

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

**EFEITOS DO ARSENIATO DE SÓDIO (Na_2HAsO_4) SOBRE UMA LINHAGEM DE
Drosophila mercatorum (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)**

WILLIAN SCHON LOPES

Guarapuava - PR

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO a UEPG)

**EFEITOS DO ARSENIATO DE SÓDIO (Na_2HAsO_4) SOBRE UMA LINHAGEM DE
Drosophila mercatorum (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Guarapuava - PR
2013

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

L864e Lopes, Willian Schon
Efeitos do arseniato de sódio (Na_2HAsO_4) sobre uma linhagem de *Drosophila mercatorum* (Diptera; Drosophilidae) / Willian Schon Lopes. -- Guarapuava, 2013
xi, 47 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

Orientadora: Patricia Carla Giloni de Lima
Co-orientadores: Vanderlei Aparecido de Lima, Luciana Paes de Barros Machado, Rogério Pincela Mateus
Banca examinadora: Carlos Eduardo da Rosa, Lilian Madi Ravazzi

Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. *Drosophila mercatorum*. 3. Arseniato. 4. Fosfato. 5. Similaridade química. 6. Toxicidade. 7. Esterases. 8. Taxa de sobrevivência. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 595.77

Orientadora

Profa. Dra. PATRICIA CARLA GILONI DE LIMA

Co-orientadores

Prof. Dr. VANDERLEI APARECIDO DE LIMA

Profa. Dra. LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO

Prof. Dr. ROGÉRIO PINCELA MATEUS

À minha mãe, principal incentivadora e apoiadora dos meus sonhos.
Não tenho muito a oferecer, nem posso recompensá-la pelo bem que me faz.
Dedico-lhe aqui o melhor que tenho.

Disparo contra o sol
Sou forte, sou por acaso,
Minha metralhadora cheia de mágoas
Eu sou um cara.

Cansado de correr
Na direção contrária
Sem pódio de chegada ou beijo de namorada
Eu sou mais um cara.

Mas se você achar
Que eu tô derrotado
Saiba que ainda estão rolando os dados
Porque o tempo, o tempo não para.

(O Tempo Não Para – Cazuza)

Agradecimentos

A Deus por abençoar a minha vida, mostrando e percorrendo comigo os caminhos para que eu chegasse até aqui;

Aos meus pais Wilson e Luci e a minha irmã Diana pelo carinho e compreensão, por ouvirem meus desabafos, por me ajudarem a suportar e a superar todas as dificuldades que encontrei;

Aos meus avós Ary e Terezinha pela graça de tê-los presentes em minha vida;

Aos professores Patrícia Carla Giloni de Lima, Vanderlei Aparecido de Lima, Luciana Paes de Barros Machado e Rogério Pincela Mateus pela orientação, suporte e atenção a mim dispensados;

Aos colegas de laboratório Manu, Norbert, Katy, Gabi, Bruna, Vanessa, Carine, Samara, Larissa, Gilberto, Ynaê e Jaqueline pela amizade e companheirismo, por tornarem meus dias no laboratório mais felizes;

Ao grande amigo e companheiro de trabalho Norbert Heinz, por colocar a mão na massa junto comigo e possibilitar a conclusão desse estudo;

Aos colegas do mestrado com os quais compartilhei alegrias e frustrações ao longo de todo esse processo e que melhor do que ninguém, são capazes de compreender como me sinto;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva;

A todos que por sincronicidade cruzaram o meu caminho tornando este sonho possível.

Obrigado!

Lista de Figuras

- FIGURA 01:** Médias de sobrevivência de indivíduos da espécie *Drosophila mercatorum* quando submetidos a estresse por arseniato de sódio. 25
- FIGURA 02:** Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr1. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 27
- FIGURA 03:** Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr2. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 27
- FIGURA 04:** Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr3. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 28
- FIGURA 05:** Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr1. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 28
- FIGURA 06:** Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr2. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 29
- FIGURA 07:** Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr3. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração. 29
- FIGURA 08** – Densidade relativa de EST-7B em machos de *D. mercatorum* submetidos a estresse por diferentes concentrações de arsênio 31
- FIGURA 09** – Densidade relativa de EST-7B em fêmeas de *D. mercatorum* submetidas a estresse por diferentes concentrações de arsênio 32

Lista de Tabelas

TABELA 01: Total de machos e fêmeas e total geral e percentual de indivíduos de <i>D. mercatorum</i> que chegaram à fase adulta em cada garrafa nas trélicas.	23
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	01
<i>Abstract</i>	02
1. INTRODUÇÃO GERAL	03
1.1 Ecotoxicologia	03
1.2 Arsênio	04
1.3 <i>Drosophila</i>	08
1.4 Isoenzimas – esterases	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Resumo	15
4.2 <i>Abstract</i>	16
4.3 Introdução	17
4.4 Material e Métodos	20
4.5 Resultados e Discussão	23
4.6 Conclusão	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

A espécie *D. mercatorum* é indicada para testes com contaminantes ambientais que podem alterar a especificidade de enzimas. As formas inorgânicas do arsênio, arseniato e arsenito, são reconhecidas pelo seu efeito tóxico. O objetivo do presente estudo é determinar os efeitos tóxicos do arsênio sobre uma linhagem de *D. mercatorum*. Foram realizadas, análises eletroforéticas das esterases e, das taxas de sobrevivência desses indivíduos quando expostos a diferentes concentrações de arseniato de sódio (Na_2HAsO_4). Estimou-se que $\text{CL}_{50} = 20,997 \text{ mg L}^{-1}$ de arsênio. Foram observados 8 *loci* com atividade esterásica, sendo 6 deles preferencialmente α -esterases, 1 preferencialmente β -esterase e 1 α - β -esterase, tanto para machos quanto para fêmeas.

Palavras-chave: *Drosophila mercatorum*; Arseniato; Fosfato; Similaridade Química; Toxicidade; Esterases; Taxa de Sobrevivência.

Abstract

The species *D. mercatorum* is indicated for testing environmental contaminants that can alter the specificity of enzymes. The inorganic forms of arsenic, arsenate and arsenite, are recognized by your toxic effects. The aim of this study is to determine the toxic effects of arsenic on a strain of *D. mercatorum*. Electrophoretic analysis of esterases and survival rates of these individuals when exposed to different concentrations of sodium arsenate (Na_2HAsO_4) were performed. It was estimated that $\text{LC}_{50} = 20.997 \text{ mg L}^{-1}$ of arsenic, which demonstrating the species sensitivity to the toxicant. Were observed 8 *loci* with esterase activity, 6 of them are preferably α -esterases, 1 preferably β -esterase and 1 α - β -esterase, for both males and for females.

Keywords: *Drosophila mercatorum*; Arsenate; Phosphate; Chemistry Similarity; Toxicity; Esterases; Survival Rate .

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ecotoxicologia

O homem ao longo da história sempre foi um modificador do meio em que vive, criando e inserindo novos artefatos. Considerando-se a evolução social e tecnológica, sobretudo após a revolução industrial sabe-se que uma imensa gama de substâncias químicas foram e ainda são produzidas, de forma intencional ou como sub-produto de atividades produtivas. Muitas dessas substâncias são essencialmente sintéticas e artificiais, outras, apesar de terem ocorrência natural, tiveram sua concentração aumentada no meio ambiente. De acordo com Melancon (2003) a interação dessas novas substâncias com o meio, bem como o aumento em concentração daquelas que são naturais tem se tornado motivo de preocupação, devido aos efeitos nocivos que podem causar sobre a flora, a fauna e os recursos naturais, considerando-se os reflexos dessas interações sobre o homem e a sociedade.

Dentre estas estão, derivados do petróleo, dioxinas, furanos, hormônios, metais, além de uma série de outros resíduos urbanos e industriais, que podem conter elementos classificados como tóxicos aos sistemas biológicos, causando danos aos mesmos, tais como mutagênese, carcinogênese e teratogênese (LAM *et al.*, 1999). Esses efeitos podem ser visíveis logo após o contato ou tardiamente, de forma cumulativa, após várias gerações, estando tudo isso relacionado ao tipo de resíduo, a via de exposição, o tempo de exposição, a predisposição genética de cada indivíduo, a idade e as concentrações as quais venha a ser exposto (BOYD, 2007).

De acordo com Cairns e Niederlehner (1995) a toxicologia oriunda do contexto farmacológico, é uma ciência que busca compreender os efeitos causados por substâncias químicas e os processos bioquímicos e fisiológicos responsáveis por eles, considerando-se a sensibilidade à exposição em diferentes tipos de organismos e a toxicidade relativa de diferentes substâncias e compostos químicos. A amplitude de abrangência caracteriza a toxicologia como multidisciplinar podendo ser estudada sob aspectos distintos.

Uma das linhas dentro da toxicologia é a ecotoxicologia que pode ser entendida como uma junção entre ecologia e toxicologia. Tratando-se a ecologia do estudo das interações dos seres vivos entre si e com o meio em que vivem, o objetivo da ecotoxicologia seria então entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (CHAPMAN, 2002), por meio da análise de seus processos de transferência e da compreensão de suas ações nos ecossistemas.

Associada a questões envolvendo progresso, desenvolvimento sustentável e até mesmo o bem estar dos seres vivos, a ecotoxicologia vem ganhando evidência atualmente devido à necessidade de se conhecer os efeitos que elementos e compostos químicos lançados no meio ambiente podem ter sobre indivíduos, populações e comunidades de organismos (ADAMS e ROWLAND, 2003; RONCO *et al.*, 2004), além de se conhecer como o próprio homem pode ser afetado.

Há de se considerar dentre esses agentes tóxicos, estudos envolvendo metais e semimetais. Atividades antrópicas, tais como mineração, fundição, produção de fertilizantes, herbicidas e inseticidas tem se apresentado como fontes da liberação de metais (ALTENBURGER, 2011) e semimetais no meio ambiente. Embora alguns desses elementos sejam necessários a funções biológicas essenciais, como a estabilização das estruturas macromoleculares ou a participação em processos enzimáticos, à exposição excessiva e/ou a concentrações elevadas podem provocar uma série de efeitos danosos aos organismos vivos.

1.2 Arsênio

Considerando-se o que a ciência conhece, em termos de organismos vivos, pode-se afirmar que a vida é composta em sua maior parte pelos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. A dependência biológica dos seis elementos principais é complementada por uma disposição selecionada de outros elementos, geralmente metais (metaloides), nas quantidades traço que são críticas para as funções celulares, tais como co-fatores de enzimas (BERG *et al.*, 2007).

Há muitos casos nos quais estes elementos traço podem ser substituídos por outros. Alguns exemplos incluem a substituição do molibdênio pelo tungstênio e do zinco pelo cádmio em algumas famílias de enzimas (HILLE, 2002) e do ferro pelo

cobre como um oxigênio-carreador em alguns artrópodes e moluscos (JAMESON *et al.*, 2007). Nestes exemplos e em outros, os elementos traço que intercambiam outros elementos químicos apresentam similaridades que facilitam a troca.

O arsênio (As) é um análogo do elemento químico fósforo (P), que se encontra diretamente abaixo do P na tabela periódica. O arsênio possui um raio atômico similar, assim como eletronegatividade aproximadamente idêntica ao P (LIDE, 2010). A forma mais comum do P nos organismos é o fosfato (PO_4^{3-}), que se comporta similarmente ao arseniato (AsO_4^{3-}) na escala de pH biológico relevante e gradientes redox (WOLFE-SIMON *et al.*, 2009). A similaridade físico-química entre AsO_4^{3-} e PO_4^{3-} contribui para a toxicidade biológica do AsO_4^{3-} porque as rotas metabólicas que PO_4^{3-} utiliza não podem distinguir entre as duas moléculas (ROSEN, 2002) e o arseniato pode ser incorporado nas etapas iniciais dessas rotas (WOLFE-SIMON *et al.*, 2009; BRAUNSTEIN, 1931).

Pode-se perceber as formas, ações e possíveis efeitos tóxicos do As sobre o metabolismo quando consideramos os papéis que o P desempenha, atuando como co-fator de múltiplos sistemas enzimáticos no metabolismo de gorduras, carboidratos, lipídios e proteínas. Regulando o equilíbrio ácido-básico do plasma, mantendo a integridade do sistema nervoso central e dos rins. Contribuindo para a mineralização da estrutura óssea, síntese de colágeno e homeostase do cálcio, sendo regulador da excreção renal e auxiliando o corpo na utilização de vitaminas (BORGES *et al.*, 2004). Fazendo parte da composição do ATP (adenosina trifosfato) participando dos processos de absorção e liberação energéticas (MCDOWELL, 1992). Servindo como espinha dorsal dos ácidos nucleicos que constituem o material genético, sendo um fator chave quanto a propiciar sua estabilidade física (BENNER e HUTTER, 2002). Participando da estrutura da bicamada lipídica das membranas celulares constituindo os fosfolipídios.

