

# Genotoxicidade nas minhocas da espécie *Eisenia fetida* expostas a metafedrona e cetamina

## Genotoxicity on earthworms *Eisenia fetida* exposed to metaphedrone and ketamine

Ondina Ribeiro<sup>1,2,3</sup>, Tiago Natal-da-Luz<sup>3</sup>, Cláudia Ribeiro<sup>2</sup>, João Ricardo Sousa<sup>1</sup>, Isabel Gaivão<sup>4</sup> e João Soares Carrola<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB/Inov4Agro), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

<sup>2</sup> Unidade de Investigação em Toxicologia & Uma Só Saúde (1H-TOXRUN), Instituto Universitário de Ciências da Saúde, CESPU, CRL, Gandra, Portugal

<sup>3</sup> CFE-Centro de Ecologia Funcional – Ciências para as pessoas e para o Planeta, Laboratório Associado TERRA, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>4</sup> Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), UTAD, Vila Real, Portugal

(\*E-mail: joao@utad.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.33414>

Recebido/received: 2023.07.31

Aceite/accepted: 2023.10.16

### RESUMO

A metafedrona e a cetamina são duas substâncias psicoativas (SPAs) utilizadas para fins recreativos e que podem ser detetadas nos ecossistemas terrestres devido à irrigação dos solos com águas contaminadas, aplicação de lamas provenientes de estações de tratamento de águas residuais, entre outros. Apesar de chegarem aos solos, pouco se sabe acerca dos efeitos tóxicos que as SPAs podem induzir nos organismos terrestres e na ecologia do solo. Assim, o objetivo deste trabalho centrou-se na avaliação dos efeitos genotóxicos da metafedrona e da cetamina nas minhocas da espécie *Eisenia fetida*, após um período de exposição de 28 dias. Observou-se que a metafedrona induziu efeitos significativos no ADN para a concentração de 2500 µg/kg, enquanto que a cetamina causou danos no ADN para as concentrações de 250 e 2500 µg/kg. Desta forma, concluiu-se que estas duas SPAs são genotóxicas para esta espécie, mas apenas a concentrações elevadas. Mais estudos são necessários de forma a perceber quais as vias metabólicas que podem induzir estes efeitos no ADN, como por exemplo ao nível do stresse oxidativo das minhocas e as consequências que poderá ter ao nível da defesa imunológica e na dinâmica das suas populações.

**Palavras-chave:** Minhocas, genotoxicidade, metafedrona, cetamina, solo.

### ABSTRACT

Metaphedrone and ketamine are two psychoactive substances (PAS) used for recreational purposes that can be detected in terrestrial ecosystems due to soil irrigation with contaminated water, application of sludge from wastewater treatment plants, among others. Despite reaching soils, little is known about the toxic effects that PAS can induce on terrestrial organisms and soil ecology. Thus, the objective of this work was centred on the evaluation of the genotoxic effects of metaphedrone and ketamine on the earthworm *Eisenia fetida*, after an exposure period of 28 days. It was observed that metaphedrone induced significant DNA effects at the 2500 µg/kg concentration, whereas ketamine caused DNA damage at the 250 and 2500 µg/kg concentrations. Thus, it was concluded that these two PAS are genotoxic for this species, but only at high concentrations. More studies are needed in order to understand which metabolic pathways can induce these effects in DNA, such as the level of oxidative stress in earthworms and the consequences it may have in terms of immune defence and in the dynamics of their populations.

**Keywords:** Earthworms, genotoxicity, metaphedrone, ketamine, soil.

## INTRODUÇÃO

As substâncias psicoativas (SPAs) são bastante consumidas em todo mundo sendo consideradas contaminantes de preocupação emergente (Ramírez-Malule *et al.*, 2020). As SPAs e seus metabólitos têm sido detetados nos ecossistemas aquáticos e terrestres devido principalmente ao consumo humano e posterior excreção via urina (entrada nas estações de tratamento de águas residuais), mas também devido ao descarte inadequado pelos fabricantes/produtores ilegais (Cunha *et al.*, 2019; Santana-Viera *et al.*, 2023). Apesar das concentrações de SPAs no solo serem baixas, as suas propriedades biológicas e a mistura com outros compostos podem representar um risco relevante para os organismos que vivem no solo. Por outro lado, também podem ter impacto na saúde humana visto que as SPAs e fármacos apresentam efeitos biológicos mesmo em concentrações muito baixas e podem ser encontradas nos produtos alimentares provenientes de solos contaminados (Gworek *et al.*, 2021).

