

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE - UniRV
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA E BACHARELADO

**ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS EM ANUROS COLETADOS EM
AGROSSISTEMAS E UNIDADE DE CONSERVAÇÃO**

PATRICIA REZENDE BERNARDES

ORIENTADOR: PROF. Me. RINNEU ELIAS BORGES

Artigo de Trabalho apresentado à
Faculdade de Biologia e Química da
UniRV- Universidade de Rio Verde,
como parte das exigências para a
obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

RIO VERDE – GOIÁS

2017

Alterações eritrocitárias em anuros coletados em agrossistemas e unidade de conservação

Bernardes, P. R. ¹; Borges, R. E. ²

Os anuros são considerados bioindicadores devido a sua alta sensibilidade a alterações ambientais. O teste de micronúcleo é um dos biomarcadores mais utilizados por ser de baixo custo e de fácil aplicação, ele avalia o efeito do dano genético tanto em humanos. O objetivo deste estudo foi analisar alterações eritrocitárias em exemplares do referido grupo, comparando área com intenso uso de agrotóxicos e unidade de conservação. Foram analisados 32 indivíduos de 4 espécies (8 *Dendropsophus minutus*, 8 *Leptodactylus fuscus*, 8 *Boana albopunctata* e 8 *Physalaemus cuvieri*). A análise da frequência de micronúcleos e demais alterações nucleares foram determinadas em 1000 eritrócitos para cada indivíduo, com auxílio de Microscópio óptico (objetiva de 100x). Não houve diferença significativa entre a frequência de MNs para os ambientes, mas para células com broto nuclear foi detectado diferença estatística para duas espécies de área agrícola, em estudo complementar, pode ser notada a diferença de anormalidades entre os diferentes ambientes.

Palavras-chave: bioindicadores, ecotoxicologia, micronúcleo, brotos nucleares.

¹ Acadêmico do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde - UniRV.

² Professor Mestre da Faculdade de Biologia da Universidade de Rio Verde – UniRV
rinneu@unirv.edu.br

INTRODUÇÃO

Atualmente são descritas cerca 7638 espécies de anfíbios, divididos em três ordens, Anura (6726), Gymnophiona (205) e Caudata (707) (FROST, 2017), sendo que aproximadamente 32% destas estão em perigo de extinção e 43% em risco (Stuart et al., 2004). No Brasil são conhecidas 1039 espécies de anuros (SBH, 2016) e, segundo a ICMBio (2014), cerca de 41 espécies estão ameaçadas.

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil em extensão e um dos 34 *hotspots* mundiais, devido ao grande número de endemismo e alto grau de degradação do bioma (MITTERMEIER et al. 2004). Nele são conhecidas 209 espécies de anuros, sendo que 108 são endêmicas (VALDUJO, 2012).

Os anuros, em especial, cumprem múltiplos papéis nos ecossistemas e são os vertebrados dominantes em zonas úmidas, e de fato, são efetivos controladores de insetos, além de serem de elevada importância devido a dinâmica trófica em muitas comunidades na função de presa e também predador (BLAUSTEIN et al., 1994; URQUIZZA e CAREZZANO, 2013). Da Silva (2013) e Oliveira (2016) enfatizaram que mesmo sendo organismos de suma importância, vem ocorrendo declínios de populações e desaparecimento de algumas espécies em âmbito mundial. O declínio populacional dos anfíbios, segundo Lavilla (2001), Klink e Machado (2005) está relacionado às ações antrópicas, o qual tem modificado os diversos ecossistemas naturais, levando a diminuição ou extinção das espécies e dentre essas ações podem ser citadas o aumento da radiação ultravioleta, introdução de espécies exóticas, alterações climáticas, e principalmente o uso indiscriminado dos agroquímicos.