Entretanto, apesar dessa incapacidade de diferenciação que ocasiona a incorporação do arsênio, pensa-se que os processos metabólicos a jusante não são geralmente compatíveis com isso, devido às diferenças nas reatividades entre compostos de P e As (BAER *et al.*, 1981). O arseniato é capaz de formar ésteres que são semelhantes aos ésteres de fosfato. No entanto, estes compostos são menos estáveis do que seus correspondentes. De acordo com Rosen *et al.* (2011) esse fato se deve ao maior comprimento e ao ângulo mais obtuso presente nas

ligações com arsênio, o que é ocasionado pela sua constituição atômica, facilitando dessa forma a hidrólise, sendo isso crítico em escala biológica.

Alternativamente, o arseniato também pode ser reduzido a arsenito que é sua forma trivalente e mais tóxica (THOMAS *et al.*, 2001), embora os mecanismos pelos quais essa redução ocorre não estejam ainda completamente esclarecidos (NÉMETI e GREGUS, 2005). O arsenito pode ligar-se ao grupamento sulfidríla de enzimas, cofatores e demais proteínas interferindo no metabolismo celular (CULLEN *et al.*, 1984).

O arsênio é um elemento metaloide de ocorrência natural, sendo encontrado no solo, no ar e na água (HUANG *et al.*, 2004; DUKER *et al.*, 2005). Existe no ambiente nas formas orgânica e inorgânica, sendo que a forma orgânica é geralmente considerada não tóxica (GOCHFELD, 1995), enquanto as inorgânicas são tóxicas. De acordo com a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América (NAS) (1977) o arsênio é o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre e são encontradas altas concentrações dele associadas ao granito e muitos minerais, incluindo cobre, chumbo, zinco, prata e ouro.

As atividades humanas intensificaram a acumulação de arsênio no ambiente (BELL, 1998), como produto da queima de combustíveis fósseis, na fundição de metais bem como na indústria de semicondutores e de vidros. O arsênio também é um ingrediente comumente utilizado em conservantes de madeira, pigmentos, inseticidas, herbicidas, rodenticidas e fungicidas (HATHAWAY *et al.*, 1991).

De acordo com Lage *et al* (2006) embora muito do arsênio presente no solo seja natural, derivado das rochas, a aplicação de compostos de arsênio na agricultura e silvicultura pode levar a extrema contaminação do solo e dos lençóis freáticos, enquanto a queima de carvão e a fundição de metais pode ser a maior fonte do arsênio distribuído pelo ar. Atividades de mineração podem resultar em altos níveis de contaminação por arsênio no solo, águas superficiais e subterrâneas e vegetação (AMASA, 1975; SMEDLEY *et al.*, 1996).

Wolfe Simon *et al* (2010) encontraram uma espécie de bactéria do gênero *Halomonas*, GFAJ-1, que é capaz de proliferar em um ambiente saturado de arsênio. Reaves *et al* (2012) demonstraram que a ocorrência da incorporação do arsênio no DNA dessa linhagem é ocasionada devido a semelhança química entre o arseniato e o fosfato, sendo provável que GFAJ -1, por vezes, assimile algumas moléculas de arseniato em vez das de fosfato, e que embora a capacidade de

tolerar ou corrigir um baixo nível de incorporação de arsênio ao DNA poderiam contribuir para a resistência ao arseniato, esse baixo nível de incorporação não seria biologicamente funcional para substituir o fosfato, e portanto, não têm efeito significativo sobre os requisitos do organismo para o fosfato. Segundo Erb *et al* (2012) GFAJ-1 é capaz de crescer em concentrações baixas de fosfato (1,7 μM), mesmo na presença de altas concentrações de arseniato (40 mM), mas não tem a capacidade de crescer em meios de cultura pobres em fósforo (< 0,3 μM), contendo ou não arseniato. Diante disso, conclui-se que essa linhagem de bactérias é resistente ao arseniato, mas ainda dependente do fosfato. Nesse sentido, Erb *et al* (2012) salientam que a base molecular da resistência de GFAJ-1 ao arseniato pode ser objeto de investigações adicionais.

Em suma, apesar de ainda não ter sido encontrada nenhuma forma de vida destoante aos padrões de composição química reconhecidos pela ciência, há evidências que sugerem a plausibilidade dessa colocação. Nos últimos anos, astrobiólogos têm dedicado considerável atenção a explorar a possibilidade de formas alternativas de vida extraterrestre (apeladas de "vida estranha") (BAROSS, 2007). No entanto, diante dessas colocações, nos surgem ainda outros questionamentos, como por exemplo, ao pensarmos nesse sentido considerando a própria Terra, faz-se desafiadora a reflexão acerca dos motivos pelos quais a natureza escolheu certos elementos a despeito de outros para a composição dos seres vivos ao longo do processo evolutivo. Poderíamos de fato possuir ancestrais que se utilizavam do arsênio ao invés do fosfato, ou com qualquer outro tipo de substituição, mediante a similaridade química existente entre alguns elementos. Segundo DAVIES *et al* (2009) é tentador imaginar que uma forma ancestral, alternativa da vida possa continuar a espreitar, escondida entre os modernos e ricos habitats da terra como um sobrevivente do passado, vivendo naquilo que poderíamos nominar como uma "biosfera sombra".

Tais considerações sugerem a necessidade de análises mais apuradas, de caráter ecotoxicológico acerca dos efeitos do arsênio sobre os organismos vivos, englobando capacidades de tolerância, resistência e possíveis interações biológicas, na busca de possíveis respostas que podem auxiliar na compreensão do processo evolutivo.

Nesse sentido, diante dos níveis de abrangência desse tipo de estudo e, valorizando a importância da resposta dos organismos vivos a agentes tóxicos, a utilização de sistemas modelo é muito valiosa. Do ponto de vista experimental, *Drosophila* trata-se de um eucarioto que se tornou extremamente útil, sendo uma alternativa viável para o presente estudo.

1.3 *Drosophila*

De acordo com Peck *et al* (1998) os insetos são bons indicadores, pois respondem rapidamente ao estresse ambiental, têm tempos de geração curtos e em geral podem ser facilmente amostrados e identificados. Além disso, atendem as premissas de Noss (1990) para que um organismo seja considerado um bom indicador biológico: são suficientemente sensíveis para fornecer sinais de mudanças, apresentam ampla distribuição geográfica e são capazes de proporcionar uma contínua avaliação a uma vasta gama de tensões. A fácil captura e o baixo custo para manutenção em laboratório também colaboram para a seleção destes organismos como modelos para estudo experimentais.

Lawton (2001) aponta a entomologia ecológica como uma forma de prever e compreender as mudanças ambientais globais à medida que lutamos para entregar um futuro sustentável para o nosso planeta, tornando-se os insetos maravilhosos organismos modelo para isso.

Dentre os insetos, o gênero *Drosophila* representa um sistema modelo sem precedentes não somente para a compreensão da evolução do genoma, mas igualmente para a pesquisa experimental comparativa. Nenhum outro grupo possui uma literatura extensiva para a genética, o desenvolvimento, a neurobiologia, o comportamento, a fisiologia e a ecologia (MARKOW e O'GRADY, 2006). Isso possibilita a sua utilização, no campo da ecotoxicologia com o intuito de se detectar a sensibilidade a produtos químicos e para o biomonitoramento de resíduos (ALMEIDA *et al.*, 2001; IKEDA *et al.*, 2011).

O gênero *Drosophila* é composto por 8 subgêneros, sendo o subgênero *Drosophila* o maior deles (BÄCHLI, 2013), contando com mais de 730 espécies descritas, o que representa mais do que a metade das espécies de *Drosophila* conhecidas atualmente (ROBE *et al.*, 2010). A espécie utilizada neste trabalho pertence ao subgênero *Drosophila*, grupo repleta, subgrupo *mercatorum* (VILELA,

1983). O grupo de espécies *Drosophila repleta* está entre os maiores de todos os grupos de espécies no gênero *Drosophila*. Parte da radiação *virilis - repleta* (THROCKMORTON, 1982), é considerada uma das mais importantes e bem sucedidas radiações no gênero *Drosophila* (DURANDO *et al.*, 2000).

O que se conhece atualmente acerca da filogenia deste grupo de espécies é baseado no trabalho morfológico de Throckmorton (1982) e Vilela *et al* (1983) e no trabalho citológico de Wasserman (1982, 1992). Além disso, vários estudos enzimáticos (ZOUROS, 1973; RICHARDSON *et al.*, 1975; RICHARDSON e SMOUSE, 1976; RICHARDSON *et al.*, 1977; HEED *et al.*, 1990) e moleculares (SULLIVAN *et al.*, 1990; RUSSO *et al.*, 1995; SPICER, 1995; SPICER e PITNICK, 1996; DURANDO *et al.*, 2000; ROBE *et al.*, 2010) contribuíram para o conhecimento das relações entre os membros pertencentes aos subconjuntos do grupo *repleta*. Markow e O'Grady (2006) ao atualizarem a revisão de Throckmorton (1975) fazem referência a forma com que esse grupo de organismos tem se tornado um modelo para estudos ecológicos e evolutivos.

Drosophila mercatorum (PATTERSON e WHEELER, 1942) é encontrada em ambientes naturais de vegetação aberta, localizando-se no leste da Cordilheira dos Andes, em áreas como chaco, pantanal, cerrado, ainda em vegetação fechada e, geralmente não associada com o homem (SENE *et al.*, 1981; VILELA, 1983). Sendo uma espécie generalista e altamente competitiva para os seus recursos alimentares (PEREIRA *et al.*, 1983), é uma das mais abundantes espécies de drosofilídeos neotropicais em áreas de vegetação aberta na América do Sul (VILELA *et al.*, 1983; TIDON, 2006). É também a única espécie neotropical que alcançou o *status* de sub cosmopolita de distribuição, desde a sua colonização do hemisfério norte, regiões Neártica e Paleártica, África, Índia e Havaí (POLEJACK e TIDON, 2007).

Dessa forma, a sua presença e representatividade, além do atendimento das premissas necessárias, tornam essa espécie um excelente organismo modelo para estudos no campo da ecotoxicologia. Podemos constatar isso observando os trabalhos existentes com o gênero *Drosophila* tratando acerca do efeito de metais (MARONI *et al.*, 1986; AL-MOMANI e MASSADEH, 2005; IKEDA *et al.*, 2011; HAQ *et al.*, 2012), inseticidas (PUGA e RUBANO, 1987; ALMEIDA *et al.*, 2001), agrotóxicos (RODRIGUES, 2006), entre outros compostos tóxicos sobre os organismos vivos.

Além disso, os drosofilídeos possuem uma complexidade biológica comparável a dos mamíferos, bem como algumas similaridades profundas para certos mecanismos biológicos (MARÍN *et al.*, 2000), proteoma e para a constituição e funcionamento de certos órgãos e sistemas. Assim as pesquisas com estes insetos podem fornecer estimativas até mesmo sobre os efeitos de determinadas substâncias tóxicas em humanos. Considerando todas essas afirmações, no âmbito de uma análise ecotoxicológica é que *D. mercatorum* foi escolhida como organismo modelo para esse estudo.

Uma série de processos relacionados às interações do elemento arsênio em quaisquer das suas formas moleculares, com os sistemas vivos, ainda não foram completamente elucidados. É sabido que as isoenzimas - esterases estão de certa forma, relacionadas a processos de tolerância, resistência e detoxificação, portanto, compreender o efeito do arsênio sobre elas é um possível passo no caminho para o entendimento de tais questões.

1.4 Isoenzimas – esterases

A síntese de proteínas é controlada geneticamente e alguns mecanismos tornam possível a existência de diferenças estruturais entre enzimas ou proteínas homólogas sintetizadas por espécies distintas, ou por genótipos diferentes dentro de uma mesma espécie. A origem dessas formas moleculares múltiplas pode ser atribuída, à presença de mais de um *locus* gênico, a ocorrência de mais de um alelo em um mesmo *locus* ou por meio do splicing alternativo. Assim, diversas enzimas não só podem existir em múltiplas formas dentro de um único organismo, como dentro de um único tecido (WEEDEN e WENDEL, 1990). Markert e Moller (1959) propuseram o termo isoenzimas para descrever as diferentes formas moleculares, nas quais estas proteínas podem existir com a mesma especificidade enzimática.