A metafedrona (3-MMC) e a cetamina são SPAs utilizadas para fins recreativos devido aos seus efeitos psicoestimulantes. Estes contaminantes são introduzidos nos solos agrícolas através da irrigação com águas contaminadas ou a aplicação de lamas provenientes das estações de tratamento de águas residuais, entre outros (Subedi & Kannan, 2015), podendo causar efeitos nos organismos edáficos (Yücel, 2022). Estas duas SPAs têm sido quantificadas nas águas residuais em concentrações que podem chegar às 972 µg/L (Mwenesongole *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014).

Apesar da grande preocupação com os efeitos das SPAs na saúde humana, pouca atenção tem sido dada aos seus efeitos toxicológicos nos organismos terrestres e cadeias alimentares. Neste estudo, a minhoca da espécie *Eisenia fetida* foi utilizada como organismo modelo uma vez que é considerada um bioindicador fundamental na avaliação dos processos e efeitos de contaminação dos solos (OECD, 1984). Assim, este trabalho teve como principal objetivo a avaliação dos efeitos genotóxicos da metafedrona e cetamina em *E. fetida*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Ensaio de exposição*

Para a realização do ensaio foi inicialmente preparado o solo artificial de acordo com as recomendações da norma ISO (2012), constituído por areia (0,7 mm, Axton), caulino (MIBAL, Portugal) e turfa (SIRO 100), na proporção de 70, 20 e 10%, respetivamente, com base no peso seco (*ps*). Foi determinada a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) e posteriormente ajustado o valor de humidade para 40% da CMRA. Adicionalmente, o valor de pH inicial do solo artificial foi corrigido para 6,0±0,5 através da adição de CaCO<sub>3</sub> (Labsolve, Portugal).

Para a realização do ensaio de exposição foram pesadas e selecionadas 300 minhocas adultas, com clitelo bem desenvolvido e com biomassa entre 300 e 600 mg. Antes do ensaio de exposição, as minhocas foram colocadas a aclimatizar em solo artificial durante 24 a 48 horas e posteriormente ficaram a depurar.

A metafedrona foi adquirida na LGC Standards GmbH (Wesel, Alemanha), enquanto a cetamina foi adquirida na forma comercial do medicamento NIMATEK®, para uso veterinário.

Os organismos foram expostos a três concentrações de metafedrona e cetamina, nomeadamente: 25, 250 e 2500 µg/kg e um controlo (sem adição de composto) sendo realizadas três réplicas por concentração.

Para o ensaio de exposição, em cada recipiente-teste foram colocadas 500 g de solo (equivalente a *ps*) com a respetiva concentração do composto. Posteriormente, foram colocadas 10 minhocas adultas em cada recipiente e 1g de aveia biológica moída (previamente esterilizada em câmara de luz UV). No fim, os recipientes-teste foram fechados com tampas furadas para permitir as trocas gasosas, mas impedir a saída das minhocas. O ensaio decorreu sob condições laboratoriais constantes de temperatura (20±2 °C), fotoperíodo (16-h luz e 8-h

escuro), intensidade de luz (entre 400 e 800 lux) e arejamento.

A cada 7 dias foi realizado o controle gravimétrico do teor de humidade do solo bem como a alimentação das minhocas. Ao fim de 28 dias de exposição as minhocas foram retiradas dos recipientes-teste para posterior realização da técnica do ensaio cometa para avaliação do dano genético.

### Colheita de células

Para avaliação dos efeitos da metafedrona e cetamina no dano genético das minhocas, foram retirados 3 animais de cada recipiente-teste e submetidos a uma extração de celomócitos com um tampão de extrusão (PBS 95%, EtOH 5%, EDTA 2,5 mg/mL e éter glicérol guaiacol 10 mg/mL) durante 3 minutos. O conteúdo celómico extrudado foi centrifugado (1100 rpm, 3 minutos), o sobrenadante removido e as células foram homogeneizadas em PBS frio (estes passos foram repetidos 3 vezes).

### Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado seguindo o protocolo de Collins *et al.* (2023). Resumidamente, 30  $\mu$ L da extração celular foram suspensos em 300  $\mu$ L de agarose com baixo ponto de fusão e, de seguida foram colocadas 2 gotas (de 70  $\mu$ L cada) numa lâmina pré-revestida com agarose com ponto de fusão normal. Depois foi colocada uma lamela de vidro (18 x 18 mm) sobre cada gota para espalhar a mistura. Para cada organismo foram preparadas 2 lâminas. Após estarem 5 minutos a 4 °C, as lamelas foram removidas e as lâminas colocadas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-base, 1% Triton X-100, pH 10, a 4 °C) durante 1 hora. Posteriormente as lâminas foram incubadas durante 20 minutos em tampão de eletroforese (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH < 13, 4 °C) e 20 minutos em eletroforese a 25 V (0,8 V/cm) e 300 mA. Por fim, foi realizada a neutralização das células em PBS e em água destilada (10 minutos cada) a 4 °C.

Para a visualização dos cometas, cada gel nas lâminas foi corado com 30  $\mu$ L de DAPI, coberto com uma lamela de vidro (22 x 22 mm) e depois

observado no microscópio de fluorescência, Olympus BX41 (Olympus, Inc., Hauppauge, NY, EUA). Para cada lâmina, foram visualizados aleatoriamente 100 cometas e classificados em cinco classes com base na integridade da cabeça e comprimento da cauda (Collins *et al.*, 2008), ou seja, a classe 0 (sem cauda) até a classe 4 (quase todo o ADN presente na cauda). A seguir foi calculado o Índice do Dano Genético (IDG) expresso em Unidades Arbitrárias (UA) usando a seguinte equação:

$$IDG = (n_0 \times 0) + (n_1 \times 1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4)$$

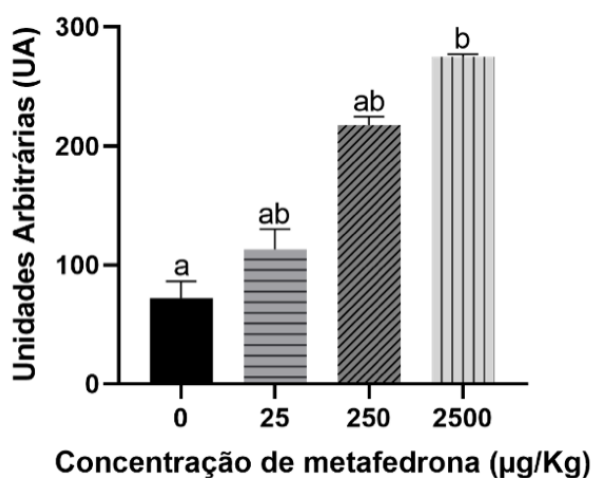
onde  $n$  corresponde ao número de cometas em cada uma das 4 classes. Como resultado, o IDG pode variar entre 0 (todas as células sem dano) e 400 (todas as células com classe de dano 4) UA.

Os resultados foram sujeitos a uma análise de normalidade na distribuição e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respetivamente. Posteriormente, os dados foram sujeitos a uma ANOVA de 1 fator, seguida do teste de comparação de Tukey para um grau de probabilidade de  $p \leq 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

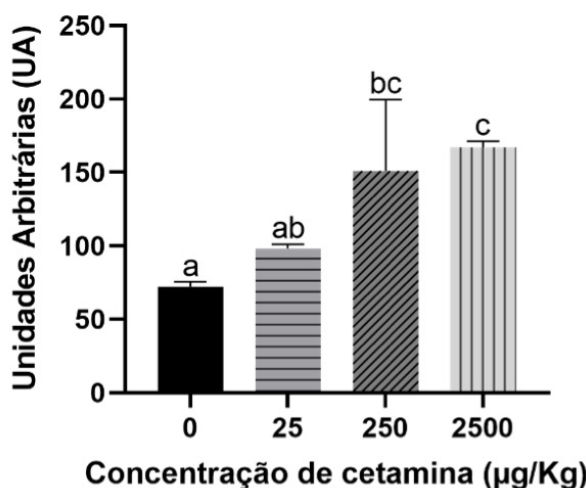
O ADN dos organismos é afetado pelo stresse ambiental, em particular o stresse químico, uma vez que os compostos tóxicos conseguem induzir quebras nas cadeias de ADN. Desta forma, a intensidade das quebras foi proposta como um indicador sensível de genotoxicidade e um biomarcador eficaz na biomonitorização ambiental (Frenzilli *et al.*, 2001; Cant *et al.*, 2022). Nas minhocas os celomócitos são leucócitos circulantes presentes na cavidade celomática os quais desempenham um papel muito importante na defesa imunológica (Khalil, 2016) e são utilizados para avaliar o dano genético.