Os agrotóxicos foram desenvolvidos para que sua formulação química seja direcionada, ou seja, seletivo à determinados tipos de insetos, animais, plantas ou fungos; entretanto, organismos não alvo podem sofrer danos devido a facilidade de dispersão do produto no ambiente (VEIGA et al., 2006). Os praguicidas, mesmo que em baixa concentração, podem vir a afetar a estrutura e função das comunidades em diferentes níveis, que podem ser de nível molecular, até mesmo a comunidades inteiras, isso mostra que o intensivo uso destes compostos, podem ser de grande impacto, levando diretamente a redução da biodiversidade (GRISOLIA, 2005). O Brasil é o maior consumidor de biocidas na América Latina, sendo o valor estimado, em torno de 50% do total (GARCIA, 1997), e ainda segundo a FAO (2005), fica em

quarto lugar como consumidor mundial. Através da ação das chuvas, por lixiviação, ou até mesmo aplicações intencionais esses compostos podem contaminar os sistemas aquáticos. Há também o risco de atingir lençóis freáticos através da disseminação pelo solo, e ser encontrado na atmosfera, pelo processo de volatilização (Da SILVA et al., 2007).

A ecotoxicologia tem contribuído para a compreensão entre a interação de substâncias naturais ou sintéticas em organismos vivos e o meio em que vivem. Para avaliação do potencial risco ambiental de substâncias contaminantes são realizados os testes de toxicidade, visto que apenas análises químicas não são suficientes para determinar se há ou haverá dano ambiental (COSTA, 2008).

Para avaliar o risco de populações naturais a exposição de diferentes agentes xenobióticos são utilizados biomarcadores (HOFFMAN et al., 2003). A escolha do biomarcador irá depender da finalidade do estudo e do tipo de exposição química dos organismos avaliados e independente da sua aplicação eles podem ser classificados como biomarcadores de exposição, efeito ou de suscetibilidade. (WHO, 1991). O teste de micronúcleo é um dos biomarcadores mais utilizados por ser de baixo custo e de fácil aplicação, ele avalia o efeito do dano genético tanto em humanos (LUCERO et al., 2000) como em plantas e animais (ARSLAN et al., 2009). Os micronúcleos são pequenos corpos que se formam durante a mitose por fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que não se incorporam no núcleo durante a divisão celular (AIASSA et al., 2009). O teste ajuda na detecção de mutações cromossômicas, como defeitos no fuso celular e outros componentes envolvidos na formação do fuso (ALBERTINI et al., 2001). Este ensaio vem sendo amplamente usado em biomonitoramentos para avaliação de organismos aquáticos a substâncias genotóxicas, que podem influenciar na alteração do DNA, visto que algumas dessas alterações podem ser hereditárias (FREIRE et al., 2008).

Por conta da permeabilidade de sua pele e seu ciclo de vida duplo, os anuros podem ser considerados como bons indicadores de qualidade ambiental, pois tem contato direto com agentes xenobióticos que podem alterar o meio em que vivem (BLAUSTEIN et al., 2002). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi analisar alterações eritrocitárias em anuros adultos, comparando área com intenso uso de agrotóxicos e unidade de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram coletados em dois locais: Parque Nacional das Emas e Município de Rio Verde, GO. O Parque Nacional das Emas localiza-se no Sudoeste do Estado de Goiás. Com uma área de 132.000 hectares, abrange os municípios de Mineiros, estado de Goiás e Costa Rica (Mato Grosso do Sul). A vegetação é composta por diferentes fitofisionomias de cerrado, como campo sujo, campo limpo, veredas e matas ciliares (ICMBIO, 2017). Já o município de Rio Verde, tem como principal vegetação, o cultivo de monocultura (soja e milho) e alguns fragmentos florestais.

As coletas foram realizadas durante a estação chuvosa, entre novembro de 2016 a março de 2017. Os anuros, quatro espécies (8 *Dendropsophus minutus*, 8 *Leptodactylus fuscus*, 8 *Boana albopunctata* e 8 *Physalaemus cuvieri*) foram coletados por intermédio de busca ativa por sítio de vocalização com auxílio de lanterna, acondicionados em sacos plásticos e levados ao laboratório, onde foram anestesiados a solução de benzocaina 5%, e amostras do tecido sanguíneo foram obtidas através de punção cardíaca. Foram feitos um esfregaço sanguíneo por indivíduo, totalizando 32 amostras.

As lâminas, depois de secas, foram fixadas em metanol por 3 minutos, e secas ao ar livre por um período de no mínimo 12 horas. Após esta secagem as lâminas foram fixadas por imersão em etanol absoluto por 20 minutos e armazenadas para posteriormente serem coradas e analisadas. As lâminas foram coradas com Giemsa a 10% por 20 minutos ao abrigo da luz. Após esse prazo, as lâminas foram lavadas e deixadas para secar ao ar livre, para em seguida, realizar as análises.

A frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares foram determinadas em 1000 eritrócitos para cada indivíduo com a objetiva de 100X. A partir da análise das lâminas, foram observadas as seguintes alterações eritrocitárias: núcleos segmentados, células binucleadas, núcleos reniformes, micronúcleos, anucleadas, bilobuladas, broto nuclear e apoptose. A documentação fotográfica foi feita com câmera SONY CYBER-SHOT DCS- W690 16.1 MP C/ ZOOM ÓPTICO que foi acoplada ao microscópio óptico de luz. Foi feita análise estatística através da Anova fatorial pelo software Statistica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre a frequência de MNs para os ambientes, mas para células com broto nuclear foi detectada diferença estatística ($F_{3,24}=4,47$, $p=0,01$) para duas espécies de área agrícola (*Physalaemus cuvieri* e *Boana albopunctata*) (Gráfico 1). O broto nuclear ou botão nuclear, assim como o MN, também é considerado um marcador de dano genômico, porém ainda não está explicado como ocorre sua formação, a amplificação gênica ou falha no sistema de reparo do DNA são algumas das possíveis causas (Fenechi et al., 2002).

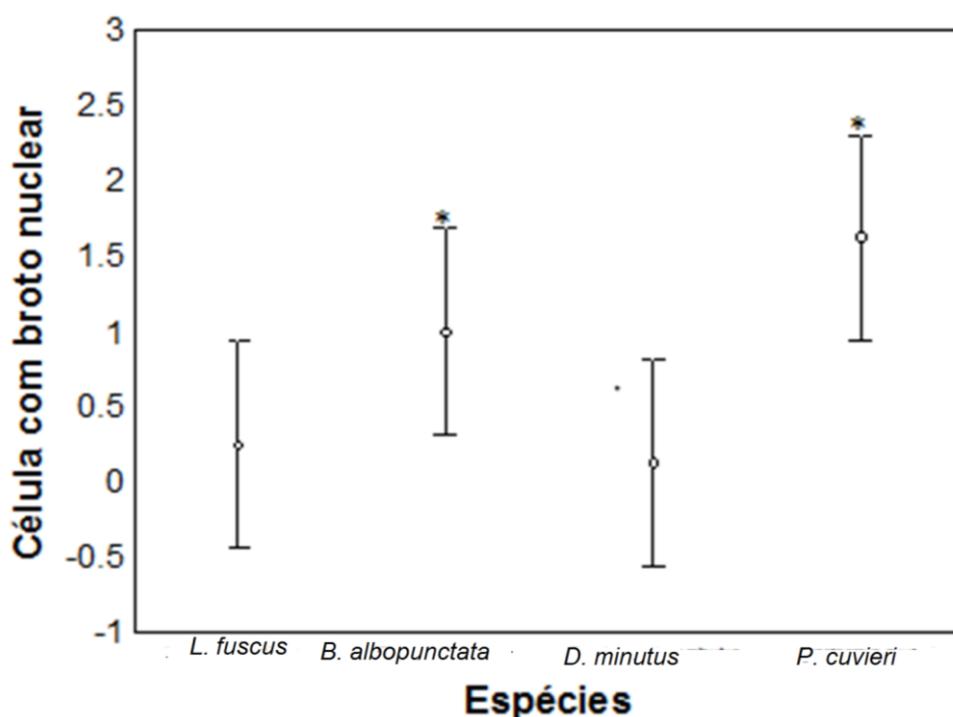


Gráfico 1. Espécies de área agrícola apresentam maior frequência de célula com broto.

Uma análise complementar foi executada com a soma de todas as AENs (Figura 1) incluindo MN, e uma diferença significativa foi observada entre os ambientes ($F_{1,24}=7,07$, $p=0,01$) com aumento de duas vezes mais danos das AENs em anuros proveniente de ambiente agrícola (média±desvio padrão $6,19\pm 4,04$) em comparação o ambiente preservado ($2,88\pm 2,90$) (Gráfico 2).