As esterases são isoenzimas amplamente distribuídas entre os seres vivos, que catalisam a hidrólise dos ésteres, além de peptídeos, amidas e haletos (WALKER e MACKNESS, 1983), dessa forma tornando-se bioquimicamente importantes. Embora seu papel em grande parte ainda não esteja suficientemente claro, em insetos há evidências de que elas participem de diversos processos fisiológicos (ZHANG *et al.*, 2010), dentre os quais a desintoxicação de xenobióticos (OAKESHOTT *et al.*, 1993; RUSSELL *et al.*, 1996) e a resistência a inseticidas

(RAYMOND *et al.*, 1993; MUTERO *et al.*, 1994; SPACKMAN *et al.*, 1994; RAUSCHENBACH *et al.*, 1994; WHYARD *et al.*, 1994; FEYEREISEN, 1995).

As esterases têm sido amplamente utilizadas para estudos bioquímicos, taxonômicos e evolutivos devido à importância das variações genéticas existentes em populações de organismos bem como sua significância adaptativa, no intuito de elucidar uma série de processos. Em suma, a variação específica em número, composição e atividade das esterases em cada sistema enzimático, permite a diferenciação entre populações (LARSEN, 1969) e até mesmo entre indivíduos pertencentes a uma mesma população.

Sua atividade pode ser verificada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida, através da qual é possível traçar um perfil das amostras de acordo com a análise da posição das bandas na sequência em que migram. Ainda, com base na sensibilidade aos substratos sintéticos que as esterases hidrolisam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos, as α -esterases que hidrolisam preferencialmente o α -naftil-acetato e as β -esterases que hidrolisam preferencialmente o β -naftil-acetato (MYERS *et al.*, 1988).

A aplicação de técnicas de eletroforese tem revelado a existência de variações em populações naturais, na maioria dos organismos. Albuquerque e Napp (1981) salientam a presença de associações significativas entre as frequências alélicas em *loci* de esterases e fatores ambientais em alguns insetos, tais como os drosofilídeos, sendo que a maioria desses polimorfismos parece estar associada à heterogeneidade ambiental.

A expressão diferencial das esterases durante o ciclo de vida dos insetos é provavelmente uma resposta proveniente de mecanismos regulatórios, que devem atuar na expressão gênica e em seus produtos finais, assim essas enzimas são sintetizadas à medida que são necessárias as funções metabólicas que exercem no organismo (CATELANI *et al.*, 2004).

Diante disso, ao considerarmos as funções de desintoxicação xenobiótica e de resistências a inseticidas associadas a essas enzimas em insetos e, particularmente no gênero *Drosophila*, esperam-se respostas diferenciais mediante a exposição da espécie *D. mercatorum* a estresse ocasionado pela saturação do metalóide arsênio em seu ambiente de desenvolvimento, com relação àquelas que se desenvolvem em ambientes descontaminados. Ao analisarmos e compararmos os perfis esterásicos oriundos do referido organismo em uma análise *in vitro*, é

possível avaliar as potenciais respostas de populações em ambientes naturais a presença do arsênio. Além disso, geram-se informações que podem de alguma forma auxiliar no processo da compreensão de relações evolutivas, tais como a aquisição de resistência e tolerância, fazendo-se possível ainda, o reconhecimento das vias metabólicas pelas quais estas ocorrem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as taxas sobrevivência e os padrões de esterase em uma linhagem de *Drosophila mercatorum* exposta a estresse por arseniato de sódio (Na_2HAsO_4) em diferentes concentrações.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar as taxas de sobrevivência totais e por sexo em diferentes concentrações de arseniato de sódio (Na_2HAsO_4);
- Determinar o valor de CL_{50} para a linhagem;
- Avaliar os padrões esterásicos produzidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material e as metodologias utilizadas para a realização do presente estudo são apresentados na seção resultados onde é reportado o trabalho completo, seguindo-se os moldes de um artigo científico.

4. RESULTADOS

EFEITOS DO ARSENIATO DE SÓDIO (Na_2HAsO_4) SOBRE AS TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA E O PERFIL ESTERÁSICO DE UMA LINHAGEM DE *Drosophila mercatorum* (DIPTERA; DROSOPHILIDADE)

Artigo a ser submetido para publicação na revista Chemosphere (Qualis A1).

4.1 RESUMO

O gênero *Drosophila* apresenta significativa importância como organismo modelo para vários estudos. As taxas de sobrevivência e o perfil esterásico de uma linhagem de *Drosophila mercatorum* foram testadas sob o efeito de diferentes concentrações do semimetal arsênio na forma de arseniato de sódio (Na_2HAsO_4). Larvas de primeiro estadió foram submetidas à contaminação e acompanhadas até que atingissem a fase adulta. Os indivíduos adultos que emergiram foram contabilizados e utilizados nas análises. Não foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência de machos e fêmeas em nenhuma das concentrações testadas ($\alpha=0,05$). Diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência totais dos indivíduos foram detectadas ao compararmos o controle com a concentração teste de 25 mg L^{-1} de arsênio ($\alpha=0,05$). A $CL_{50} = 20,997$ ($15,93 \leq CL_{50} \leq 27,63$) mg L^{-1} de arsênio ($\alpha=0,05$) foi estimada. Observaram-se 8 *loci* com atividade esterásica, sendo 6 deles preferencialmente α -esterases, 1 preferencialmente β -esterase e 1 α - β -esterase, tanto para machos quanto para fêmeas. EST-4 parece ser ativada como resposta ao estresse por arsênio estando ausente nos indivíduos controle. EST-7B tem sua atividade relativa aumentada à medida que aumenta a concentração de arsênio testada. A distribuição e as diferentes intensidades com que apareceram as bandas de EST-1, EST-2A, EST-2B e EST-3, levam a interpretação de que estas enzimas também estejam ligadas a processos de detoxificação e resistência ao estresse causado pelo arsênio, evidenciando a diversidade genética da espécie e as conseqüentes possíveis diversidades relacionadas a esses processos.

4.2 Abstract

The genus *Drosophila* has significant importance as a model organism for various studies. The survival rates and esterase profiles of a strain of *Drosophila mercatorum* were used in order to test the effects of different concentrations of the arsenic semimetal in form of sodium arsenate (Na_2HAsO_4). First-stage larvae were subjected to contamination and monitored until they reached adulthood. The adults that emerged were accounted and used in analyzes. There were no significant differences between the survival rates of males and females in any of the concentrations tested ($\alpha= 0,05$). Significant differences between the totals survival rates of individuals were found when comparing the control with the test concentration of 25 mg L^{-1} of arsenic ($\alpha= 0,05$). The $\text{LC}_{50}= 20.997 \text{ mg L}^{-1}$ ($15,93 \leq \text{CL}_{50} \geq 27,63$) of arsenic ($\alpha= 0,05$) was estimated. There were 8 *loci* with esterase activity, with 6 of them preferably α -esterases, 1 preferably β -esterase and 1 α - β -esterase, for both males and for females. EST-4 appears to be activated in response to stress by arsenic, being absent in control subjects. EST-7B has its relative activity increased as the increasing concentration of arsenic tested. The distribution and the different intensities with the bands EST-1, EST-2A, EST-2B and EST-3 appeared, lead to the interpretation that these enzymes are also linked to processes of detoxification and stress resistance caused by arsenic, showing the genetic diversity of the specie and the consequent possible differences related to these processes.

4.3 INTRODUÇÃO

Compostos de arsênio são relatados como tóxicos e causadores de danos ambientais, afetando a flora, a fauna e oferecendo uma série de riscos a saúde humana. O arsênio é um elemento metaloide de ocorrência natural, sendo encontrado no solo, no ar e na água (HUANG *et al.*, 2004; DUKER *et al.*, 2005). Existe no ambiente nas formas orgânica e inorgânica, sendo que as formas orgânicas são consideradas menos tóxicas (GOCHFELD, 1995). O arsênio inorgânico ocorre predominantemente nas formas trivalente (As^{3+}) e pentavalente (As^{5+}) (CERVANTES *et al.*, 1994).

As atividades humanas intensificaram a acumulação de arsênio no ambiente (BELL, 1998), como produto da queima de combustíveis fósseis, na fundição de metais bem como na indústria de semicondutores e de vidros. O arsênio também é um ingrediente comumente utilizado em conservantes de madeira, pigmentos, inseticidas, herbicidas, rodenticidas e fungicidas (HATHAWAY *et al.*, 1991).

De acordo Duker *et al* (2005), sob condições aeróbias, a forma pentavalente do arsênio (arseniato) predomina, devido a sua maior estabilidade química. A base para a toxicidade do arseniato em organismos vivos reside na incapacidade de diferenciação ente ele e o fosfato nas etapas iniciais de vários processos que ocorrem nos sistemas biológicos, ocasionando a incorporação do arsênio, contudo, os processos metabólicos a jusante não são geralmente compatíveis, devido às diferenças nas reatividades entre compostos de P e As (BAER *et al.*, 1981). Exemplos disso, são a substituição do fosfato pelo arseniato durante a fosforilação oxidativa, ocasionando a formação de ésteres de arsênio não estáveis, o que reduz os níveis celulares de ATP e pode ocasionar a morte da célula (NABI *et al.*, 2005), a substituição do fosfato pelo arseniato nos ossos (ELLENHORN e BARCELOUX, 1988) e no arcabouço do DNA (ERB *et al.*, 2012; REAVES *et al.*, 2012).

O arseniato também pode ser reduzido a arsenito que é sua forma trivalente e mais tóxica (THOMAS *et al.*, 2001), embora os mecanismos pelos quais essa redução ocorre não estejam ainda completamente esclarecidos (NÉMETI e GREGUS, 2005). O Arsenito pode ligar-se ao grupamento sulfidríla de enzimas, cofatores de enzimas e demais proteínas interferindo no metabolismo celular (CULLEN *et al.*, 1984).

Rizki *et al* (2006) demonstraram que *Drosophila melanogaster* é capaz de reduzir o arseniato a arsenito, porém, aparentemente não está apta a biometilar essas formas inorgânicas do arsênio, embora, a incoerência da biometilação não signifique que *Drosophila* seja totalmente desprovida de mecanismos para desintoxicação do arsênico inorgânico.

Há evidências para a participação das esterases em diversos processos fisiológicos nos insetos, embora seu papel em grande parte ainda não esteja suficientemente claro (ZHANG *et al.*, 2010), é fato que, os processos de desintoxicação xenobiótica (OAKESHOTT *et al.*, 1993; RUSSELL *et al.*, 1996) e de resistência e tolerância a inseticidas (RAYMOND *et al.*, 1993; MUTERO *et al.*, 1994; SPACKMAN *et al.*, 1994; RAUSCHENBACH *et al.*, 1994; WHYARD *et al.*, 1994; FEYEREISEN, 1995) estão ligados a elas.

Albuquerque e Napp (1981) salientam a presença de associações significativas entre as frequências alélicas em *loci* de esterases e fatores ambientais em alguns insetos, tais como os drosofilídeos, sendo que a maioria desses polimorfismos parece estar associada à heterogeneidade ambiental. A expressão diferencial das esterases durante o ciclo de vida dos insetos é provavelmente uma resposta proveniente de mecanismos regulatórios, que devem atuar na expressão gênica e em seus produtos finais, assim essas enzimas são sintetizadas à medida que são necessárias as funções metabólicas que exercem no organismo. Estudos utilizando ratos (PATLOLLA e TCHOUNWOU, 2005), carrapatos (LEE e BATHAM, 1966) e humanos (ALI *et al.*, 2010) demonstram a ocorrência de interações entre compostos inorgânicos de arsênio e algumas esterases.

Há necessidade de análises, de caráter ecotoxicológico acerca dos efeitos do arsênio sobre os organismos vivos, englobando todas as possíveis interações decorrentes da sua presença. Considerando-se que a compreensão dos efeitos ecotoxicológicos do arsênio é fundamental para atenuar o seu efeito deletério sobre a saúde humana e ecológica (GBARUKO *et al.*, 2008).

O gênero *Drosophila* representa um sistema modelo não somente para a compreensão da evolução do genoma, mas igualmente para a pesquisa experimental comparativa. Nenhum outro grupo tem uma filogenia tão bem definida e uma literatura extensiva para a genética, o desenvolvimento, a neurobiologia, o comportamento, a fisiologia e a ecologia (MARKOW e O'GRADY, 2006). O que possibilita a sua utilização, no campo da ecotoxicologia com o intuito de se detectar

a sensibilidade a produtos químicos e para o biomonitoramento de resíduos (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Utilizou-se nesse estudo uma espécie pertencente ao subgênero *Drosophila*, grupo repleta, subgrupo mercatorum (VILELA, 1983). O grupo de espécies *Drosophila repleta* está entre os maiores de todos os grupos de espécies no gênero *Drosophila*. Parte da radiação *virilis - repleta* (THROCKMORTON, 1982), é considerado uma das mais importantes e bem sucedidas radiações no gênero *Drosophila* (DURANDO *et al.*, 2000). A presença e representatividade de *Drosophila mercatorum* tornam-a um excelente organismo modelo para estudos no campo da ecotoxicologia.

