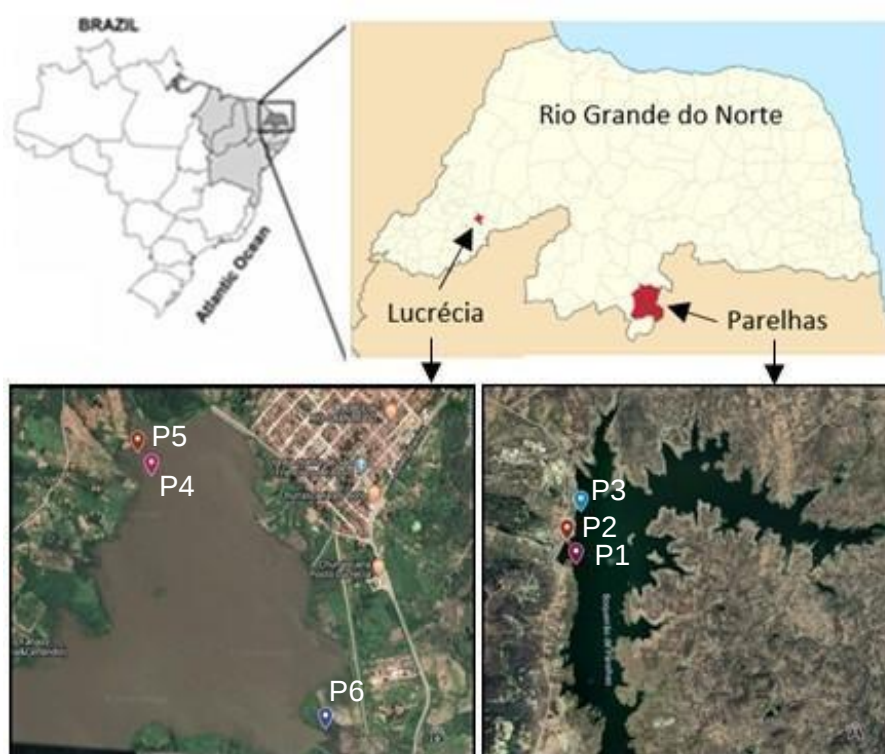


Figura S1. Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste (cinza claro), o estado do Rio Grande do Norte (cinza escuro). As setas indicam a localização geográfica dos municípios de Parelhas e Lucrécia, no semiárido do estado do Rio Grande do Norte, e os respectivos açude e pontos de coleta das amostras de água estudadas.

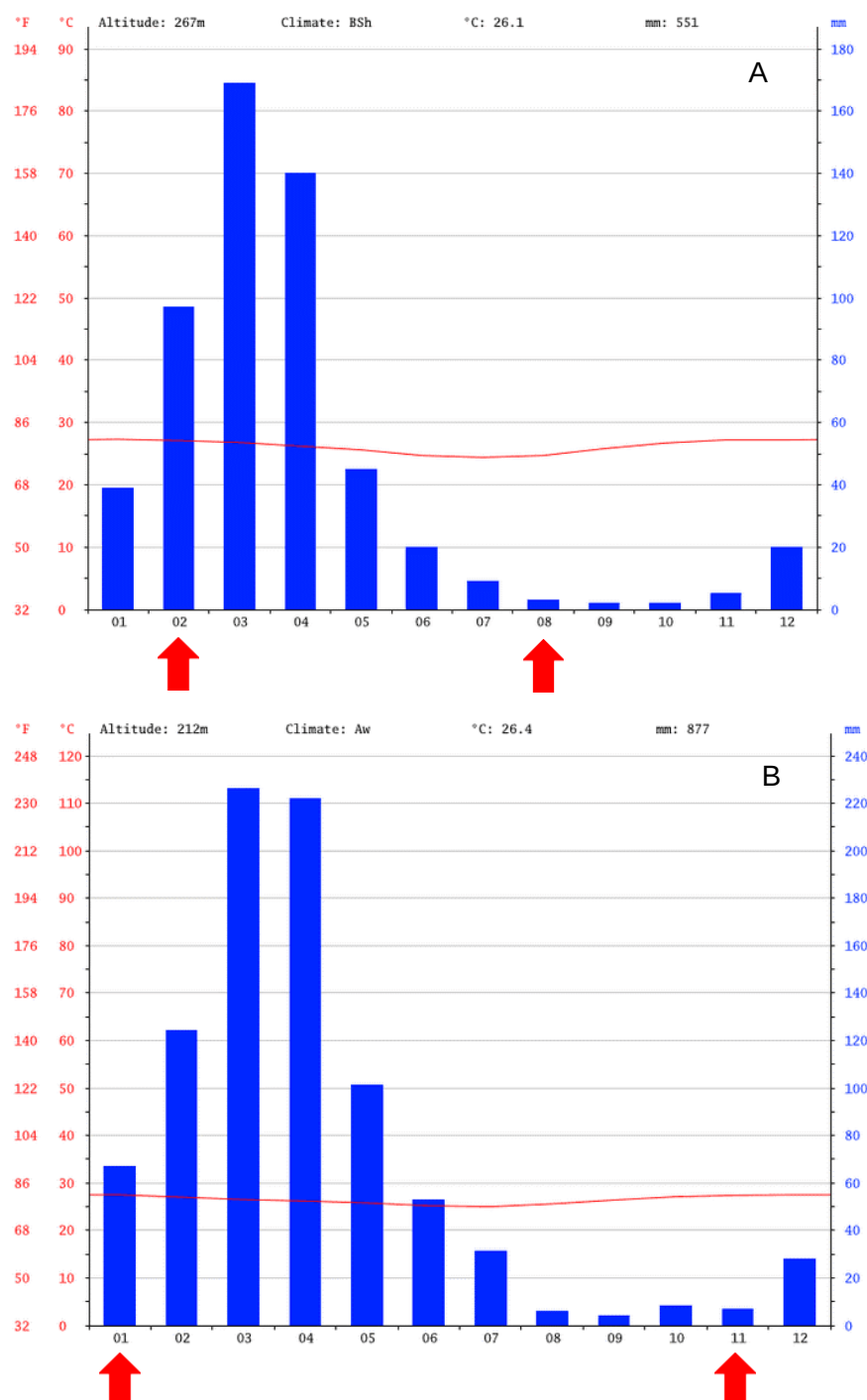


Figura S2. Indicação dos valores mensais das precipitações (mm) ocorridas no município de Parelhas (A) e Lucrécia (B), estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A linha vermelha indica as flutuações mensais de temperatura, com média anual de 26,1 °C e 26,4 °C, respectivamente. Fone: Climate-data.org (<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-norte/parelhas-42622/#climate-graph>) para o período 1982-2012. As setas indicam os meses das amostragens de água no açude de Parelhas (02=fevereiro; 08=agosto) e no açude de Lucrécia ((01=janeiro; 11=novembro).