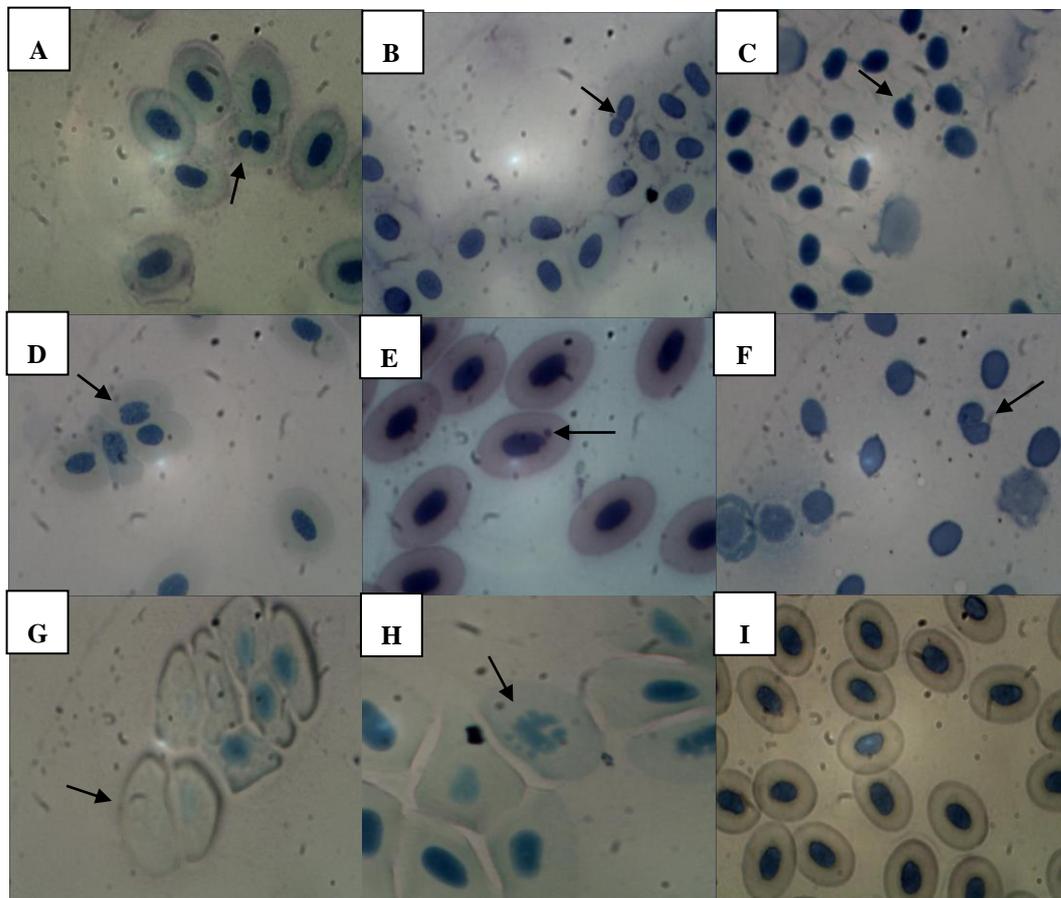


Figura 1. Alterações eritrocitárias encontradas em objetiva de 100X. A- Célula binucleada; B- célula bilobulada; C- broto nuclear; D- núcleo segmentado; E- micronucleo; F- célula reniforme; G- célula anucleada; H- Apoptose; I- células normais.