Os resultados obtidos após exposição das minhocas adultas à metafedrona podem ser observados na Figura 1. Verificou-se que a presença de metafedrona no solo artificial na concentração de 2500  $\mu$ g/kg induziu um aumento do dano genético nos celomócitos de *E. fetida* quando comparado com o grupo controlo ( $p = 0.0134$ ).



**Figura 1** - Efeitos da metamfetrona nas células celomócitas de *E. fetida* após uma exposição de 28 dias. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações ( $p < 0,05$ ).

A exposição de minhocas adultas à cetamina também induziu dano genético nos celomócitos (Figura 2). A exposição a 250 e 2500 µg/kg levou a um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ( $p = 0,0176$  e  $0,0062$ , respetivamente).



**Figura 2** - Efeitos da cetamina em células celomócitas de *E. fetida* após uma exposição de 28 dias. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste ensaio com minhocas mostram que a cetamina e a metamfetrona causam genotoxicidade em concentrações elevadas, sendo que a cetamina começa a induzir efeitos na

concentração de 250 µg/kg enquanto que a metamfetrona induz efeitos em concentrações mais elevada, 2500 µg/kg. No entanto, para a concentração mais elevada, a metamfetrona induziu mais danos no ADN em comparação com a cetamina (270 para 167 UA, respetivamente).

A diferença entre as duas SPAs pode estar relacionada com as suas estruturas químicas distintas que podem afetar a absorção dos compostos (toxicocinética) através da epiderme da minhoca e/ou a toxicidade do composto (toxicodinâmica).

Os nossos resultados vão ao encontro dos resultados obtidos por Govindarasu (2016), que observou que a exposição de minhocas a metanfetamina (uma SPA) durante 28 dias, levou ao aumento do dano genético nas células celomócitas. Adicionalmente, os antibióticos tetraciclina e clortetraciclina induziram genotoxicidade significativa em minhocas da espécie *E. fetida*, em particular a clortetraciclina (Dong *et al.*, 2012).

Os danos genéticos podem estar diretamente relacionados com o aumento das espécies reativas de oxigénio (ROS) (Reinecke & Reinecke, 2004). De facto, a exposição de metamfetrona e cetamina levou ao aumento dos ROS em organismos vertebrados, como o rato, *Rattus norvegicus* (Réus *et al.*, 2015; Dias da Silva *et al.*, 2019) e peixe-zebra, *Danio rerio* (Félix *et al.*, 2018). No entanto, não foram encontrados estudos que avaliem os efeitos da metamfetrona e cetamina ao nível do stresse oxidativo de minhocas. Assim, torna-se importante avaliar os efeitos que estas SPAs podem vir a induzir nos organismos terrestres de forma a fazer uma avaliação mais precisa do seu potencial risco ambiental.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram que a cetamina induz efeitos a concentrações mais baixas que a metamfetrona, no entanto, à mesma concentração de 2500 µg/kg a metamfetrona causou mais danos no ADN que a cetamina. Os resultados mostraram que as duas SPAs estudadas, metamfetrona e cetamina, podem causar quebras nas cadeias de ADN e desta forma induzir genotoxicidade em minhocas, mas só para as concentrações mais altas estudadas (e que estão muito acima das concentrações

ambientalmente relevantes). Assim, podemos deduzir que estes compostos não vão provocar efeitos negativos nas populações de anelídeos, no entanto temos de considerar a presença simultânea de outros compostos tóxicos (que pode levar a interações diversas como aditividade, sinergismo, antagonismo, potenciação, etc.) e as exposições prolongadas aos tóxicos.

Devido à ausência de estudos sobre os efeitos de SPAs nos organismos terrestres, estes estudos são importantes para uma avaliação do risco ambiental mais rigorosa, em particular de tóxicos mais prevalentes e para exposições mais prolongadas, e perceber melhor o impacto na ecologia e biodiversidade do solo.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, no âmbito do projeto PTDC/CTA-AMB/6686/2020 (ENANTIOTOX) e UIDB/04033/2020 (CITAB/Inov4Agro).