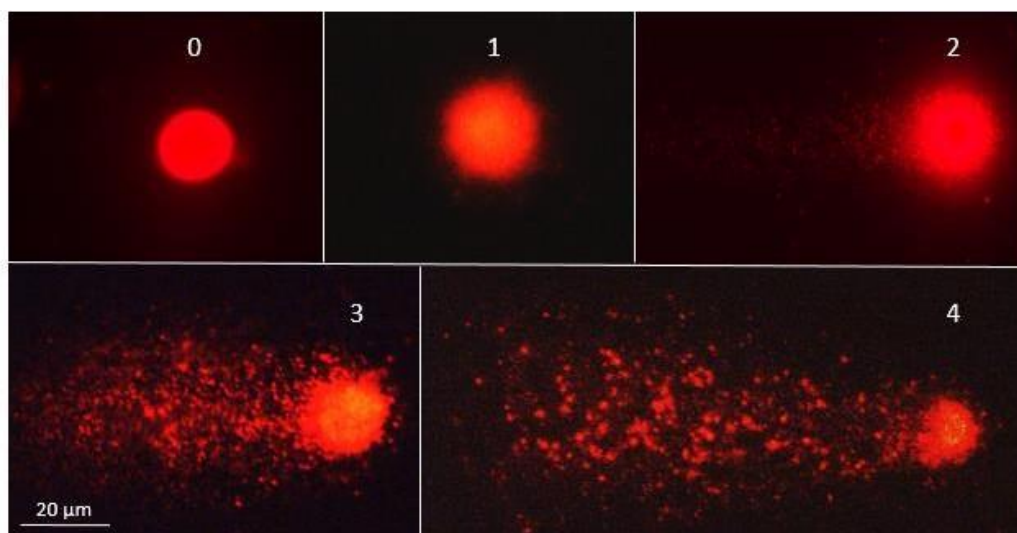


Figura S3. Imagens representativas dos cinco níveis de dano genético (0 a 4) de acordo com o comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* coradas com GelRed e fotografados em microscopia de fluorescência. Fonte: Verçosa et al. (2017), com permissão.

DISCUSSÃO

A manutenção da integridade funcional do genoma e a capacidade dos organismos em reverter ou lidar com possíveis danos genéticos estão envolvidos diretamente com o sucesso da espécie, devido à garantia da sobrevivência da prole de seus indivíduos, mesmo diante da presença de agentes químicos tóxicos ou da radiação (Martins e Costa 2017). Após um dano genético ser gerado, o sistema de reparo celular pode corrigir a mutação, ou pode ocorrer acúmulo de lesões que causam uma série de disfunções metabólicas, a morte celular, ou do indivíduo. Além disso, é possível que substâncias contaminantes tóxicas diversas liberadas na água não gerem efeitos agudos em organismos expostos, mas sim na redução de sobrevivência, aumentando os danos teciduais, em células somáticas e germinativas, e gerando neoplasias (Galindo et al., 2012). Segundo Shim et al. (2014), as células de vários organismos têm a capacidade de responder prontamente à radiação ionizante, e como exemplo disso, as células de *Drosophila melanogaster* atrasam o ciclo celular, induzem reparo ou estimulam a apoptose. A genotoxicidade é, portanto, um fenômeno de grandes repercussões, que afeta todos os aspectos dos organismos expostos e o funcionamento do ecossistema como um todo.

Na busca por informações sobre esse fenômeno, é primordial a determinação de seu efeito no ambiente natural, para além em condições controladas em laboratório, e estudos nos mais diversos organismos. Diante disso, nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito de diversas fontes hídricas da região Nordeste do Brasil, aplicando ensaios genotóxicos com o organismo *Drosophila melanogaster* para suporte científico de sua aplicação como espécie sentinela para a bioindicação ambiental.

Avaliar a presença de elementos traço é muito importante, especialmente diante de duas realidades da região Nordeste do Brasil: o fato de os ambientes sofrerem os efeitos adversos do regime flutuante e da escassez hídrica; e o constante crescimento urbano e econômico em toda região, com demanda cada vez maior pela água. Além disso, é esperado que até 2030 o consumo de água cresça 24% na região (IANAS, 2019), o que vai amplificar os problemas causados pela seca, associado à precariedade regional para ampliação da infraestrutura de distribuição de água potável.

Como destacado por Garcia et al. (2011), o estudo da genotoxicidade em uma amostra ambiental complexa como a água requer o uso de diferentes métodos

genéticos, o que justifica o uso de *D. melanogaster* em novos estudos. Além disso, a água é uma mistura que pode ser contaminada rapidamente, ou que pode também ser recuperada com medidas de controle de poluentes. Nesse contexto, este estudo investigou o efeito genotóxico de poluentes ambientais de dois açudes, no organismo *Drosophila melanogaster*, com avaliação de Radônio e metais essenciais (Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) e tóxicos (Al, Cd, Pb, Cr e Ag), nas amostras do açude de Parelhas (2018) e de Lucrécia (2019).

No açude de Parelhas a maioria dos metais-traço avaliados estiveram abaixo dos limites máximos estabelecidos pelo CONAMA (2005) e WHO (2011). Portanto, os resultados positivos do efeito genotóxico observados em *D. melanogaster* em duas das três amostras de água de Parelhas não puderam ser explicados pela presença desses elementos. Os resultados parecem indicar também que houve menor contaminação das águas do açude de Parelhas no ano de 2018, em relação aos anos de 2013 e 2014, quando Chaves et al. (2016) detectaram Al, Ag, Co, Fe, Ni e Pb acima dos limites recomendados, e observaram genotoxicidade positiva no peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*), nas amostras de fevereiro e julho de 2014. Além disso, os autores registraram níveis elevados de partículas alfa (emitidas por ^{222}Rn e por ^{226}Ra) e partículas beta (emitidas por ^{228}Ra) em águas amostradas em julho, 2013 e fevereiro, 2014, mas não em julho de 2014. Passados quatro anos, nosso estudo não registrou concentrações elevadas de ^{222}Rn e ^{226}Ra nas amostragens do açude de Parelhas, feitas fevereiro e agosto de 2018.