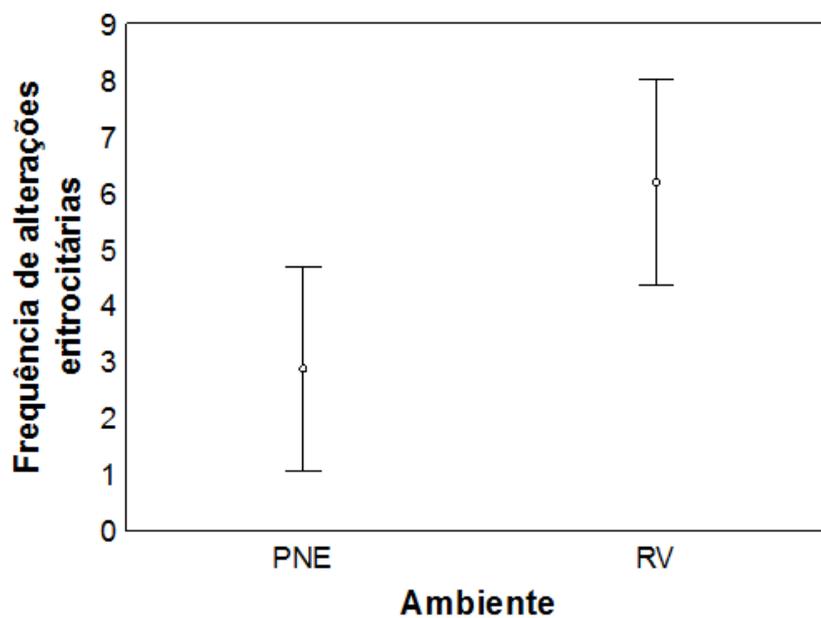


Gráfico 2. Frequência de alterações eritrocitárias de acordo com o ambiente. Parque Nacional das Emas – PNE (Área Preservada) e Rio Verde Goiás – RV (Área Agrícola).

A análise dos micronúcleos não mostrou diferença significativa entre os animais de ecossistema natural e os de ecossistema antrópico, resultado semelhante foi encontrado por Rodrigues et al. (2009), onde realizaram uma comparação entre os espécimes de *Rhinella schneideri* encontrados em área de conservação e área de agricultura, mas não encontrou diferença significativa nas alterações eritrocitárias, assim como Cabagna et al., (2011) realizou pesquisa em área de conservação com a espécie *Rhinella fernandezae*, a qual não resultou em alterações nucleares significativas.

Entretanto Gonçalves (2015), em amostras de girinos de *Dendropsophus minutus* e *Physalaemus cuvieri* coletadas em áreas de lavouras tiveram maiores danos no DNA se comparados aos animais coletados em áreas naturais livre de atividades de agroecossistemas.

Da mesma forma França-Salgueiro (2013), através de pesquisa de rizicultura, in situ e em laboratório aponta significativo aumento de eritrócitos micronucleados para a espécie *Lithobates catesbeianus*; Moreira et al., (2012), discutem que o elevado índice de malformações encontrados nos espécimes de *Rhinella schneideri* em áreas de alto índice do uso de agrotóxicos é resultado da alteração de DNA comprovado pelo teste de micronúcleo.

E semelhantemente Larramendy et al., (2010) por meio de pesquisas em laboratório com pesticidas mais utilizados nas lavouras de monocultura na Argentina, mostram o aumento no número de micronúcleos em relação ao grupo controle nas larvas de *Rhinella arenarum*.; Pollo et al., (2015) e Caraffa et al., (2013) em estudos de áreas com diferentes graus de degradação também relataram a presença de micronúcleos em *Rhinella arenarum*, nas áreas com maior incidência agrícola.

Ainda foi possível verificar por meio da análise estatística, que não houve diferença significativa entre os animais de mesma espécie, nas diferentes áreas de coleta, porém é possível verificar através do gráfico 1, que a espécie *P. cuvieri*, capturado no ambiente antrópico, mostrou maior quantidade de AENs, levando a acreditar, que seja mais sensível a alterações no ambiente que as outras espécies coletadas.

A espécie *P. Cuvieri* vem sendo utilizada por diversos pesquisadores em testes ecotoxicológicos, por apresentar grande dispersão por todo o país, porém, a maioria destes testes vem sendo realizados em laboratório. Da Silva et., al (2013) por meio de experimentos com o produto comercial Folisuper 600BR, observou que o composto pode induzir danos genotóxicos a espécie. No mesmo sentido Almeida (2014), avaliou

o efeito comportamental e morfológico dos girinos de *P. cuvieri*, com o formulado comercial Roundup Original® e comprovou alta taxa de mortalidade dos mesmos.

Em relação as espécies do Parque Nacional das Emas, também não houve diferença significativa entre as espécies, mostrando até mesmo uma certa linearidade nas anormalidades encontradas entres os organismos estudados.

