



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Bruno Serra de Lacerda Valverde

**Avaliação do efeito do benzo(α)pireno em anuros: um estudo descrevendo
biomarcadores morfológicos**

São José do Rio Preto
2022

Bruno Serra de Lacerda Valverde

**Avaliação do efeito do benzo(α)pireno em anuros: um estudo descrevendo
biomarcadores morfológicos**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cleoni dos Santos Carvalho

São José do Rio Preto
2022

V215a

Valverde, Bruno Serra de Lacerda

Avaliação do efeito do benzo(a)pireno em anuros: um estudo descrevendo biomarcadores morfológicos / Bruno Serra de Lacerda Valverde. -- São José do Rio Preto, 2022

140 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Classius de Oliveira

Coorientadora: Cleoni dos Santos Carvalho

1. Células pigmentares. 2. Eritrócitos. 3. Estresse oxidativo. 4. Mastócitos. 5. Vias de exposição. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bruno Serra de Lacerda Valverde

**Avaliação do efeito do benzo(α)pireno em anuros: um estudo descrevendo
biomarcadores morfológicos**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Estela Sasso Cerri
UNESP – Câmpus de Araraquara

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta
FATEC – Sorocaba

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi
UNESP – Câmpus de Botucatu

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de agosto de 2022

Dedico essa gota de água a um vasto oceano. Que eles possam ser utilizados da melhor maneira possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carlos e Eliane por simplesmente tudo.

Ao meu orientador Classius de Oliveira, por mais de uma década de orientação e ensinamentos, e pelas boas memórias dentro e fora do Laboratório de Anatomia Comparada.

A minha coorientadora Cleoni S. Carvalho, pelo acolhimento em seu laboratório e pela orientação e ensinamentos durante a execução desse e de outros projetos de pesquisa.

A Heidi S.M. Utsunomiya (UFSCar) e Maysa S. Domingues (UNESP/IBILCE) – técnicas de laboratório – pelo imenso auxílio de vocês, que possibilitou a execução dos meus projetos de pesquisa e pelos momentos divertidos dentro e fora do laboratório.

Aos membros e companheiros do Laboratório de Anatomia Comparada (UNESP/IBILCE): Ariane N. Queiroz, Erick A. Bassi, Gabriel da Cunha Canevari, Lara S. Gregório, Lara Z. Fanali, Lilian F. Belussi, Luciana S. Trevizan e Wadson R. Rezende por tudo o que passamos dentro e fora do laboratório, pelas “pérolas de sabedoria”, pelas comilanças (incluindo o bolo farofa e o bolo de banana), pelos momentos ‘terapêuticos’ e por todos os auxílios nas etapas da minha pesquisa.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (UFSCar): Davi M. Gutierrez, Gabriel H. Fujiwara, Isabela F. Fernandes e João V.C. Ferraz pelo auxílio, ensinamentos e ótimos momentos durante minha estadia em Sorocaba.

A todos os membros (docentes, pós-graduandos e servidores) e companheiros do departamento de Ciências Biológicas, com destaque para: Bruna E. Roman, Damaris S. Martins, Joice M. Biselli, Julcimara V. Pastorelli, Mary M. Itoyama, Natalia Francielle, Samara V. Zorzato pelos bons momentos.

Aos meus amigos Denis B.S.M. Nunes, Hugo R. Nhoato, Kherolaine Ferreira e Natalia Pinheiro, por todos os momentos durante e após o IBILCE, pelos papos-cabeça e conversas aleatórias que sempre temos e pela ajuda nos momentos difíceis. Meu cotidiano seria muito chato sem vocês.

O presente trabalho foi realizado na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – campus de São José do Rio Preto e na Universidade Federal de São Carlos – campus Sorocaba, e teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: 001 – Bruno S.L.V.), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 304552/2019-4 – Classius O.) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2018/01078-7 – Classius O.; 2017/23781-9 – Cleoni S.C.) aos quais agradeço.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