Em Lucrécia, as medidas de ^{222}Rn do açude foram baixas na maioria das amostras ($<0,3$ Bq/L de ^{222}Rn), porém ficou evidente que eventos de liberação de Radônio do solo para a água estão acontecendo, com medidas elevadas em algumas réplicas (**Tabela 2**). Para complementar essa informação acerca do Radônio liberado, sua presença foi monitorada no ar, e os dosímetros também registraram doses baixas de ($<11,1$ Bq/L, USEPA 1999). Também não houve registro de efeito genotóxico em indivíduos de diferentes linhagens de *D. melanogaster* expostos por seis dias ao ambiente atmosférico do entorno do açude de Lucrécia (**Tabela S3, Material Suplementar**). Por outro lado, amostras de água desse açude, do período chuvoso (janeiro, 2019) foram genotóxicas em *D. melanogaster*, diferente do período de estiagem (novembro, 2019).

Estudos feitos no açude de Lucrécia por Marcon et al. (2010); Garcia et al. (2011) e Marcon et al. (2017) avaliaram a genotoxicidade em outros organismos, tanto

vegetais quanto animais. Marcon et al. (2010) aplicaram o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares no peixe *O. niloticus*, submetido a amostras de água de duas estações chuvosas (março, 2007 e maio, 2008) e duas estações secas (outubro, 2006 e agosto, 2007), com resultados positivos de genotoxicidade em todos os testes. Também foi investigada a presença de cianobactérias com registro de espécies em níveis tóxicos em várias amostras de água, entre 2006 e 2008. Por fim, diferentes metais tóxicos foram encontrados nas amostragens feitas, dentre eles o Cd, Pb, Zn, Cr, Cu, Ni e Mn. Os autores concluem que o açude de Lucrécia contém poluentes químicos e microbiológicos com potencial genotóxico que podem comprometer negativamente as espécies que habitam esse ecossistema. Dados do nosso estudo, feitos em Lucrécia uma década depois indicam que há riscos no consumo das águas devido ao efeito genotóxico observado em hemócitos de *D. melanogaster*, a depender da época da amostragem da água.

Efeito genotóxico também foi observado por Garcia et al. (2011), que aplicaram o teste de micronúcleo na planta *Tradescantia pallida* cultivada com amostras de água do açude de Lucrécia. Elevado número de danos foi observado na estação de estiagem (novembro de 2009) e níveis baixos, nas amostras da estação chuvosa (maio de 2010), em relação ao grupo controle negativo, da mesma forma como observamos com *D. melanogaster*. Garcia et al. (2011) também observaram efeito genotóxico em linfócitos periféricos humanos (BCMN), com maior número de casos de micronúcleos em amostras da estação seca, em relação a estação chuvosa. Quanto aos metais tóxicos avaliados (Cd, Pb, Zn, Cr, Cu, Ni e Mn) dois (Cd e Cu) estiveram acima do limite permitido nas amostras da estação seca (novembro, 2009) e quatro (Cd, Pb, Ni, Mn), nas amostras da estação chuvosa (maio, 2010).

Os estudos de Marcon et al. (2010), Garcia et al. (2011) e também Marcon et al. (2017) não avaliaram a presença de Radônio nas amostras de água do açude de Lucrécia. Marcon et al. (2017) analisaram o efeito *in-door* de Radônio, Urânio, Potássio e Tório em Lucrécia; mediram metais tóxicos em amostras de água de torneira consumidas pela população humana; e analisaram o efeito genotóxico em 35 habitantes da cidade, com amostras de células de esfoliação bucal. Das cinco medidas em água potável feitas pelos autores entre 2007 e 2009, Cr esteve presente em níveis acima dos permitidos em três amostras, e Mn e Ni, estiveram presentes em apenas uma amostra. A maioria das residências (97%) apresentou valores de Radônio superiores a 100 Bq/m³ (OMS, 2009). Na análise da radiação *in-door*, ²²²Rn foi

considerada a principal fonte de radioatividade, representando 83 a 91% da radiação total medida (Marcon et al., 2017). Em nosso estudo feito com dosímetros em locais fechados, e por exposição de *D. melanogaster* ao ar no entorno do açude de Lucrécia, não houve efeito genotóxico. E na maioria da 18 amostras de água do açude, Radônio esteve abaixo de 0,03 Bq/L em quinze amostras.

Assim como no açude de Parelhas, os metais pesados avaliados neste estudo, no período seco em Lucrécia, estiveram dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA (2005) e WHO (2011), de forma que água doce dos dois locais poderia ser classificada como Classe I, de boa qualidade para o consumo humano (CONAMA, 1995). Os resultados de genotoxicidade, entretanto, indicam que outros elementos estão presentes e atuando na geração de danos ao material genético, conforme aqui demonstrado.

Diante dos variados resultados acerca da problemática ambiental da radiação natural sobre ambientes aquáticos na região semiárida do Nordeste do Brasil, como os que apresnetados, cabe destacar a grande versatilidade do organismo sentinela *Drosophila melanogaster*, que se mostrou muito adequado não só para investigação do potencial genotóxico de compostos presentes na água dos açudes, mas também em amostras de ar, facilmente realizados em um mesmo período amostral.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Agradecimentos especiais aos colegas do Laboratório de Genética do CAV-UFPE e Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) pela ajuda durante toda a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AHN, G.H.; LEE, J-K. Construction of an environmental radon monitoring system using CR-39 nuclear track detectors. **Nuclear Engineering and Technology**, v.37, n. 4, 2005.
- AMORIM, E.M.; SANTANA, S.L.; SILVA, A.S.; AQUINO, N.C.; SILVEIRA, E.R.;

XIMENES, R.M.; ROHDE, C. Genotoxic assessment of the dry decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) leaves in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by the Comet and SMART assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 61, n. 3, p. 329-337, 2020.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research**, 767, 67-76, 2016.

BARBOSA, J.S.; CABRAL, T.M.; FERREIRA, D.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution** 112:285-298, 2001.

BECKINGHAM, K.M.; ARMSTRONG, J.D.; TEXADA, M.J.; MUNJAAL, R.; BAKER, D.A. *Drosophila melanogaster* - the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. **Gravitation and Space Biology Bulletin**, v. 18, n. 2, p.17-29, 2005.

CARMONA ER, GUECHEVA TN, CREUS A, MARCOS R. Proposal of an *in vivo* comet assay using hemocytes of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 52, 165-169, 2011.