Esse estudo tem como objetivo analisar os efeitos causados a *D. mercatorum* pela saturação do metaloide arsênio na forma de arseniato de sódio (Na_2HAsO_4) *in vitro*, por meio da comparação entre as taxas de sobrevivência e dos perfis esterásicos gerados por indivíduos expostos a diferentes concentrações de arsênio.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção e Manutenção da Espécie

A linhagem de *Drosophila mercatorum* utilizada nesse estudo foi cedida pelo laboratório de Genética e Evolução da UNICENTRO, sendo esta estabelecida por grande número de gerações em meio de cultura banana-ágar, armazenada em garrafas de vidro de 250 mL, sob fotoperíodo de 12 horas, mantida a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Sendo a manutenção da linhagem realizada por meio de repiques a cada 7 dias.

4.4.2 Delineamento Experimental

Os indivíduos da linhagem de *D. mercatorum* foram triados e identificados em microscópios estereoscópicos acoplados a câmaras de gás carbônico através de chave de identificação (FREIRE-MAIA e PAVAN, 1949) e a morfologia da genitália masculina foi analisada (VILELA, 1983) para confirmar a pureza da linhagem.

Um repique foi realizado, foram inseridos machos e fêmeas adultos em 10 garrafas de meio de cultura, após 24 horas as moscas adultas foram retiradas. Os descendentes ovopositados foram retirados após 3 dias, os quais foram utilizados nos ensaios ecotoxicológicos. Este procedimento foi utilizado para a padronização do estadio larval, possibilitando assim a inserção de um número igual de larvas de primeiro estadio para se desenvolverem perante as condições de controle e dos testes experimentais.

Foram preparadas garrafas de 250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura banana-ágar. Utilizou-se água destilada para a preparação do meio de cultura. O experimento foi conduzido em triplicata, sendo o controle constituído apenas pelo meio de cultura e os tratamentos preparados com adição do arseniato de sódio em concentrações pré-estabelecidas com base em um experimento piloto.

O meio de cultura que seria utilizado nas trélicas teste foi fracionado em porções de 200 ml e as concentrações de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, $15,0 \text{ mg L}^{-1}$, $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ de arsênio foram produzidas por meio da adição de quantidades definidas do sal arseniato de sódio contido em uma solução mãe de concentração $416,46 \text{ mg L}^{-1}$.

Foram inseridas 50 larvas de primeiro estadiu de *D. mercatorum* em cada uma das garrafas, nas trélicas teste e controle. Posteriormente foram conduzidas a sala climatizada com temperatura constante de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), e fotoperíodo de 12 horas. O desenvolvimento das moscas foi acompanhando por 7 dias, até a fase adulta, posterior a emergência do adulto. Após a retirada dos adultos emergidos, no sétimo dia, as garrafas foram mantidas em estufa e acompanhadas por mais 7 dias no intuito de verificar-se possíveis atrasos no processo de desenvolvimento das moscas, o que não ocorreu, visto que não houveram mais nascimentos.

4.4.3 Taxas de Sobrevivência

Os indivíduos adultos emergidos foram contabilizados e sexados. Após identificação de machos e fêmeas em microscópios estereoscópicos acoplados a câmaras de gás carbônico, foram determinadas as taxas de sobrevivência e mortalidade entre os mesmos. Foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos dados e o teste de homogeneidade de variância de Levene. O teste de Tukey foi aplicado para analisar diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos quando comparadas ao controle. Todos os testes estatísticos foram realizados no ambiente do software R. O método Trimmed Spearman-Kärber foi utilizado para estimar a LC_{50} (Hamilton *et al.*, 1977) a partir dos dados de sobrevivência e mortalidade.

4.4.4 Eletroforese das Esterases

Após a triagem os indivíduos machos e fêmeas oriundos das trélicas, foram numerados, separados e congelados individualmente a -20°C para preservação das características e da atividade enzimática a serem posteriormente detectadas por meio da análise eletroforética. A realização das análises ocorreu 48 horas após o congelamento.

Utilizou-se para a análise da atividade esterásica o corpo inteiro das moscas, sendo este macerado individualmente em 20 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 8,8; água; glicerol 10%; azul de bromofenol 1%), dos quais 10 μL do sobrenadante do extrato produzido foram aplicados ao gel de poliacrilamida a 10%.

Sendo este submetido à separação eletroforética à voltagem constante de 110V em temperatura ambiente durante três horas e trinta minutos.

Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2 a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, os géis foram corados com solução contendo 100 ml de tampão de fosfato, 10 ml de n -propanol e 120 mg do sal Fast Blue RR, onde 40 mg de α -naftil acetato e 30 mg de β -naftil acetato, previamente dissolvidos em 2 ml de acetona, foram adicionados (MATEUS *et al.*, 2011). As diferentes formas pelas quais as esterases hidrolisam os substratos propiciam diferentes colorações no gel. Aquelas que hidrolisam o α -naftil acetato passam a ter coloração preta, as que hidrolisam β -naftil acetato coram em vermelho e as que hidrolisam ambos apresentam a cor magenta. Os *loci* enzimáticos foram numerados em ordem crescente da maior para a menor migração no gel. O software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para a análise densitométrica quantitativa das intensidades das bandas no gel, utilizando-se amostras das esterases expressas no controle, como padrão para a comparação com as expressas nos tratamentos com diferentes concentrações de arsênio.

As amostras foram separadas por sexo e por tréplica, e cada um dos géis produzidos contou somente com machos ou somente com fêmeas pertencentes à mesma garrafa dentro de cada tréplica (Tr1, Tr2 e Tr3). Além disso, as amostras foram dispostas em cada gel iniciando-se com as de controle e posteriormente em ordem crescente para as concentrações que foram testadas. Foram testados 6 indivíduos de cada uma das garrafas das trélicas, sendo 3 machos e 3 fêmeas, totalizando 108 indivíduos submetidos a análise esterásica.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Taxas de Sobrevivência

As taxas de sobrevivência foram calculadas com base nos totais numéricos e percentuais de indivíduos que se desenvolveram desde o primeiro estágio larval até a fase adulta nos meios de cultura tratados e no controle. A tabela 01 mostra os totais de indivíduos que conseguiram atingir a fase adulta em cada uma das réplicas.

Tabela 01 – Total de machos e fêmeas, totais gerais e percentuais (indivíduos que chegaram à fase adulta em cada garrafa nas réplicas). Foram inseridas inicialmente 50 larvas de primeiro estágio.

RÉPLICAS	CONTROLE			TESTE 5,0			TESTE 10,0		
	♂	♀	TOTAL (%)	♂	♀	TOTAL (%)	♂	♀	TOTAL (%)
1	16	20	36 (72)	16	20	32 (64)	11	17	28 (56)
2	20	21	41 (82)	20	21	40 (80)	15	22	37 (74)
3	18	26	44 (88)	18	26	46 (92)	14	18	32 (64)

RÉPLICAS	TESTE 15,0			TESTE 20,0			TESTE 25,0		
	♂	♀	TOTAL (%)	♂	♀	TOTAL (%)	♂	♀	TOTAL (%)
1	8	16	24 (48)	10	12	22 (44)	15	14	29 (58)
2	21	17	38 (76)	19	16	35 (70)	6	5	11 (22)
3	16	10	26 (52)	12	11	23 (46)	9	14	23 (46)

Um total de 900 larvas foram testadas, dessas, 567 sobreviveram até a fase adulta, o que representa uma sobrevivência percentual total de 63%. É importante salientar que esse número amostral é significativamente maior do que o utilizado em trabalhos semelhantes tanto com arsênio (RIZKI *et al.*, 2006; GOLDSTEIN e BABICH, 1989) quanto com metais pesados (AL-MOMANI E MASSADEH, 2005; YEPISKOPOSYAN *et al.*, 2006; IKEDA *et al.*, 2011; HAQ *et al.*, 2012).

Segundo Oliveira (2007) são múltiplas as causas de variações na proporção sexual em drosofilídeos, podendo ter origem genética, fisiológica ou ambiental. O princípio de Fisher (1930) postula que uma população bem adaptada, supostamente, apresenta ambos os sexos em proporções iguais (1:1). Entretanto, em organismos de reprodução sexuada, a seleção natural pode apresentar intensidade diferencial em relação a um dos sexos, resultando em distorções nessa proporção

(SREERAMA e KRISHNAMURTHY, 1973), tal fato é reconhecido e estudado em insetos (SEGER e STUBBLEFIELD, 2002).

Aceitando-se o princípio de Fisher (1930) para a população utilizada no presente estudo, entende-se que a proporção entre machos e fêmeas é igual. Não é possível determinar o sexo das moscas durante a fase larval, portanto, o sexo dos indivíduos que não sobreviveram até a fase adulta não foi determinado. No entanto, é fato que a morte dos indivíduos antes de atingirem a fase adulta de qualquer forma irá afetar a proporção sexual.

Nesse sentido, foram analisados aspectos ecológicos em *D. mercatorum*, no que se refere à proporção sexual, verificando possíveis distorções decorrentes do estresse por arsênio como um fator ambiental, considerando-se o sexo dos indivíduos que foram capazes de sobreviver até a fase adulta. Considerando $\alpha=0,05$ é aceita a hipótese de que os dados referentes à distribuição de machos e fêmeas nas trélicas são normais pelo teste de Shapiro-Wilk onde obteve-se $W= 0,9819$ e $p = 0,8061$.

As médias de sobrevivência até a fase adulta entre machos e fêmeas obtidas podem ser consideradas homogêneas, onde $F=1,9338$ e $p =0,08567$, o que atesta a hipótese de que as variâncias da população são iguais ($\alpha=0,05$).

Não há diferenças estatísticas significativas ($\alpha=0,05$) relacionadas ao sexo quanto à capacidade dos indivíduos de sobreviverem em ambientes contaminados por arsênio. Aceitando essa hipótese, foram realizadas análises estatísticas desconsiderando o gênero dos indivíduos, aceitando os totais de sobrevivência dentro de cada ensaio teste em cada uma das trélicas (figura 01).

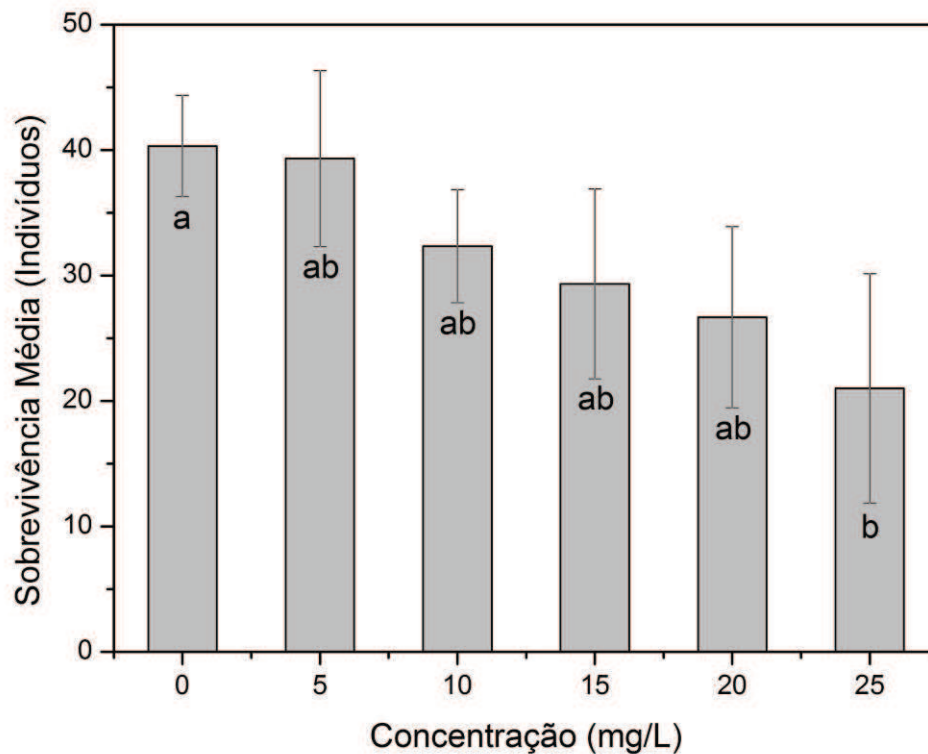


Figura 01 – Médias de sobrevivência de indivíduos da espécie *Drosophila mercatorum* até a fase adulta quando submetidos a estresse por arsênio durante 7 dias, por réplica, independente do sexo. Letras iguais indicam médias estatisticamente semelhantes ($\alpha=0,05$).