A Ondina Ribeiro agradece à bolsa de investigação no âmbito do projeto PTDC/CTA-AMB/6686/2020 (ENANTIOTOX).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cant, A.; Bonnard, M.; Porcher, J.-M.; Prygiel, J.; Catteau, A.; Delahaut, L.; Palluel, O.; Turiès, O.; Geffard, A. & Bado-Nilles, A. (2022) - Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). *Toxics*, vol. 10, n. 3, art. 101. <https://doi.org/10.3390/toxics10030101>
- Collins, A.; Møller, P.; Gajski, G.; Vodenková, S.; Abdulwahed, A.; Anderson, D.; Bankoglu, E.E.; Bonassi, S.; Boulet-Robinet, E. & Brunborg, G. (2023) - Measuring DNA modifications with the comet assay: A compendium of protocols. *Nature Protocols*, vol. 18, p. 929-989. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Collins, A.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C. & Štětina, R. (2008) - The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, vol. 23, n. 3, p. 143-151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Cunha, D.L.; Mendes, M.P. & Marques, M. (2019) - Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, p. 78-90. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3556-z>
- Dias da Silva, D.; Ferreira, B.; Roque Bravo, R.; Rebelo, R.; Duarte de Almeida, T.; Valente, M.J.; Silva, J.P.; Carvalho, F.; Bastos, M.d.L. & Carmo, H. (2019) - The new psychoactive substance 3-methylmethcathinone (3-MMC or metaphedrone) induces oxidative stress, apoptosis, and autophagy in primary rat hepatocytes at human-relevant concentrations. *Archives of Toxicology*, vol. 93, n. 9, p. 2617-2634. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02539-x>
- Dong, L.; Gao, J.; Xie, X. & Zhou, Q. (2012) - DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, vol. 89, n. 1, p. 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.010>
- Félix, L.M.; Vidal, A.M.; Serafim, C.; Valentim, A.M.; Antunes, L.M.; Monteiro, S.M.; Matos, M. & Coimbra, A.M. (2018) - Ketamine induction of p53-dependent apoptosis and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, vol. 201, p. 730-739. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.049>
- Frenzilli, G.; Nigro, M.; Scarcelli, V.; Gorbi, S. & Regoli, F. (2001) - DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology*, vol. 53, n. 1, p. 19-32. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00159-4)
- Govindarasu, P. (2016) - *Illicit drugs: environmental occurrence, fate and toxicity*. Newcastle. University of Newcastle, Faculty of Science & Information Technology, Global Centre for Environmental Remediation, University of Newcastle Research Higher Degree Thesis.



- Gworek, B.; Kijeńska, M.; Wrzosek, J. & Graniewska, M. (2021) - Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 232, n. 4, art. 145.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>
- ISO (2012) - *International Standardization Organization - 11268-2. Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms - Part 2: Determination of Effects on Reproduction of Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Genève, Switzerland.
- Khalil, A.M. (2016) - Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, vol. 74, p. 8-15.  
<https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.12.004>
- Lin, A.Y.-C.; Lee, W.-N. & Wang, X.-H. (2014) - Ketamine and the metabolite norketamine: persistence and phototransformation toxicity in hospital wastewater and surface water. *Water Research*, vol. 53, p. 351-360.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.022>
- Mwenesongole, E.M.; Gautam, L.; Hall, S.W.; Waterhouse, J.W. & Cole, M.D. (2013) - Simultaneous detection of controlled substances in waste water. *Analytical Methods*, vol. 5, n. 13, p. 3248-3254.
- OECD (1984) - *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- Ramírez-Malule, H.; Quinones-Murillo, D.H. & Manotas-Duque, D. (2020) - Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. *Emerging Contaminants*, vol. 6, p. 179-193.  
<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.05.001>
- Reinecke, S. & Reinecke, A. (2004) - The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 46, p. 208-215.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-003-2253-0>
- Réus, G.Z.; Carlessi, A.S.; Titus, S.E.; Abelaira, H.M.; Ignacio, Z.M.; da Luz, J.R.; Matias, B.I.; Bruchchen, L.; Florentino, D. & Vieira, A. (2015) - A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Developmental Neurobiology*, vol. 75, n. 11, p. 1268-1281. <https://doi.org/10.1002/dneu.22283>
- Santana-Viera, S.; Pintado-Herrera, M.G.; Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J.J. (2023) - Analysis of psychoactive substances and metabolites in sludges, soils, sediments and biota: a review. *Environmental Chemistry Letters*, vol. 21, p. 2311-2335. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01586-2>
- Subedi, B. & Kannan, K. (2015) - Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Science of the Total Environment*, vol. 514, p. 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.098>
- Yücel, D. (2022) - Ketamine induces apical extracellular matrix modifications in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, vol. 12, n. 1, art. 22122. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24632-5>