CARMO-NETO, E.F.; SANTANA, S.L.; AMORIM, E.M.; AMARAL, D.S.; NASCIMENTO, A.F.; FRANÇA, E.J.; CHAGAS, C.A.; ROHDE, C. Genotoxic effect of well and tap water of municipalities from the semi-arid region of Brazil and its association with Radon and toxic chemical elements. (*em preparação*).

CASTRO, I.F.A. **Avaliação da atividade genotóxica da radiação natural presente na cidade de Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco, Recife, 2016.

CHAVES, L. C.C.; NAVONI, J.A.; FERREIRA, D.M.; MEDEIROS, S.B.; COSTA, T.F.; PETTA, R.A.; AMARAL, V.S. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7572-7581, 2016.

CLIMATE-DATA. **Climate Data for Cities Worldwide**. Disponível em: <https://en.climate-data.org>. Acesso em: mar., 2020.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 04 jan. 2019.

CPRN - Serviço Geológico do Brasil. **Mapa Geológico do Estado do Rio Grande do Norte**. 2006.

DANTAS R.C., NAVONI, J.A.; DE ALENCAR, F.L.S.; DA COSTA, X.L.A, DO AMARAL, V.S. Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 1, p. 143-157, jan. 2020.

DANTAS, R.C.; NAVONI, J.A.; FERREIRA, D.M.; COSTA, T.F.; MEDEIROS, S.R.B.;

AMARAL, V.S. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian semiarid region. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 275-282, 2017.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, article 304, p. 1-8, 2014.

GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no litoral de Salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2012.

GARCIA, A.C.F.; MARCON, A.E.; FERREIRA, D.M.; SANTOS, E.A.B.; AMARAL, V.S.; MEDEIROS, S.R.B. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 3329-3335, 2011.

GLADSTONE, M.; SU, T.T. Chemical genetics and drug screening in *Drosophila* cancer models. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, p. 497-504, 2011.

IAEA - International Atomic Energy Agency. **World Distribution of Uranium Deposits**. (UDEPO) with Uranium Deposit Classification. AIEA, Vienna. 2009. Disponível em: <https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE_1629_web.pdf> Acesso em: 16 aug. 2020.

IANAS - Inter-American Network of Academies of Sciences. **Water Quality in the Americas. Risks and Opportunities**. Vammen, K.; Vaux, H.J.; Roldán, G.; González, E.; Tundisi, J.G.; Izurieta, R.; Fabrega, J. (Eds). Mexico. ISBN: 978-607-8379-33-0, March 2019.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. **Censo Demográfico de 2010**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/parelhas/panorama>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Semiárido Brasileiro**. 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

IGARN - Instituto de Gestão das Águas do Estado do Rio Grande do Norte - RN. **Volumetric Situation of RN Reservoirs**. Disponível em: <<http://sistemas.searh.rn.gov.br/MonitoramentoVolumetrico>> Acesso em: 01 mar. 2020.

KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. **Espectrometria de Absorção Atômica**. Parte 1: **Fundamentos e atomização com chama**, 2004. Disponível em <<https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1-revisada.pdf>> Acesso em: 30 jul. 2020.

LENZ, S.; KARSTEN, P.; SCHULZ, J.B.; VOIGT, A. *Drosophila* as a screening tool to study human neuro degenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 453-460, 2013.

LUCENA, R.L.; CABRAL JÚNIOR, J.B.; STEINKE, E.T. Comportamento Hidroclimatológico do Estado do Rio Grande do Norte e do Município de Caicó. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 33, n. 3, 485-496, 2018.

MARTINS, M.; COSTA, P.M. **The Comet assay in aquatic (eco)genotoxicology using non-conventional model organisms: relevance, constraints and prospects**.

Chapter 1. In: Issues in Toxicology No. 33. Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models, M. L. Larramendy (ed.). Royal Society of Chemistry, p. 3-32, 2017.

MARCON, A.E.; FERREIRA, D.D.E.M.; MOURA, M.D.E.F.; CAMPOS, T.F.; AMARAL, V.S.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere** v. 81, n. 6, p. 773-780, 2010.

MARCON, A.E.; NAVONI, J.A.; GALVÃO, M.F.O.; GARCIA, A.C.F.S. et al. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v.167, p.36-43, 2017.

MARCOS, R.; CARMONA, E.E. 2019. **The wing-spot and the comet tests as useful assays for detecting genotoxicity in *Drosophila***. In: Dhawan A. and Bajpayee M. (eds). Methods in Molecular Biology. Genotoxicity Assessment, Methods and Protocols. Humana Press, Springer Nature, New York, Chapter 19, 337-348. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9>. Acesso em: 10 dez. 2020.

MARENGO, J.A.; ALVES, L.M.; ALVALA, R.C.S.; CUNHA, A.P.; BRITO, S.; MORAES, O.L.L. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n.2, p. 1973-1985, 2018.

MARENGO; J.A.; TORRES, R.R.; ALVES, L.M. Drought in Northeast Brazil-past, present, and future. **Theoretical and Applied Climatology**, v.129, p.1189-1200, 2017.

MASINDI, V.; MUEDI, K.L. **Environmental contamination by heavy metals**. Chapter 7, p.115-133, In: Hosam El-Din M. Saleh & Refaat Fekry Eid Sayed Aglan (ed.), Heavy Metals, IntechOpen, 2018.

MIRZOYAN, Z.; SOLLAZZO, M.; ALLOCCA, M.; VALENZA, A.; GRIFONI, D.; BELLOSTA, P. *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. **Frontiers in Genetics**, v.10, n. 51, p. 1-16, 2019.

MISHRA, M., SHARMA, A., NEGI, M.P., DWIVEDI, U.N., CHOWDHURI, D.K. Tracing the tracks of genotoxicity by trivalent and hexavalent chromium in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 722, n. 1, p. 44-51, 2011.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. **Mutagenesis** v. 19, 85-90, 2004.

OLIVEIRA, T.C. **Estabelecimento de Metodologia para Determinação de ⁹³Zr em Rejeitos Radioativos por Espectrometria de Cintilação Líquida (LSC) e Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências e Técnicas Nucleares), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PANCHAL, K.; TIWARI, A.K. *Drosophila melanogaster* "a potential model organism" for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomed. Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331-1345, 2017.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews** v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.

PEREIRA-NETO, M.C. Perspectivas da açudagem no semiárido brasileiro e suas implicações na região do Seridó potiguar. **Revista Sociedade & Natureza**, v. 29, n. 2,

p. 285-294, 2017.

RAND, MD. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 74-83, 2010.