A normalidade e homogeneidade dos dados foram confirmadas pelo teste de Shapiro-Wilk ($W= 0,9713$ e $p= 0,8213$) e pelo teste de Levene ($F= 0,7719$ e $p= 0,5879$). Foram detectadas diferenças significativas para as taxas médias de sobrevivência ao comparar o controle com o tratado de concentração 25 mg L^{-1} de arsênio que apresentou $p= 0,0416$ considerando-se $\alpha=0,05$.

4.5.2 Determinação da CL_{50}

O teste Trimmed de Spearman-Kärber foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hamilton *et al* (1977) com o intuito de estimar o valor da CL_{50} para o arsênio com intervalo de confiança de 95 %. O valor obtido foi $CL_{50}= 20,997$ ($15,93 \leq CL_{50} \leq 27,63$) mg L^{-1} de arsênio. As diferenças estatísticas demonstradas anteriormente corroboram com o valor estimado para CL_{50} .

Goldstein e Babich (1989) ao realizarem testes para determinação da CL_{50} para o arseniato de sódio utilizando indivíduos adultos de *D. melanogaster*, por meio de regressão linear obtiveram o valor de 0,79 mM/L de Na_2HAsO_4 ou seja, 59,453 mg L^{-1} . Esse valor aproxima-se do triplo do detectado no presente estudo para *D. mercatorum*, o que indica uma maior sensibilidade ao efeito tóxico dessa substância na linhagem em análise. É apontado por Goldstein e Babich (1989) que as larvas são mais susceptíveis a efeitos tóxicos em comparação aos adultos, o que poderia ser uma causa para a maior sensibilidade encontrada para *D. mercatorum*.

Apesar de não terem sido testadas taxas de reprodução e natalidade frente a contaminação por arseniato no experimento em análise, provavelmente o valor de CL_{50} obtido para a linhagem tenha uma boa aproximação do real ao considerarmos o perfil r-estrategista do gênero *Drosophila* e os pronunciados efeitos causados pelo arsênio sobre as asas dos indivíduos que se desenvolveram nos meios de cultura contaminados (dados não mostrados).

De acordo com Markow e O'Grady (2008) a longo prazo é esperado que fatores evolutivos reflitam a adaptação a parâmetros ecológicos, contudo, atualmente fatores bióticos e abióticos variam muito no tempo e no espaço. Evidentemente testes *in vitro* não são capazes de simular variáveis presentes na natureza, como por exemplo, o comportamento e as possíveis formas de contaminação de *D. mercatorum* pelo arsênio em seu ambiente natural. Contudo, dessa forma podem-se estimar possíveis respostas dos indivíduos e até mesmo encontrarem-se parâmetros passíveis de utilização para a detecção da presença de níveis tóxicos do arsênio no ambiente.

4.5.3 Perfil Esterásico

Foram observados 8 *loci* com atividade esterásica, sendo 6 deles preferencialmente α -esterases, 1 preferencialmente β -esterase e 1 α - β -esterase, tanto para machos quanto para fêmeas.

Dentre os padrões de expressão dos *loci* com atividade esterásica observados, não foi detectada a inibição de nenhum *locus* em virtude do estresse causado pelo arsênio, contudo foram detectadas ativações e aumento na intensidade de expressão de vários *loci*.

O perfil de expressão obtido é o mesmo, independente do sexo das moscas. Portanto, os resultados são apresentados e discutidos de maneira agrupada, haja vista que ao separar os sexos as mesmas afirmações seriam desnecessariamente repetidas. Os géis resultantes das tréplicas referentes aos machos estão dispostos nas figuras 02, 03 e 04 e os das fêmeas nas figuras 05, 06 e 07.

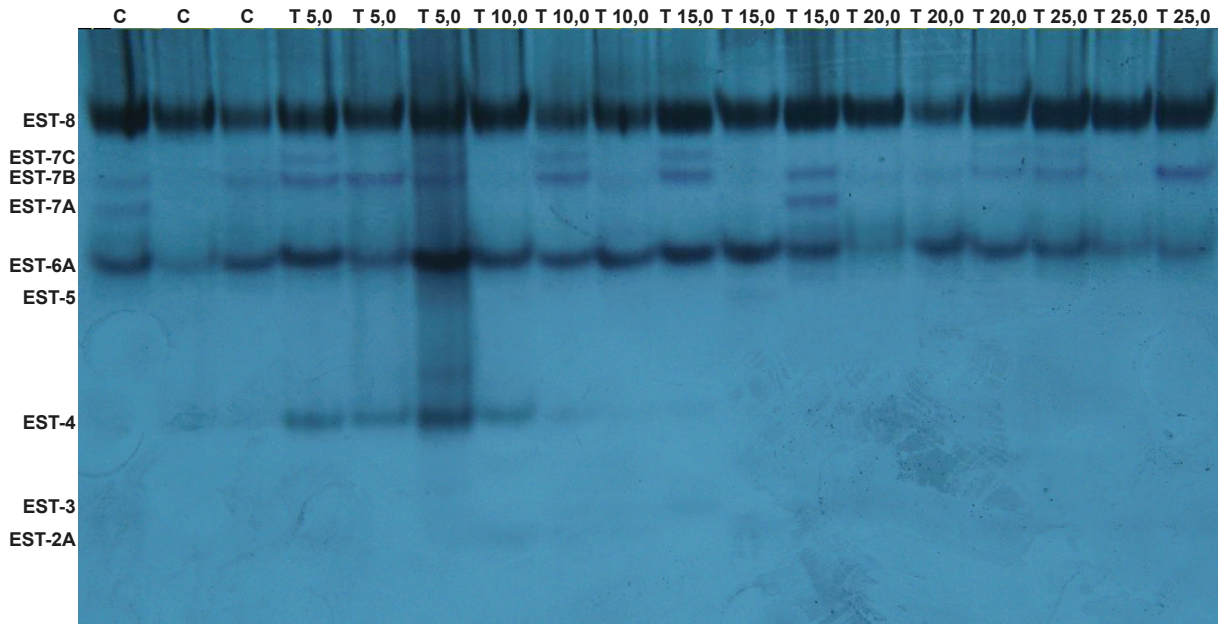


Figura 02 – Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr1 submetidos a estresse por arsênio durante 7dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração.

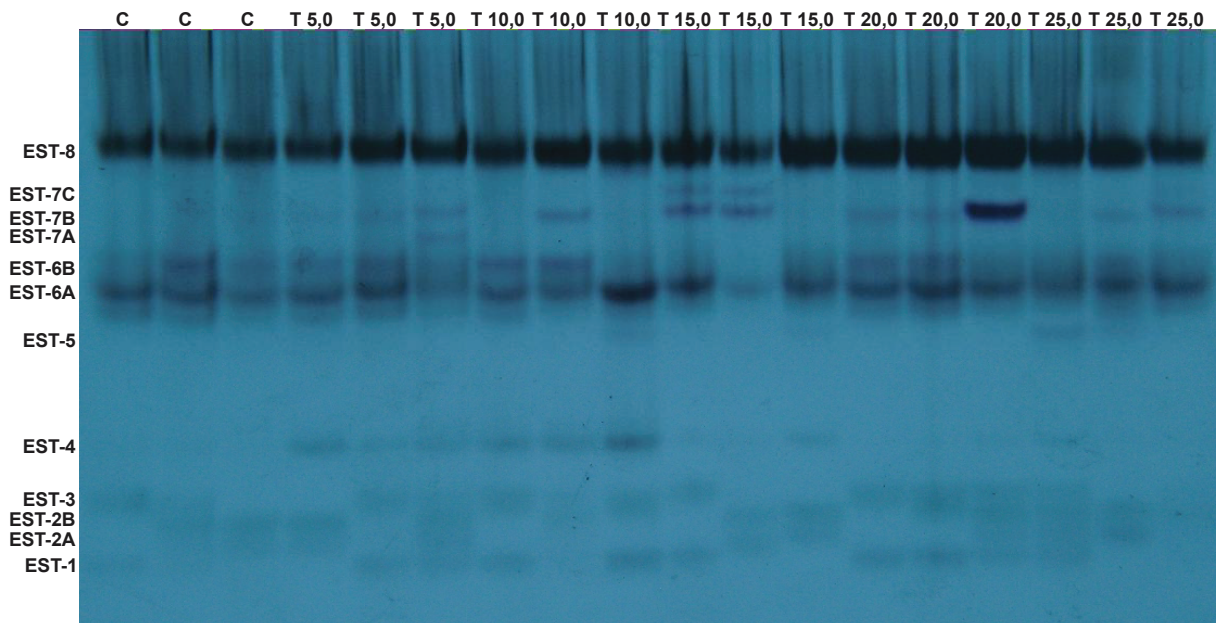


Figura 03 – Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr2 submetidos a estresse por arsênio durante 7dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração.

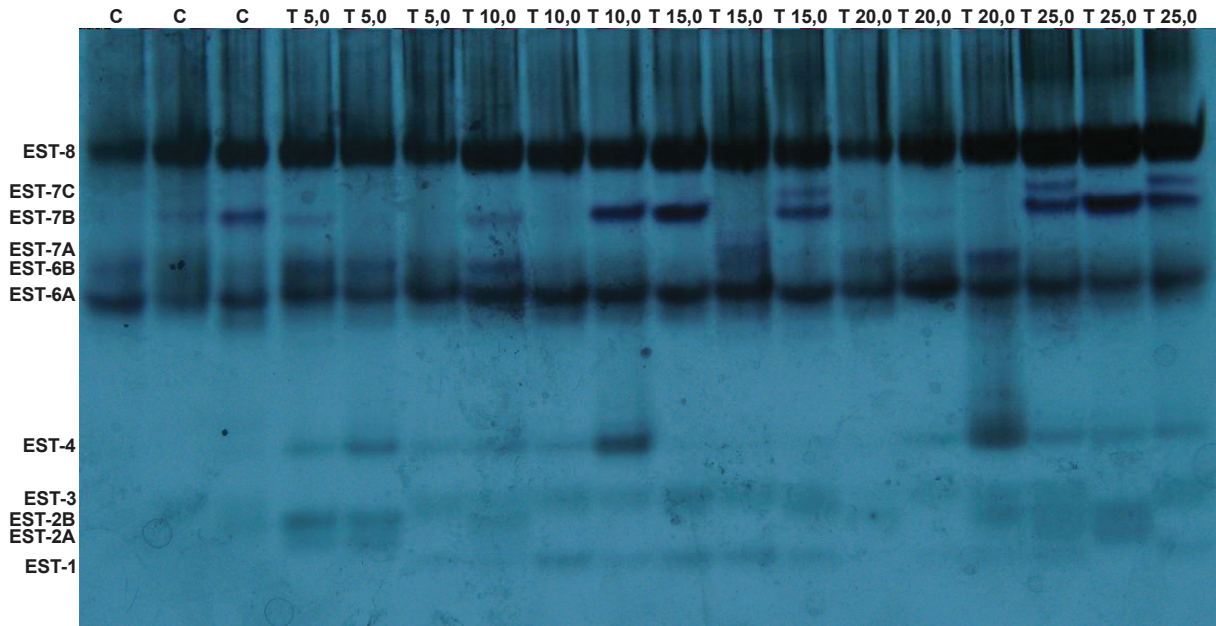


Figura 04 – Atividade esterásica dos indivíduos macho de *D. mercatorum* pertencentes a Tr3 submetidos a estresse por arsênio durante 7 dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração.