CONCLUSÃO

Não foram encontradas diferenças significativas na frequência de micronúcleos, porém foram encontradas diferenças significativas na quantidade de alterações entre os diferentes ambientes, sendo que a maior incidência nas anormalidades foi situada nos animais do ambiente antrópico, mostrando assim, que é possível que haja influência de agentes xenobióticos no organismo dos animais coletados.

Ainda foi possível verificar através das análises estatísticas que houve diferença significativa entre espécies em relação a células com broto nuclear.

Em síntese, podemos verificar a possibilidade de *Physalaemus cuvieri* e *Boana albopunctata* serem incluídos como bons modelos para estudo de biomonitoramento ecotoxicológico através de estudos mais aprofundados. Para melhor resultado, deve-se fazer um estudo com quantidade maior de indivíduos por espécie.

REFERÊNCIAS

- AIASSA, Delia et al. Los plaguicidas. Su relación con la salud humana y ambiental en la Provincia de Córdoba. **Exp Med**, v. 28, n. 1, p. 39-44, 2010.
- ALBERTINI, David F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.
- ALMEIDA, Priscilla Rennó. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup Original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (anura, leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (anura, bufonidae). 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2014.
- BLAUSTEIN, Andrew R.; KIESECKER, Joseph M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology letters**, v. 5, n. 4, p. 597-608, 2002.
- BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation biology**, v. 8, n. 1, p. 60-71, 1994.
- CABAGNA ZENKLUSEN, M. C. et al. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. **Revista de Biología Tropical**, v. 59, n. 1, p. 17-28, 2011.
- ARSLAN, Özlem Çakal et al. Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). **Environmental monitoring and assessment**, v. 165, n. 1, p. 55-66, 2010.
- CARAFFA, E. et al. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. **Acta toxicológica argentina**, v. 21, n. 2, p. 78-84, 2013.
- COSTA, C.R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820- 1830, 2008.
- COSTA MOREIRA, J. et al. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, 2012.
- DA SILVA, J. M.; DOS SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, 2007.

DA SILVA, M. R.; DE CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, 2013.

Fenech, M. & Crott, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesisblock micronucleus assay. **Mutat. Res.** 2002;504, 131–136

FREIRE, M. M. et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 347-354, 2009.

FROST, DARREL R. 2017. Amphibian Species of the World: Online Reference. Version 6.0 (09/mai/2017). Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> American Museum of Natural History, New York, USA.

GARCIA, E. G. Pesticide control experiences in Brazil. **Pesticide Safety**, v. 2, n. 5, 1997.

GONÇALVES, M. W Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros. 2015. 63 f. Dissertação (mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. **Brasília: Universidade de Brasília**, 2005.

HOFFMAN, D. J. et al. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. CRC press, 2002.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). Espécies ameaçadas- lista 2014. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies> Acesso em 17/mai/2017

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LARRAMENDY, M. L. et al. Agroquímicos en Argentina: Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales. **BAG. Journal of basic and applied genetics**, v. 21, n. 2, p. 0-0, 2010.

LAVILLA, E. O. Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfíbios argentinos. **Cuadernos de herpetología**, v. 15, 2001.

LUCERO, L. et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal

epithelial cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 464, n. 2, p. 255-262, 2000.

MITTERMEIER, R. A. et al, 2004. **Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Cemex, Mexico City, 392 p.

OLIVEIRA, IAPONIRA SALES DE. Conhecimento ecológico local sobre espécies de anfíbios anuros e biocontrole de insetos pragas em sistemas agrícolas de região semiárida brasileira: subsídios à etnoconservação. 2016.

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Faostat: agriculturaldatabase. <http://apps.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>
Acessado em (11/mai/2017)

POLLO, F. E. et al. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 9, p. 581, 2015.

RODRIGUES, F. A. C. Ecogenotoxicologia dos agrotóxicos: avaliação comparativa entre ecossistema agrícola e área de proteção ambiental. 2009.

SALGUEIRO, FERNANDA MENEZES FRANÇA. **Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

URQUIZA; S. y CAREZZANO; F. 2013. Anfíbios de agroecossistemas de la Pampa del centro de Argentina. **Biocenosis** 27: 57-61

VALDUJO, P. H. et al. Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 2, p. 63-78, 2012.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

WHO, IPCS. Environmental Health Criteria 155, Biomarkers and Risk Assessment: Concept and Principles. **World Health Organization, Geneva**, 1993.