ROTHERY, E. **Analytical methods for graphite tube atomizers**. Varian, Victoria, 1988.

SANTANA, S.L.; VERÇOSA, C.J., CASTRO, I.F., et al. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research** v. 25, p. 32409-32417, 2018.

SHARMA, A., SHUKLA, A.K., MISHRA, M., CHOWDHURI, D. K. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral comet assay. **Mutation Research** v. 721, p. 142-146, 2011.

SHIM, H.J., LEE, H., NGUYEN, L.D., SHIM, J., SONG, Y. High-dose irradiation induces cell cycle arrest, apoptosis, and developmental defects during *Drosophila* oogenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e89009, 2014.

SHUKLA, A.K., PRAGYA, P., CHOWDHURI, D.K. A modified alkaline comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** v. 726, p. 222-226, 2011.

SIDDIQUE, H.R., SHARMA, A., GUPTA, S.C., MURTHY, R.C., DHAWAN, A., SAXENA, D.K., et al. DNA damage induced by industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*: a mechanistic approach. **Environmental and Molecular Mutagenesis** v. 49, p. 206-216, 2008.

SIDDIQUE, H.R.; GUPTA, S.C.; DHAWAN, A., et al. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 189-197, 2005.

SINGH, R.; GAUTAM, N.; MISHRA, A.; GUPTA, R. Heavy metals and living systems: An overview. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n.3, p. 246–253, 2011.

USEPA. **Office of groundwater and drinking water rule: technical fact sheet EPA 815-F-99-006**. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 1999.

VERÇOSA C.J., MORAES FILHO, A.V., CASTRO, I.F.A., et al. Validation of comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 141, p. 148-153, 2017.

VERÇOSA, C.J.; CASTRO, I.F.A.; GARCIA, A.C.L.; ROHDE C. An efficient rearing population cage to expose Drosophilids to various environmental agents. **Drosophila Information Service** v. 98, p. 144-145, 2015.

VERMA, A., SENGUPTA, S., LAKHOTIA, S.C. DNA pol-ε gene is indispensable for the survival and growth of *Drosophila melanogaster*. **Genesis** v. 50, p. 86-101, 2012.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. Fourth edition. 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=16F178FF205CDA4A44613A9D4ED0E544?sequence=1>. Acesso em: 04 jan 2019.

5. CONCLUSÃO

Danos genotóxicos, medidos por meio do Índice de Dano (ID) e Frequência do Dano (FD%) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (linhagem Oregon-R) mostraram que há diferenças significativas entre amostras de água do açude de Lucrécia, dependendo do período do ano amostrado. Níveis elevados de genotoxicidade foram superiores no período de estiagem da região (janeiro, 2019).

Os efeitos genotóxicos decorrentes da exposição a água do açude de Lucrécia, no período de estiagem, não estiveram associados à presença de Radônio, que estiveram abaixo dos limites de detecção ($< 0,03$ Bq/L).

Grande parte das amostragens de água feitas no período chuvoso e seco em Lucrécia não registraram presença de Radônio (^{222}Rn). Entretanto, foram detectado valores acima de 11,1 Bq/L em três réplicas (P4 b, P5 b e P6 a), indicando sua ocorrência em algumas amostras, o que não foi confirmado na avaliação do ar atmosférico do município de Lucrécia, feita por dois dosímetros *in-door*. Da mesma forma, a exposição das linhagens de *D. melanogaster* (Oregon-R e residentes) ao ar atmosférico em local do entorno do açude de Lucrécia, não gerou efeito genotóxico na comparação com o grupo controle negativo.

Este estudo demonstrou a sensibilidade de *D. melanogaster* para fins de detecções de danos no material genético associados a elementos traço presentes em amostras de açude de Lucrécia. No estudo, correlato realizado por Carmo-Neto (2019), feito no açude de Parelhas, foram obtidos resultados similares, com níveis baixos de Radônio e 11 metais pesados nas amostras de água, independente da estação. Carmo-Neto (2019) também registrou genotoxicidade diferenciada dependendo da estação do ano. Nesse caso, porém, os maiores valores de ID e FD% foram observados na estação de estiagem.

Mesmo considerando a complexidade de substâncias encontradas na água, que podem interferir nos resultados, sem deixar evidente quais agentes causam danos genéticos, a detecção dos danos do meio sobre os organismos vivos, como bioindicadores, aproximam as consequências destes agentes à realidade da grande maioria dos seres vivos. Nesse sentido, *D. melanogaster* é apresentado como um organismo sentinela versátil a ser utilizado, não só por suas vantagens práticas de aplicação do Ensaio cometa, mas também por realizar diversas reações de ativação

metabólica similares às que acontecem com mamíferos, sendo um excelente modelo de estudos dos efeitos que podem atingir também os seres humanos.

REFERÊNCIAS

ACIOLE, E.H.P.; GUIMARAES, N.N.; SILVA, A.S.; AMORIM, E.M.; NUNOMURA, S.M.; GARCIA, A.C.L.; CUNHA, K.S.; ROHDE, C. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, p. 559-565, 2014.

ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, mar. 2000.

AHMED, K.; HABIBULLAH-AL-MAMUN, HOSSAIN, M.A.; ARIF, M.; PARVIN, E.; AKTER, M.S. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, p. 143-149, mar. 2011.

ALARABY, M.; ANNANGI, B.; MARCOS, R.; HERNÁNDEZ, A. *Drosophila melanogaster* as a suitable in vivo model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**. v.19, n.2, p. 65–104, abr. 2016.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. **Chemosphere**, v.91, n.7, p.869–881, mai. 2013.

AMARAL, V. S.; SINIGAGLIA, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. 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**, v. 139, p. 469-476, 2006.

AMINI, M. Putting geogenic contamination on the map. **Eawag News - Aquatic Res**, v.71, p.6–9, nov. 2011.

AMORIM, E.M.; SANTANA, S.L.; SILVA, A.S.; AQUINO, N.C.; SILVEIRA, E.R.; XIMENES, R.M.; ROHDE, C. Genotoxic assessment of the dry decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) leaves in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by the Comet and SMART assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 61, n. 3, p. 329-337, mar. 2020.

ANA - Agência Nacional de Águas. Informe 2016 do Relatório Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil. Disponível em: <<https://monitordesecas.ana.gov.br>> 2016

ARAÚJO, J.A.; SOUZA, R.F. Aporte antropogênico de metais pesados em sedimentos de corrente de áreas de lixão, urbanizadas e agrícola, em Parelhas-RN, região semiárida do Brasil. **Geografia (Londrina)**, v.21, n.3, p. 5–22, set/dez. 2012.