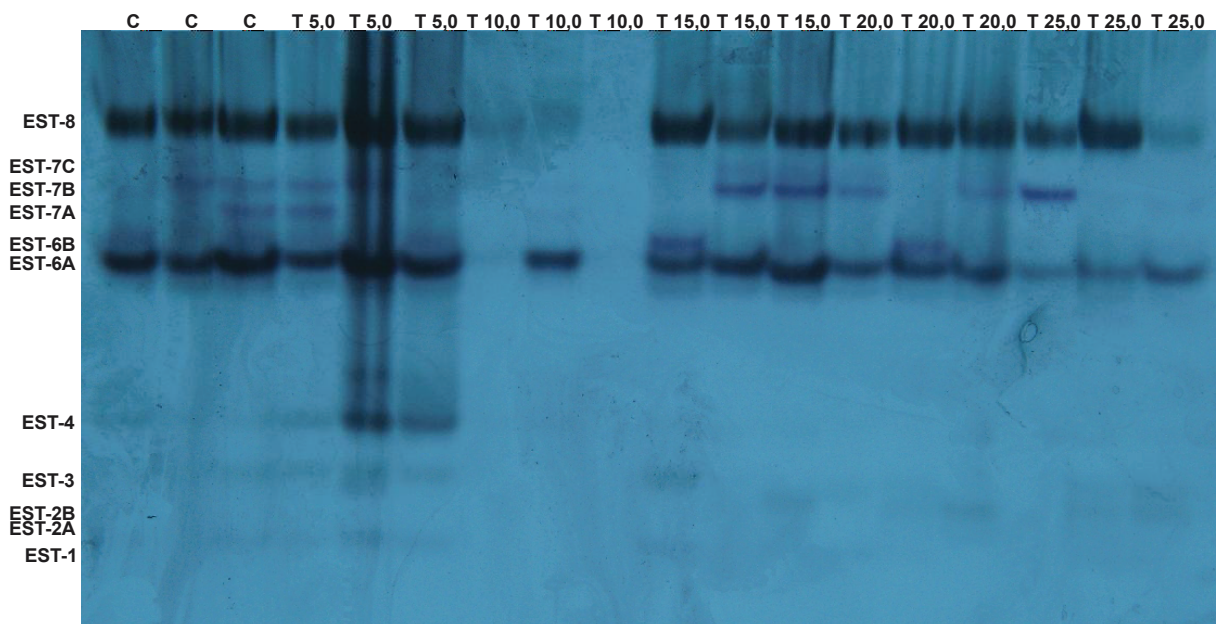


Figura 05 – Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr1 submetidos a estresse por arsênio durante 7 dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração.

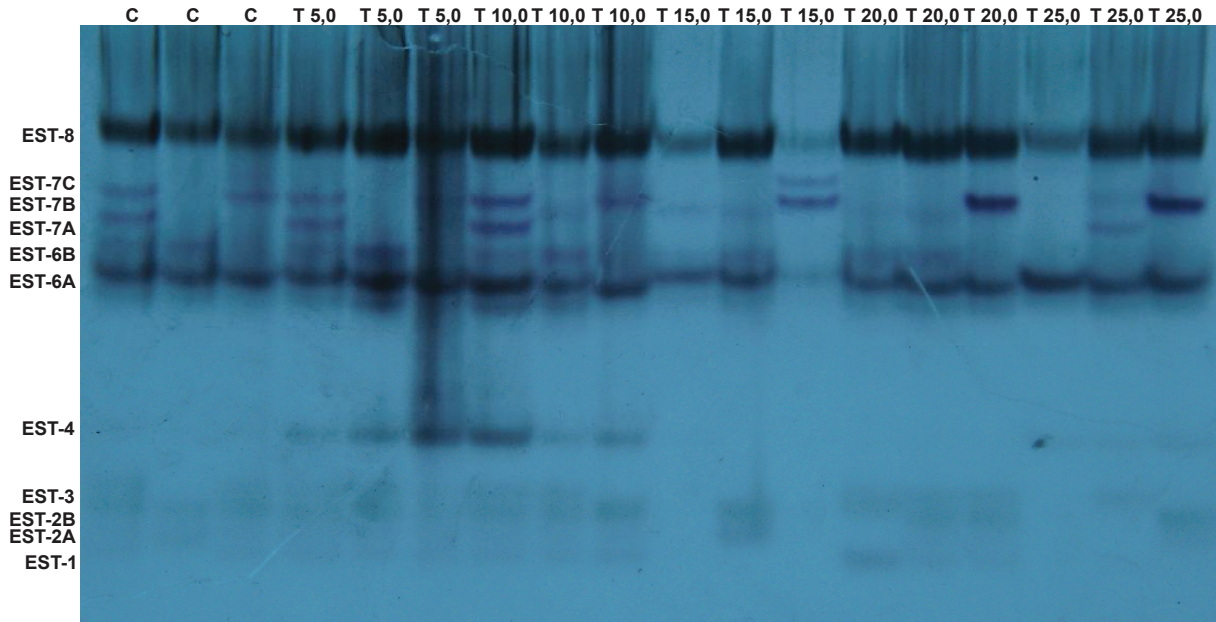


Figura 06 – Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr2 submetidos a estresse por arsênio durante 7dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração.

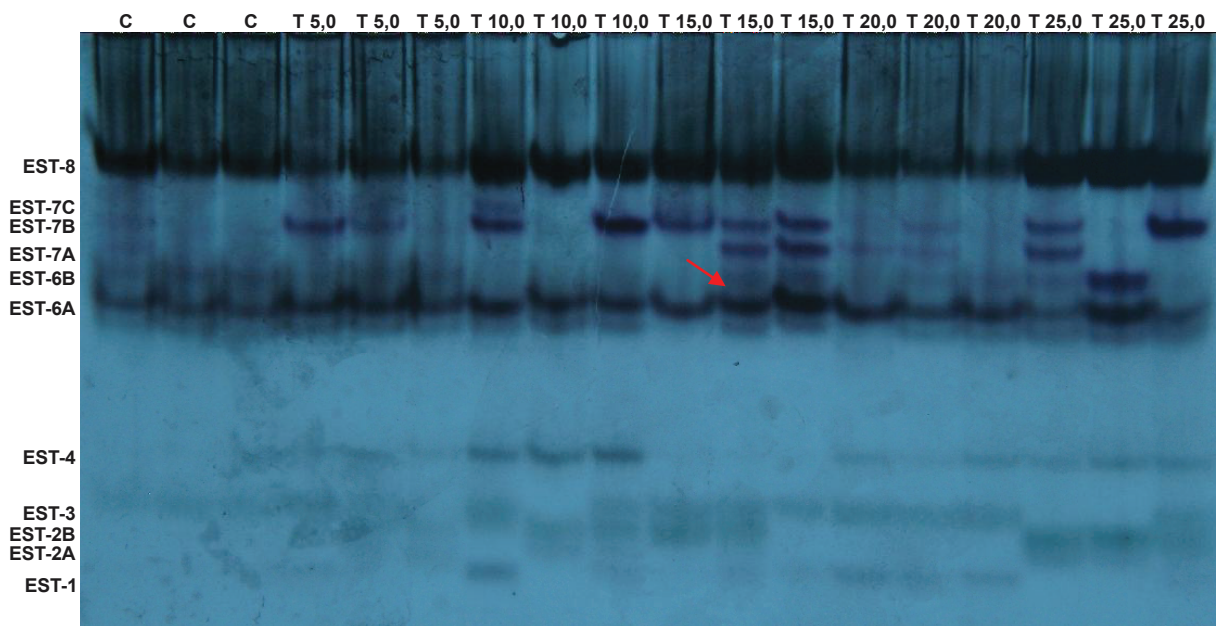


Figura 07 – Atividade esterásica dos indivíduos fêmea de *D. mercatorum* pertencentes a Tr3 submetidos a estresse por arsênio durante 7dias. C=Controle; T= Teste e respectiva concentração; → Proteína dimérica em heterozigose.

As bandas com coloração escura nos géis representam a atividade das α -esterases tratando-se de EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-8. A atividade das β -esterases é representada pelas bandas com coloração avermelhada, sendo EST-7A, EST-7B e EST-7C. As bandas com coloração preto-avermelhada

representam atividade das α - β -esterases o que pode ser observado em EST-6A e EST-6B.

Os *loci* EST-1, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-8 são monomórficos e monoméricos. O *locus* EST-5 foi encontrado somente em machos, no entanto, já foi também encontrado em fêmeas durante outras análises (dados não mostrados), aparecendo sempre de forma esporádica. Detectou-se polimorfismo para o *locus* EST-7 que apresentou 3 formas distintas, EST-7A, EST-7B e EST-7C, sendo monomérico. O *locus* EST-6 é formado por EST-6A e EST-6B e é dimérico (figura 07).

Mouches *et al* (1987) consideram que processos de resistência e detoxificação estejam ligados a modificações estruturais e/ou mudanças nos padrões e no volume com que as esterases são expressas. Embora não exista nenhum método simples para distinguir entre estes dois tipos de mecanismos, é fato que esse conhecimento poderia melhorar a nossa compreensão da dinâmica evolutiva de resistência. Quando traçamos o perfil esterásico de *D. mercatorum* frente ao estresse com arsênio buscamos nos aproximar desses conceitos.

Ao observar os zimogramas torna-se evidente a ativação da α -EST-4 de maneira geral em todas as concentrações de arsênio testadas, estando essa ausente em todos os indivíduos controle, portanto, é possível inferir que a ativação do *locus* codificador desta enzima esteja de alguma forma relacionada à resistência e detoxificação, ou mesmo a condição de estresse pelo arsênio em *D. mercatorum*.

Outro fator interessante é a distribuição com que aparecem as bandas de EST-1, EST-2A, EST-2B e EST-3. Estas esterases estão presentes de forma quase nula nos indivíduos controle, aparecendo nos indivíduos submetidos ao arsênio. É possível interpretar que estas enzimas também estejam ligadas a processos de detoxificação e resistência ao estresse causado pelo arsênio, evidenciando a diversidade genética da espécie e as consequentes possíveis diversidades relacionadas a esses processos.

Wilczek *et al* (2003) ao analisarem o efeito de metais sobre espécies de aranhas também encontraram respostas enzimáticas heterogêneas nos indivíduos e, afirmam ainda que ao longo do tempo indivíduos sujeitos a altas concentrações de metais tendem a desenvolver melhores formas para tolerar e resistir à eles e que a resposta enzimática tende a tornar-se mais homogênea dentro dos grupos a quais pertencem.

De maneira geral, todas as β -esterases detectadas parecem ter sua atividade relativa aumentada quando se observa a partir do controle, dirigindo-se para as concentrações mais altas de arsênio, o que é evidenciado pelo aumento do contraste das bandas no gel. Dentre elas, destacamos o pronunciado aumento na intensidade de EST-7B à medida que aumenta a concentração de arsênio testada, em algumas das amostras testadas, conforme demonstrado pela análise densitométrica (Figuras 08 e 09).

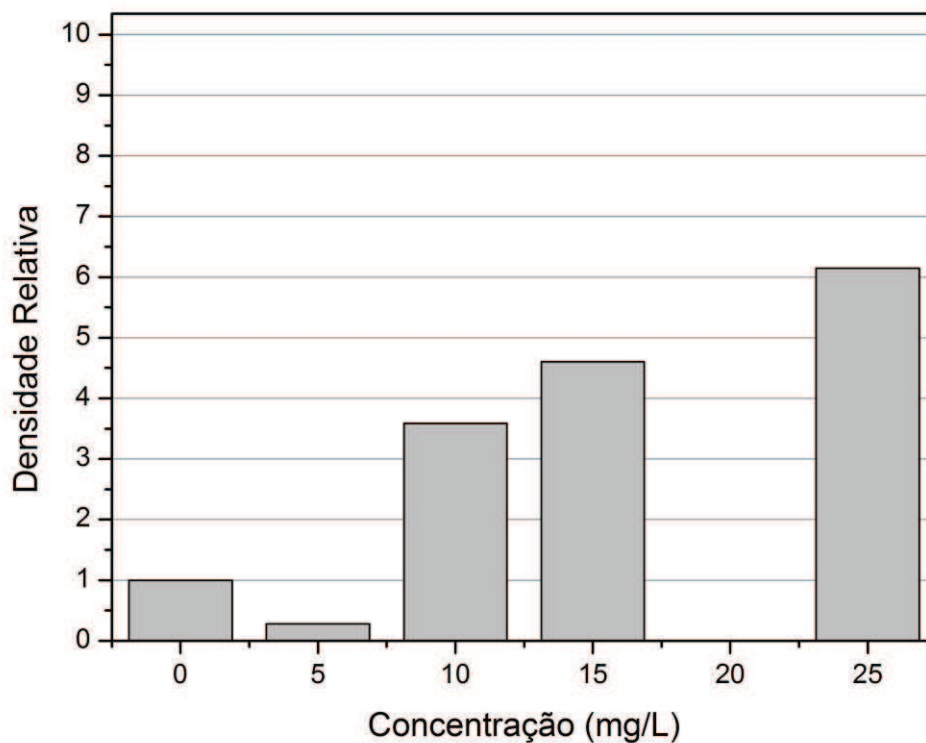


Figura 08 – Densidade relativa de EST-7B em machos de *Drosophila mercatorum* submetidos a estresse por diferentes concentrações de arsênio durante 7 dias. A esterase utilizada como padrão pertence ao controle e apresenta densidade relativa = 1,00. As EST-7B analisadas pertencem a Tr3 mostrada na figura 04.