ATSDR. 2015. **Priority list of hazardous substances**. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#modalIdString_myTable2015>. Acesso em: mar 2020.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects-Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, jan-mar. 2016.

AZQUETA, A.; COLLINS, S.A. Detection of oxidised DNA using DNA repair enzymes, In: A. Dhawan, D.R. Anderson (Eds.), *The Comet Assay in Toxicology*, RSC Publ., Cambridge, pp. 57-78, 2009.

BÄCHLI, G. TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae. 2020. Disponível em: <<http://taxodros.unizh.ch>> Acesso em: março 2020.

BARILLET, S., ADAM-GUILLERMIN, C., PALLUEL, O., PORCHER, J.M., DEVAUX, A. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. **Environmental Pollution**, v.159, n.2, p.495–502, fev. 2011

BASHEER, S.; VASUDEV, V.; VENU, R.; GURUPRASAD, K.P.; HARISH, S.K. Toxic effects of a recently introduced carbamate pesticide, Dunet (methomyl) on *Drosophila melanogaster*. **Journal of Environmental Biology**, v. 20, n.2, p.135–139, abr 1999.

BECKINGHAM, K.M.; ARMSTRONG, J.D.; TEXADA, M.J.; MUNJAAL, R.; BAKER, D.A. *Drosophila melanogaster*-the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. **American Society for Gravitational and Space Biology**, v.18, n.2, p.7-29, jun. 2005.

BENFORD D.J.; HANLEY B.A.; BOTTRILL K.; OEHLISCHLAGER S.; BALLS M.; BRANCA F. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. **Alternative Laboratory Animals**, v. 28, p.119-131, 2000.

BRASIL 2008. BRASIL (2006) Ministério da Saúde - Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf> Acesso em: 22 dez. 2014.

BRITO, P.; ELIAS, M.; SILVA-NETO, C.; SUJII, E.; SILVA, D.; GONÇALVES, B.; FRANCESCHINELLI, E. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental Science and Pollution Research** (in press). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>.

BURNETT-SEIDEL, C.; LIBER, K. Evaluation of sediment quality guidelines derived using the screening-level concentration approach for application at uranium operations in Saskatchewan, Canada. **Environmental Monitoring and Assessment**, p.184, 1593–1602, mar. 2012.

CAMPOS, T.F.C.; PETTA, R.A.; MALANCA, A.; PASTURA, V.F.S.; SICHEL, S.E.; MOTOKI, A. O gás radônio e a radiação natural em terrenos metagraníticos e pegmatíticos: o caso do município de Lages Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). **Revista de Geologia**, v.26, n.2, p.45–52, dez. 2013.

CARMONA, E.R.; ESCOBAR, B.; VALES, G.; MARCOS, R. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 15, n. 778, p.12-21, jan. 2015.

CARMONA, E.R.; GUECHEVA, T.N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Proposal of an *in vivo* Comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.52, n.2, p.165–169, mar. 2011.

CARMO-NETO, E.F. **Efeito genotóxico da contaminação de fontes hídricas por metais pesados e Radônio no semiárido potiguar**. Dissertação (Programa de Pós-

Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco. 2019.

CARVER, A.; GALLICCHIO, V.S. **Heavy metals and cancer**. In: cancer causing agents. Pub. INTECH, cap. 1, pp. 1-18, 2018.

CASTRO, I.F.A. **Avaliação do potencial tóxico-genético das águas superficiais dos rios Ipojuca e Poti, Nordeste do Brasil**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco. 2019.

CHAVES, L.C.C.; NAVONI, J.A.; FERREIRA, D.M.; MEDEIROS, S.B.; COSTA, T.F.; PETTA, R.A.; AMARAL, V.S. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science Pollution Research**, v. 23, p. 7572-7581, 2016.

CHIGOR, V.N.; UMOH, V.J.; OKUOFU, C.A.; AMEH, J.B.; IGBINOSA, E.O.; OKOH, A.I. Water quality assessment: surface water sources used for drinking and irrigation in Zaria, Nigeria are a public health hazard. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184. n.5. p.3389–400, mai. 2012.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, v.40, n.2, p.179–204, out. 2010.

COLLINS A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, jan-mar. 2013.

COLLINS, A.; VETTORAZZI, A.; AZQUETA, A. The role of the enzyme-modified comet assay in *in vivo* studies. **Toxicology Letters**, v. 327, p. 58-68, abr. 2020.

COLLINS, F.S.; GRAY, G.M.; BUCHER, J.R. Toxicology: Transforming environmental health protection. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 906-907, fev. 2008.

COSTA, C. News Brasil. **British Broadcasting Corporation (BBC)**, 2017. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-41369116>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais Serviço Geológico do Brasil (2013) Geobank.Gis. Mapa Geológico Do Estado do Rio Grande do Norte. Disponível em <<http://geobank.sa.cprm.gov.br/>> . Acesso em: abril 2020.

DANTAS R.C., NAVONI, J.A.; DE ALENCAR, F.L.S.; DA COSTA, X.L.A, DO AMARAL, V.S. Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, n.1, p.143-157, jan. 2020.

DATTA, S.; GHOSH, D.; SAHA, D.R.; BHATTACHARAYA, S.; MAZUMDER, S. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. **Aquatic Toxicology**, v.92, n.2, p.86–94, jan. 2009.

EAKIN, H.C.; LEMOS, M.C.; NELSON, D.R. Differentiating capacities as a means to sustainable climate change adaptation. **Global Environmental Change**, v.27, p.1–8, jul. 2014.

EGBINOLA, C.N.; AMANAMBU, A.C. Groundwater contamination in Ibadan, South-west Nigeria. **SpringerPlus**, n.3. ID 448, ago. 2014.

FESTING, M.F.; BAUMANS, V.; COMBES, R.D.; HALDER, M.; HENDRIKSEN, C.F.; Howard, B.R. et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. **Alternative Laboratory Animals**, v. 26, p. 283-301, mai-jun. 1998.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. 1949. Introdução ao estudo da *Drosophila*. **Cultus** v. 5, p. 1-70, 1949.

FRIEDBERG, E.C. et al. **DNA repair and mutagenesis**. 2nd. ed.: American Society for Microbiology, 2006. 1452 p.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 304, ago. 2014.

GARCIA, A.C.F.; MARCON, A.E.; FERREIRA, D.M.; SANTOS, E.A.B.; AMARAL, V.S.; MEDEIROS, S.R.B. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 3329-3335, 2011.