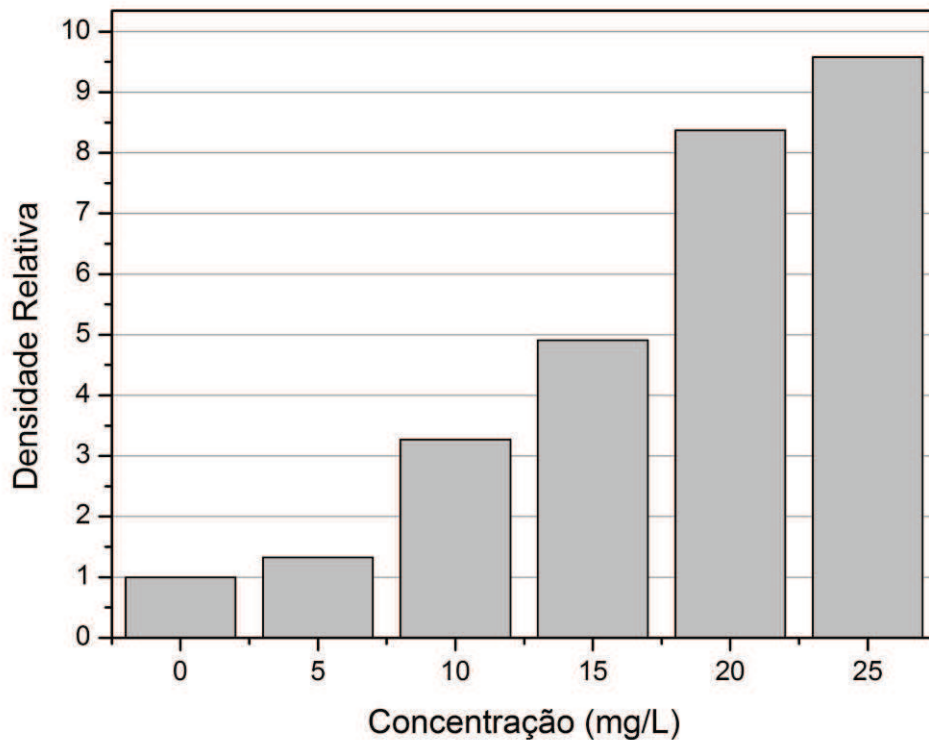


Figura 09 – Densidade relativa de EST-7B em fêmeas de *Drosophila mercatorum* submetidas a estresse por diferentes concentrações de arsênio durante 7 dias. A esterase utilizada como padrão pertence ao controle e apresenta densidade relativa = 1,00. As EST-7B analisadas pertencem a Tr2 mostrada na figura 04.

Ding e Wang (2006) testando *D. melanogaster*, encontraram a presença de uma esterase adicional em faixas de concentração entre 40 e 80 mg L⁻¹ de cobre. No caranguejo *Eriocheir sinensis*, baixas doses de cádmio também aumentam a atividade esterásica (WANG *et al.*, 2001). Mukanganyama *et al* (2003) demonstraram que o ácido hidroxâmico presente em cereais é capaz de diminuir a atividade esterásica em uma espécie de afídeos e que essa diminuição potencializa o efeito de inseticidas sobre eles. As esterases tem sido utilizadas como biomarcadores específicos e não-específicos para efeitos causados por inseticidas, metais e demais substâncias tóxicas (MIGULA *et al.*, 1999; THOMPSON, 1999; WALKER, 2001; WILCZEK *et al.*, 2003). Portanto, o aumento na atividade relativa das β -esterases de *D. mercatorum* pode estar relacionado a processos de tolerância e resistência ao arsênio.

Nestes termos é possível especular algumas razões para o padrão observado. A primeira consiste no fato de que o arsênio pode ter sido utilizado como co-fator, dessa forma, aumentando a atividade enzimática relativa ao compararmos a atividade esterásica do controle com os tratamentos. A segunda é a de que sua presença pode ter feito com que a atividade de algumas enzimas, que possuem ação detoxificadora, tenha sido aumentada. Uma terceira razão poderia ser o aumento na síntese dessas enzimas o que também resultaria no aumento da intensidade da atividade enzimática relativa. É fato que, as larvas que deram origem aos adultos sobreviventes, nos tratamentos, ficaram em contato com o arsênio durante todo seu processo de desenvolvimento, portanto, todas as razões apresentadas se tratam de possíveis respostas a esse contato.

4.6 CONCLUSÃO

A presença das diferentes concentrações de arsênio nos tratamentos não alterou a proporção sexual da linhagem de *D. mercatorum* testada, com relação à proporção sexual do controle.

O padrão esterásico de *D. mercatorum* é afetado pela presença do arsênio nos tratamentos. O arsênio não inibe a atividade de nenhuma das esterases detectadas, no entanto, é possível que promova a ativação e o aumento na atividade de algumas delas.

As taxas de sobrevivência e os perfis esterásicos gerados demonstram a sensibilidade da espécie à presença do arsênio, dessa forma seria possível utilizá-la como bioindicador, contudo, a exploração desses parâmetros requer estudos mais apurados.

Sendo o trabalho pioneiro, acreditamos na necessidade de mais estudos dentro dessa linha, que possam contribuir para elucidar uma série de questões acerca dos mecanismos biológicos de tolerância, resistência e detoxificação de compostos de arsênio em *D. mercatorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic Toxicology Test Methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher: Boca Raton, p. 19-38, 2003.

ALBUQUERQUE, C.; M., R. de; NAPP, M. Genetic variability at the esterase-6 *locus* in natural populations of *Drosophila simulans* in relation to environmental heterogeneity. *Genetics*, p. 399-407, 1981.

ALI, N.; HOQUE, M. A.; HAQUE, A.; SALAM, K. A.; KARIM, M. R.; RAHMAN, A.; ... e HOSSAIN, K. Research Association between arsenic exposure and plasma cholinesterase activity: a population based study in Bangladesh. *Environmental Health*, 9 p., 2010.

AL-MOMANI, F. A.; MASSADEH A. M. Effect of Different Heavy-Metal Concentrations on *Drosophila melanogaster* Larval Growth and Development. *Biological Trace Element Research*, v. 108, p. 271-277, 2005.

ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. *Drosophila melanogaster meigen*: 3. sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Química Nova*, v. 24, p. 768-772, 2001.

ALTENBURGER, R. Understanding combined effects for metal co-exposure in ecotoxicology. *Met. Ions Life Sci.*, v. 8, p. 1-26, 2011.

AMASA, S. K. Arsenic pollution at Obuasi goldmine, town and surrounding countryside. *Environ Health Perspect*, 131 p., 1975.

BÄCHLI, G. TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae, v.1.04, Database 2012/10. Available at <http://www.taxodros.uzh.ch/> (Acessado em 10 de Janeiro de 2013).

BAER, C. D.; EDWARDS, J. O.; RIEGER P. H. Kinetics of the hydrolysis of arsenate(V) triesters. *Inorganic Chemistry*, v. 20, p. 905-907, 1981.

BAROSS, J. The Limits of Organic Life. In: *Planetary Systems*. National Academies Press, 100 p., 2007.

BELL, F. G. Environmental geology and health. *Environmental geology: principles and practice*. London: Blackwell Science., p. 487-500, 1998.

BENNER S. A.; HUTTER D. Phosphates, DNA, and the search for nonterrean life. A second generation model for genetic molecules. *Bioorg Chem.*, p. 62–80, 2002.

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. *Biochemistry*. WH Freeman & Co. New York, ed. 6, 2007.

BORGES, V. C.; FERRINI, M. T.; CAMPOS, F. G.; WAITSZERG, D. L. ;OLIVEIRA, G. P. C.; BOTTONI, A. Minerais. In: *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Editora Atheneu, 117 p., 2004.

BOYD, D. R. *Northern Exposure: Acute Pesticide Poisonings in Canada – Healthy Environment, Healthy Canadians Series*. Vancouver: David Suzuki Foundation, 35 p., 2007.

BRAUNSTEIN, A. E. Ober den Einfluß von Arsenat auf Phosphatumsatz und Glykolyse im Blut. *Biochem. Z.*, p. 68-93, 1931.

CAIRNS, J. J.; NIEDERLEHNER, B. R. *Ecotoxicological Toxicity Testing*. Boca Raton, USA: Lewis Publisher, 228 p., 1995.

CATELANI, A. R. A. L.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. Variation of genetics expresión during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Biochemical Genetics*, New York, v. 42, p. 69-84, 2004.

CERVANTES, C.; JI, G.; RAMIREZ, J. L.; SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol*, v. 15, p. 355-367, 1994.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the eco into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v.44, p.7-15, 2002.

CULLEN, W. R.; MCBRIDE, B. C.; REGLINSKI, J. The reaction of methylarsenicals with thiols - some biological implications. *J Inorg Biochem*, v.2, p.179-194, 1984.

DAVIES, P. C. W.; BENNER, S. A.; CLELAND, C. E.; LINEWEAVER, C. H.; MCKAY, C. P.; WOLFE-SIMON, F. Signatures of a shadow biosphere. *Astrobio*, p., 241–249, 2009.

DING, L.; WANG, Y. Effect of copper on the development, protein and esterase isozymes of *Drosophila melanogaster*. *Integrative Zoology*, v. 1, p. 73–77, 2006.

DUKER, A. A.; CARRANZA E. J. M.; HALE M. Arsenic geochemistry and health. *Environ. Int.*, v. 31, 2005.

DURANDO, C. M.; BAKER, R. H.; ETGES, W. J.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M.; DESALLE R. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 16, p. 296–307, 2000.

ELLENHORN M. J.; BARCELOUX, D. G. *Arsenic in medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. New York: Elsevier, p. 1012-1016, 1988.

ERB, T. J.; KIEFER, P.; HATTENDORF, B.; GÜNTHER, D.; VORHOLT1 J. A. GFAJ-1 is an arsenate-resistant, phosphate-dependent organism. *Science*, v.337, p.467-470, 2012.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.*, v.82-83, p.83-90, 1995.

FISHER, R. A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press: Oxford, 308 p., 1930.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da *Drosophila*. *Cultus*, v.1, p. 5-71, 1949.

GBARUKO B. C.; ANA G. R. E. E.; NWACHUKWU J. K. Ecotoxicology of arsenic in the hydrosphere: implications for public health. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 4737–4742, 2008.

GOCHFELD M. Chemical agents. In: BROOKS S.; GOCHFELD M.; HERZSTEIN J.; SCHENKER M. *Environmental medicine*. St. Louis: Mosby, p 592–614, 1995.

GOLDSTEIN, S. H.; BABICH, H. Differential effects of arsenite and arsenate to *Drosophila melanogaster* in a combined adult/developmental toxicity assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 42, p. 276–282, 1989.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for Estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, v. 11, p. 714-719, 1977.

HAQ, R.; KHAN, M. F.; HAQ E. Effects of Lead Acetate on Light Protein of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Basic & Applied Sciences*, v.8, p. 29-34, 2012.

HATHAWAY G. J.; PROCTOR N. H.; HUGHES J.P.; FISCHMAN M.L. Arsenic and arsine. In: PROCTOR N. H; HUGHES J.P.. *Chemical hazards of the workplace*. New York: Van Nostrand Reinhold, p 92–98, 1991.

HEED, W. B.; SANCHEZ, A.; ARMENGOL, R.; AND FONTDEVILA, A. Genetic differentiation among island populations and species of cactophilic *Drosophila* in the West Indies. In: BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T.; MACINTYRE, R. J. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*, Plenum Press: New York, p. 447–490, 1990.

HILLE R. Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.*, p. 360-367, 2002.

HUANG C.; KE Q.; COSTA M.; SHI X. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.*, p. 57–66, 2004.

IKEDA, A. C.; MACHADO, L. P. B.; GILONI-LIMA, P. C.. Avaliação do efeito do cádmio na mortalidade, fertilidade e fecundidade de indivíduos da espécie *Drosophila mercatorum pararepleta* (Diptera, Drosophilidae). *Voos Revista Polidisciplinar Eletrônica da Faculdade Guairacá*, v.3, 2011.

JAMESON G.; IBERS J. In: BERTINI I.; GRAY H.; STIEFEL I.; VALENTINE J. *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*. University Science Books: Sausalito, 354 p., 2007.

LAGE, C. R.; NAYAK, A.; KIM, C. H. Arsenic ecotoxicology and innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*, Oxford: University Press, p. 1040-1054, 2006.

LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. *Introduction to ecotoxicology*. Queensland, Australia: *Blackwell Science*, 170 p., 1999.

LARSEN, A.L. Isoenzymes and varietal identification. *Seed World*, Northwest Highway, v.25, p.5-6, 1969.

LAWTON, J.H. All creatures great but small. *Ecological Entomology*, London, p. 225-226, 2001.

LEE, R. M.; BATHAM, P. The activity and organophosphate inhibition of cholinesterases from susceptible and resistant ticks (Acari). *Entomologia experimentalis et applicata*, v. 9, p. 13-24, 1966.

LIDE, D. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 90th Edition, Versão para Internet. Boca Raton, 2010.

MARÍN, I.; SIEGAL, M. L.; BAKER, B. S. The evolution of dosage-compensation Mechanisms. *BioEssays*, p. 1106-1114, 2000.

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 45, p. 753-763, 1959.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. *Drosophila: a guide to species identification and use*. Academic Press (Elsevier): London, 250 p., 2006.

MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. Review: Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology*, v. 22, p. 747-759, 2008.

MARONI, G.; OTTO, E.; LASTOWSKI-PERRY, D. Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetics.*, p. 493-504, 1986.

MATEUS, R. P.; MACHADO, L. P. B.; CERON, C. R. Gene duplication and subsequent differentiation on esterases in catophilic *Drosophila* species. *Gene duplication chapter*, Book 2, 2011.

MCDOWELL, L. R. *Minerals in animal and human nutrition*. San Diego: Academic, 524 p., 1992.

MELANCON, M. J. Bioindicators of Contaminant Exposure and Effect in Aquatic and Terrestrial Monitoring. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher: Boca Raton, p. 257-269, 2003.

MIGULA P.; AUGUSTYNIAK M.; ŁASZCZYCA P.; WILCZEK G. Validation of selected biomarkers in invertebrates from the polluted Silesian Region In: Peakall DB, WALKER CH, (eds.) *Biomarkers: a pragmatic basis for remediation of severe pollution in Eastern Europe*. Kluwer Acad. Publ. Dodrecht, 75, 1999.

MOUCHES, C.; MAGNIN, M.; BERGE, J. B.; DE SILVESTRI, M.; BEYSSAT, V.; PASTEUR, N; GEORGHIOU, G. P. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natn. Acad. Sci.*, v. 84, p. 2113-2116, 1987.

MUKANGANYAMA, S.; FIGUEROA, C. C.; HASLER, J. A.; NIEMEYER H. M. Effects of DIMBOA on detoxification enzymes of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: aphididae). *Journal of Insect Physiology*, v. 49, p. 223–229, 2003.

MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J. M.; FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.91, p.5922-5926, 1994.

MYERS, M.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.*, v.5, 113-119, 1988.

NABI, A. H. M. N.; RAHMAN, M. M.; ISLAM, L. N. Evaluation of Biochemical Changes in Chronic Arsenic Poisoning among Bangladeshi Patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 2, p. 385-393, 2005.

NÉMETI, B.; GREGUS, Z. Reduction of Arsenate to Arsenite by Human Erythrocyte Lysate and Rat Liver Cytosol – Characterization of a Glutathione- and NADDependent Arsenate Reduction Linked to Glycolysis. *Toxicological Sciences*,v. 85, p. 847–858, 2005.

NOSS, R. F. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conserv. Biol*, v. 4, p. 355-364, 1990.

OAKESHOTT, J. G.; VAN PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetics*, v.90, p. 239- 268, 1993.

OLIVEIRA, S. C. F. Distribuição vertical e variação da proporção sexual em um gradiente de alturas de uma assembléia de drosofilídeos (Diptera, Drosophilidae) em uma área de Mata Atlântica nativa de Santa Catarina, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

PATTERSON, J. T.; WHEELER M. R. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. University of Texas Publications, p. 67–109, 1942

PATLOLLA, A. K.; TCHOUNWOU, P. B. Serum acetyl cholinesterase as a biomarker of arsenic induced neurotoxicity in sprague-dawley rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 2, p. 80-83, 2005.

PECK, S. L.; MCQUAID, B.; CAMPBELL, C. L. Using ant species (Hymenoptera: Formicidae) as a biological indicator of agroecosystem condition. *Environmental Entomology*, v.27, p.1102-1110, 1998.

PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R.; SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Cien. Cult.*, v.35, p.1313-1319, 1983.

POLEJACK, A.; TIDON, R. Learning of courtship components in *Drosophila mercatorum* (Patterson & Wheeler) (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. entomol.*, v.51, 2007.

PUGA, S. R.; RUBANO, S. Determinação de resíduos de bioinseticidas através de ensaio com *Drosophila melanogaster*. Instituto Biológico: São Paulo, p. 37-43, 1987.

RAUSCHENBACH, I. Y.; KHLEBODAROVA, T. M.; CHENTSOVA, N. A.; GRUNTENKO, N. E.; GRENBEEK, L. G.; YANTSEN, E. I.; FILIPENKO, M. L. Two forms of juvenile hormone esterase in *Drosophila virilis*. *Dokl. Biochem.*, v. 334, p. 14–17, 1994.

RAYMOND, M.; POULIN, E.; BOIROUX, V.; DUPONT, E.; PASTEUR, N. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, v. 70, p. 301-307, 1993.

REAVES, M. L.; SINHA, S.; RABINOWITZ, J. D.; KRUGLYAK, L.; REDFIELD, R. J. Absence of detectable arsenate in DNA from arsenate-grown GFAJ-1 cells. *Science*, v. 337, p. 470-473, 2012.

RICHARDSON, R. H.; RICHARDSON, M. E.; SMOUSE, P. E.. Evolution of electrophoretic mobility in the *Drosophila mulleri* complex. In: C. L. MARKERT. *Isozymes IV: Genetics and Evolution*. Academic Press: New York, p. 533–545, 1975.

RICHARDSON, R. H.; SMOUSE, P. E. Patterns of molecular variation. I. Interspecific comparison of electromorphs in the *Drosophila mulleri* complex. *Biochem. Genet.*, v. 14, p. 447–465, 1976.

RICHARDSON, R. H.; SMOUSE, P. E.; RICHARDSON, M. E. Patterns of molecular variation. II. Associations of electrophoretic mobility and larval substrate within species of the *Drosophila mulleri* complex. *Genetics*, v. 85, p. 141–15, 1977.

RIZKI, M.; KOSSATZ, E.; VELAZQUEZ, A.; CREUS, A.; FARINA, M.; FORTANER, S.; SABBIONI, E.; MARCOS, R. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Molec. Mutagen.*, v. 47, p. 162-168, 2006.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the "Drosophila" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. *Journal of Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 48, p. 310-321, 2010.

RODRIGUES, F. A. C. Ecogenotoxicologia dos agrotóxicos: avaliação comparativa entre ecossistema agrícola e área de proteção ambiental. Tese de doutorado, UnB, Brasília-DF, 2006.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. MORALES, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004.

ROSEN, B. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett*, v. 529, p. 86-92, 2002.

ROSEN, B. P.; AJEES, A. A.; MCDERMOTT, T. R. Life and death with arsenic. *BioEssays*, v. 33, p. 350-357, 2011.

RUSSELL, R. J.; ROBIN, G. C.; KOSTAKOS, P.; NEWCOMB, R. D.; BOYCE, T. M.; MEDVECZKY, K. M.; OAKESHOTT, J. G. Molecular cloning of an esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 26, p. 235-247, 1996.

RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of Drosophilid species. *Mol. Biol. Evol.*, v. 12, p. 391–404, 1995.

SEGER J.; STUBBLEFIELD J. W. Models of sex ratio evolution. In: Hardy I. C. W.. *Sex Ratios: Concepts and Research Methods* Cambridge. United Kindom, p. 2-25, 2002.

SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R.; BIZZO, N. M. V. Influence of different ways to set baits for collection of *Drosophila* flies in three natural environments. *Drosophila Information Service*, v. 56, p. 118-121, 1981.

SMEDLEY, P. L.; EDMUNDS, W. M.; PELIG-BA, K. B. Mobility of arsenic in groundwater in the Obuasi gold-mining area of Ghana: some implications for human health. In: APPLETON JD.; FUGE R.; MCCALL G. J. H. *Environmental geochemistry and health*. Geological Society special publication. New York: Chapman and Hall, p. 163–81, 1996.

SPACKMAN, M. E.; OAKESHOTT, J. G.; SMYTH, K. A.; MEDVECZKY, K. M.; RUSSELL, R. J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochem Genet.*, v. 32, p. 39 – 62, 1994.

SPICER, G. S. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: Molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J. Mol. Evol.*, v. 41, p. 749–759, 1995.

SPICER, G. S.; PITNICK, S. Molecular systematics of the *Drosophila hydei* subgroup as inferred from mitochondrial DNA sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 43, p. 281–286, 1996.

SREERAMA, R. G.; KRISHNAMURTHY, N. B. Sex ratio in *Drosophila* populations of Mysore. *Journal of Mysore University*, v. 25, p.14-18, 1973.

SULLIVAN, D. T.; ATKINSON, P. W.; BAYER, C. A.; MENOTTI-RAYMOND, M. The evolution of Adh expression in the *repleta* group of *Drosophila*. In: BARKER, J. S. F.; STARMER W. T.; MACINTYRE, R. J. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Plenum Press: New York, p. 407–418, 1990.

THOMAS, D. J.; STYBLO, M.; LIN, S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, p. 127–144, 2001.

THOMPSON, H. M. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, v. 8, p. 369-384, 1999.

THROCKMORTON L. H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King RC, *Handbook of Genetics*. Plenum: New York, p. 421–469, 1975.

THROCKMORTON, L. H. Pathways of evolution in the genus *Drosophila* and the founding of the *repleta* group. In: BARKER J. S. F.; STARMER, W. T. *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus–Yeast–Drosophila Model System*. Academic Press: New York, p. 33–48., 1982.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 87, p. 233–247, 2006.

VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Brasil. Entomol.*, v. 27, p. 1–114, 1983.

VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R.; SENE, F. M. Preliminary data on geographical distribution of *Drosophila* species within morpho-climatic domains in Brazil. II. The *repleta* group. *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 66–70, 1983.

WALKER C. H. *Organic pollutants an ecotoxicological perspective*. Taylor and Francis, New York, 2001.

WALKER, C.H.; MACKNESS, M. I. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.*, v.32, p.3265-3269, 1983.

WANG, L.; YANG, X. Q.; WANG, Q.; WANG, D. X. The accumulation of Cd²⁺ and the effect on EST in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis*. *Acta Zoologica Sinica*, v. 47, p. 96–100, 2001.

WASSERMAN, M.. Cytological evolution in the *Drosophila repleta* species group. In: BARKER J. S. F.; STARMER W. T. *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus–Yeast–Drosophila Model System*”. Academic Press: New York, p. 49–64, 1982.

WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: C. B. KRIMBAS C. B.; POWELL J. R.. *Drosophila Inversion Polymorphism*. CRC Press: Boca Raton, p. 455–552, 1992.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. S.. *Isozymes in plant biology*. London: Chapman and Hall, p. 46-72, 1990.

WHYARD, S.; DOWNE, A. E. R.; WALKER, V. K. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 24, p.819-827, 1994.

WILCZEK, G.; BABCZYŃSKA, A.; MIGULA, P.; WENCELIS B. Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from the metal pollution gradient. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 12, p. 765-77, 2003.

WOLFE-SIMON, F.; DAVIES, P. C. W.; ANBAR A. D. Did nature also choose Arsenic? *Int. J. Astrobio.*, v. 8, p. 69-74, 2009.

WOLFE-SIMON, F.; SWITZER B. J.; KULP, T. R.; GORDON, G. W.; HOEFT, S. E.; PETT-RIDGE, J.; STOLZ, J. F.; WEBB, S. M.; WEBER, P. K.; DAVIES, P. C. W.; ANBAR A. D.; OREMLAND, R.S. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*, v. 332, p. 1163-1166, 2010.

YEPISKOPOSYAN, H.; EGLI, D.; FERGESTAD, T.; SELVARAJ, A.; TREIBER, C.; MULTHAUP, G.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W. Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Res.*, v. 34, p. 4866-4877, 2006.

ZHANG, L.; GONG, X.; WANG, C.; JI, Y. The Diversity of Esterase Function and Encoding Genes. *Journal of Shenyang Agricultural University*, v. 5, p. 23-42, 2010.

ZOUROS, E. Genetic differentiation associated with the early stages of speciation in the *mulleri* subgroup of *Drosophila*. *Evolution*, v. 27, p. 601–621, 1973.