GILBERT, L.I. *Drosophila* is an inclusive model for human diseases, growth and development. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 293, n. 1-2, p. 25-31, out. 2008.

GLADSTONE, M.; SU, T.T. Chemical genetics and drug screening in *Drosophila* cancer models. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, p. 497-504, 2011.

GODSCHALK, R.W.; Ersson, C.; Riso, P.; Porrini, M.; Langie, S.A.S.; van Schooten, F-J. et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research**, v. 757, n.1, p. 60-67, out. 2013.

GOMES, A.; OSÓRIO, L. S. Utilização da coluna de winogradsky para a demonstração do efeito dos metais pesados na microbiota oxidante de enxofre em ambientes aquáticos: uma abordagem experimental. **Cadernos UniFOA**, v. 16, p. 21-28, 2011.

GOTTSCHALK, M.S.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. **Check List**, v.4, n.4, p. 485-518, nov. 2008.

GRIMALDI, D. A., 1990, A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n.197, p.1-139, out. 1990.

GUILHERME, L.R.G. et al.; Elementos-Traço em Solos e Sistemas Aquáticos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 345-390, 2005.

HARTMANN, A.; SCHUMACHER, M.; PLAPPERT-HELBERG, U.; LOWE, P.; SUTER, W.; MUELLER, L. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v. 19, n. 1, p. 51-59, jan. 2004.

IAEA - International Atomic Energy Agency. Protection of the public against exposure indoors due to radon and other natural sources of radiation. 2015. Disponível em: ><https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1651Web-62473672.pdf>>. Acesso em: out. 2018.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2010. Estados: População, Instituto Brasileiro de Geografia, Rio de Janeiro. <http://censo2010.ibge.gov.br/apps/atlas/> (access: 10 April 2020).

IPCC. **Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation. A special report of working groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** In: Field CB, Barros V, Stocker TF, Qin D, Dokken DJ, Ebi KL, Mastrandrea MD, Mach KJ, Plattner G-K, Allen SK, Tignor M, Midgley PM (eds) Cambridge University Press, Cambridge, pp 582, 2012.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 207–221, mai. 2008.

JIANG, J.J.; LEE, C.L.; FANG, M.D. Emerging organic contaminants in coastal waters: anthropogenic impact, environmental release and ecological risk. **Marine Pollution Bulletin**, v.85, n.2, p.391–399, ago. 2014.

KACSOH, B.Z.; SCHLENKE, T.A. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. **PLoS ONE**, v.7, n.4, e34721, abr. 2012.

KIM, J-H; HA, M. The disease burden of lung cancer attributable to residential radon exposure in Korean homes. **Journal of Korean Medical Science**, v.33, n.29, e223, jul. 2018.

KOGAN, F.; W. GUO. Strong 2015-2016 El Niño and Implication to Global Ecosystems from Space Data. **International Journal of Remote Sensing**, v.38, n.1, p.161–178, jan. 2017.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p.197-201, jan. 2005.

LENZ, S.; KARSTEN, P.; SCHULZ, J.B.; VOIGT, A. *Drosophila* as a screening tool to study human neuro degenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 453-460, 2013.

LEWIS, E.B. **Thomas H. Morgan – Facts.** NobelPrize.org. First published 20 April 1998. Nobel Media AB 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/morgan/article/> (Acesso: 06 Aug. 2020).

LUBIN, J.H.; BOICE Jr., J.D. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 1, p. 49-57, jan. 1997.

MANZANO, B.C.; ROBERTO, M.M.; HOSHINA, M.M.; MENEGÁRIO, A.A.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.2, p.1399–1407, jan. 2015.

MAO, D.Z.; CHERKAUER, A.K. Impacts of land-use change on hydrologic responses in the Great Lakes region. **Journal of Hydrology**, v.374, n.1, p.71–82, jul. 2009.

MARCON, A.E.; FERREIRA, D. M.; MOURA, M. F.; CAMPOS, T. F.; AMARAL, V. S.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, v. 81, p. 773-780, 2010.

MARCON, A.E.; NAVONI, J.A.; GALVÃO, M.F.O.; GARCIA, A.C.F.S. et al. Mutagenic

potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v.167, p.36–43, jan. 2017.

MARCOS, R.; CARMONA E.R. **The wing-spot and the comet tests as useful assays detecting genotoxicity in *Drosophila***. In: Dhawan A., Bajpayee M. (eds) *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1044. Humana Press, Totowa, NJ, 2019.

MARCUS, S.R.; FIUMERA, A.C. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v.91-92, p.18–25, ago-set. 2016.

MARENGO, J.A. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil. **Parcerias Estratégicas**, v.13, n.27, p.149–175, dez. 2008.

MARENGO; J.A.; TORRES, R.R.; ALVES, L.M. Drought in Northeast Brazil—past, present, and future. **Theoretical and Applied Climatology**, v.129, p.1189–1200, ago. 2017.

MARTINS, L.A.P.; BRITO, A.P.O.P.M. As concepções iniciais de Thomas Hunt Morgan acerca de evolução e hereditariedade. **Filosofia e História da Biologia**, v.1, p. 175-189, 2006.

MIKAYILOVA, A.C. Radioecological monitoring in the central zone of Azerbaijan. **Applied Science Reports**, v. 17, n. 3, p. 1-4, jun. 2018.

MIRZOYAN, Z.; SOLLAZZO, M.; ALLOCCA, M.; VALENZA, A.; GRIFONI, D.; BELLOSTA, P. *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. **Frontiers in Genetics**, v.10, n. 51, p. 1-16, mar. 2019.

MORGAN, T.H. What are “factors” in Mendelian explanations? **Journal of Heredity**, v. 5, n.1, p. 365-367, jan.1909.

MUHAMMAD, S.; SHAH, M.T.; KHAN S. Health risk assessment of heavy metals and their source apportionment in drinking water of Kohistan region, northern Pakistan. **Microchemical Journal**, v.98, p.334–343, jul. 2011.

MUHAMMAD, S.; ULLAH, R.; TURAB, S.A.; KHAN, M.Y.; KHATTAK, N.U.; KHAN, M.A. Radon concentration in drinking water and soil after the September 24, 2019, Mw 5.8 earthquake, Mirpur, Azad Jammu, and Kashmir: an evaluation for potential risk. **Environmental Science and Pollution Research (in press)** 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09589-0>

MÜLLER, H.J. Artificial transmutation of the gene. **Science**, v. 66, p. 84–87, jul. 1927.

MUSCATELLO, J.R.; LIBER, K. Accumulation and chronic toxicity of uranium over different life stages of the aquatic invertebrate *Chironomus tentans*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.57, n.3, p.531–539, out. 2009.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v.3, n.3, p. 1-8, out., 2015.

NRC - National Research Council. **Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment**, In: C.o.D. Toxicology (Ed.), National Academy Press, Washington, D.C. p. 327, 2000.

OLIVEIRA, R.M.P. Efeito genotóxico das águas superficiais do baixo curso da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe, Pernambuco-Brasil. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Governo do Brasil**, 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2011/07/oms-pelo-menos-2-milhoes-de-pessoas-morrem-por-ano-no-mundo-por-caoa-de-agua-contaminada>>. Acesso em: nov. 2018.

OSSANA, N.A.; SALIBIÁN, A. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v.8, n.1, p.67–74, 2013.

OSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 123, p. 291-298, 1984.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v.63, n.2, p.411-436, jun. 2011.

PATEL, V.; MUNOT, H.; SHOUCHE, Y.S.; MADAMWAR, D. Response to bacterial community structure and seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang-Sosiya ship breaking Yard, Bhavnagar, India. **Bioresource Technology**, v.161, p.362–370, jun. 2014

PERALTA-VIDEA, J.R.; LOPEZ, M.L.; NARAYAN, M.; SAUPE, G.; GARDEA-TORRESDEY, J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, n.8-9, p.1665–1677, ago-set. 2009.

PURE EARTH. The new top six toxic threats: a priority list for remediation, World's worst pollution problems report. 2015. Disponível em: http://www.worstpolluted.org/docs/WWPP_2015_Final.pdf. Acesso em: abril 2020

RAHMAN, Z.; SINGH, V.P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.191, n.7:419, jun. 2019.

RAND, M.D. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v.32, n.1, p.74–83, jan-fev. 2010.

RAND, M.D.; Montgomery, S.L.; Prince, L.; Vorojeikina, D. Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model. **Current Protocols in Toxicology**, v. 19, n. 59, p. 1.12.1-1-20.1, fev. 2014.

RATTNER, H. Environment, health and sustainable development. **Ciência & Saude Coletiva**, v. 14, n.6, p.1965–1971, dez. 2009

REHMAN, K.; FATIMA, F.; WAHEED, I.; AKASH, M.S.H. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.119, n.1, 157–184, jun. 2017.

ROHDE, C. Desenvolvimento dos Insetos: *Drosophila*. In: Sonia Maria Lauer de Garcia; Casimiro Garcia Fernandez. (Org.). Embriologia. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012, v. 1, p. 335-355.

SANTANA S.L.; VERÇOSA, C.J; CASTRO, I.F.A.; AMORIM, E.M.; SILVA, A.S.; BASTOS, T.M.R.R. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 32409-32417, set. 2018.

SHEEN, S.; LEE, K.S.; CHUNG, W.Y.; NAM, S.; KANG, D.R. An updated review of case control studies of lung cancer and indoor radon - Is indoor radon the risk factor for lung cancer? **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, v.28, 1:9, mar. 2016.

SIDDIQUE, H.R.; CHOWDHURI, D.K.; SAXENA, D.K.; et al. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 285–290, jul. 2015.

SILVA, S.M.P.; CRÓSTA, A.P.; FERREIRA, F.J.F.; BEURLIN, H.; SILVA, A.M.; SANTOS, L.F. Espectrometria de raios gama de granitos pegmatíticos da Província Pegmatítica da Borborema (PPB, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 28, n.4, 254–261, ago. 2010.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOWMITHRA, K.; SHETTY, N. J.; HARINI, B. P.; JHA, S. K.; CHAUBEY, R. C. Effects of acute gamma radiation on the reproductive ability of the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 140, p. 11-15, fev. 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p.275–286, fev. 2006.

SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; HOFFMAN, H. Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. **Mutation Research**, v. 626, p. 42–47, out 2007.

TAYLOR, S., McINTOSH, A., WLAKER, T. The collapse of “geologic Time”. **Creation**, v.23, n.4, p.30-34, set. 2001.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.-C., SASAKI, Y.F., KIRKLAND, D.J. Single-cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p. 206-221, jun.2000.

TING, D.S-K. WHO handbook on Indoor Radon: A Public Health Perspective. **International Journal of Environmental Studies**, v.67, n.1, p.100-102, fev.2010.

TIWARI, A.K., PRAGYA, P., RAVI RAM, K. CHOWDHURI, D.K. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. **Theriogenology**, v.76, n.2, p.197-216, jul. 2011.

UGUR, B., CHEN, K., BELLEN, H.J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v.9, n.3, p.235-244, mar.2016.

UNSCEAR - United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2017. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. <https://www.unscear.org/unscear/en/publications/2017.html>. Acesso em: jul 2020.

URIOL, E.; SIERRA, M.; COMENDADOR, M.A.; FRA, J.; MARTÍNEZ-CAMBLOR, P.; LACAVE, A.J.; SIERRA, L.M. Long-term biomonitoring of breast cancer patient under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. **Mutagenesis**, v. 28, n. 1, p. 39-48, jan. 2013.

VERÇOSA, C.J., MORAES FILHO, A.V., CASTRO, I.F.A., et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.141, p.148-153, jul. 2017.

VERMA, R., DWIVEDI, P. Heavy metal water pollution-a case study. **Recent Research in Science and Technology**, v.5, n.5, p.98-99, jul.2013.

VILLEGAS, S.N. One hundred years of *Drosophila* cancer research: no longer in solitude. **Disease Models & Mechanisms**, v. 12, n. 4, 12, dmm039032. 2019. doi:10.1242/dmm.039032

WILSON, J., YOUNG, A., CIVITELLO, E.R., STEARNS, D.M. 2014. Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.19, n.1, p.45-57, jan.2014.

WU, G., KANG, H., ZHANG, X., SHAO, H., CHU, L., RUAN, C. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, ecoenvironmental concerns and opportunities. **Journal of Hazardous Materials**, v.174, n.1, p.1-8, fev. 2010.

ZHOU, S., LUOMA, S.E., ST. ARMOUR, G.E., THAKKAR, E., MACKAY, T.F.C., ANHOLT, R.R.H. A *Drosophila* model for toxicogenomics: Genetic variation in susceptibility to heavy metal exposure. **PLoS Genetics**, v.13, n.7, p.e1006907, jul. 2017.