RESUMO

Os anuros possuem características que os tornam vulneráveis a contaminantes presentes no ambiente aquático e terrestre. Dentre esses, destaca-se o benzo(α)pireno (BaP), um hidrocarboneto com propriedades carcinogênicas, que pode ser absorvido por diferentes vias – cutânea, oral ou respiratória – o que pode alterar sua distribuição e metabolismo. Para avaliar o impacto do BaP são utilizados biomarcadores, que consistem em alterações mensuráveis em células/tecidos/órgãos, que fornecem informações sobre a exposição e efeito do composto. Dessa forma, o objetivo dessa tese é avaliar o efeito do BaP sobre diferentes biomarcadores de anuros e avaliar se a via de administração do composto pode influenciar nesses efeitos. Espécimes de *Physalaemus nattereri* (N = 108) foram coletados e divididos em três grupos (via cutânea, injetável e oral) e tempos experimentais (um, três e sete dias). Os espécimes receberam uma única administração (volume de 0,02 ml) de óleo mineral puro (controle) ou de óleo mineral contendo 2 mg/Kg de BaP (tratamento). Ao término dos experimentos foram coletadas amostras de sangue, fígado, pele e testículos para análise dos biomarcadores morfológicos (anormalidades nucleares, pigmentação e mastócitos) e bioquímicos (catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase e peroxidação de lipídios). O BaP alterou a área dos pigmentos melanina (fígado, pele e testículo), hemosiderina e lipofuscina (fígado), a frequência de mastócitos (fígado e pele) e a atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione S-transferase (fígado). Essas alterações foram influenciadas pela via de administração, sendo que o efeito da via foi distinto para cada órgão.

Palavras-chave: Células pigmentares. Eritrócitos. Estresse oxidativo. Mastócitos. Vias de exposição.

ABSTRACT

Anurans have characteristics that make them vulnerable to contaminants present in the aquatic and terrestrial environment. Among these, benzo(α)pyrene (B α P) stands out, as a hydrocarbon with carcinogenic properties, which can be absorbed by different routes - cutaneous, oral, or respiratory - which can change its distribution and metabolism and consequently its effects. To assess the impact of B α P biomarkers are used, which consist of measurable changes in cells/tissues/organs, which provide information on the exposure and effect of the compound. Thus, this thesis aims to evaluate the effect of B α P on different anuran biomarkers and assess whether the route of administration of the compound can influence these effects. Specimens of *Physalaemus nattereri* (N = 108) were collected and divided into three groups (cutaneous, injectable, and oral route) and experimental times (one, three, and seven days). Specimens received a single administration (0.02 ml volume) of pure mineral oil (control) or mineral oil containing 2 mg/kg of B α P (treatment). At the end of the experiments, samples of blood, liver, skin, and testes were collected for analysis of morphological (nuclear abnormalities, pigmentation, and mast cells) and biochemical (catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase, and lipid peroxidation) biomarkers. B α P altered the pigment area melanin (liver, skin, and testis), hemosiderin and lipofuscin (liver), the frequency of mast cells (liver and skin), and the activity of the enzymes superoxide dismutase and glutathione S-transferase (liver). The route of administration influenced these changes, and the effect of the route was different for each organ.

Keywords: Pigment cells. Erythrocytes. Oxidative stress. Mast cells. Exposure routes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fotomicrografias ilustrando as anormalidades nucleares (setas) em eritrócitos. A: anucleada, B: binucleada, C: *bud*, D: micronúcleo. Coloração: Giemsa. Escala: 5 µm 13
- Figura 2 – Fotomicrografias ilustrando os mastócitos (setas) presentes no fígado (A), pele (B) e testículo (C). Coloração: azul de toluidina com bórax. Escala: 5 µm. 14
- Figura 3 – Fotomicrografias ilustrando a melanina (setas) presente nos melanomacrófagos do fígado (A) e nos melanócitos da pele (B) e testículo (C). Coloração: hematoxilina-eosina. Escala 10 µm. 16
- Figura 4 – Fotomicrografias ilustrando a hemosiderina (A) e lipofuscina (B) (setas) presentes nos melanomacrófagos do fígado. Coloração: solução ácida de ferrocianeto de potássio (A), solução de Schmorl (B). Escala 10 µm. 17
- Figura 5 – Esquema da indução do metabolismo do benzo(α)pireno (BαP). AhR: receptor aril-hidrocarboneto. ARNT: translocador nuclear aril-hidrocarboneto. HSP90: proteínas de choque térmico. XRE: elementos de resposta a xenobióticos. Baseado em Hankinson (1995), Miller & Ramos (2001), Ma & Lu (2003), Baird et al. (2005). 20
- Figura 6 – Esquema do metabolismo do benzo(α)pireno (BαP). Baseado em Gelboin (1980), Phillips & Grover (1994), Mitchelmore et al. (1998), Miller & Ramos (2001), Penning (2004), Ramesh et al. (2004), Verma et al. (2012). 21
- Figura 7 – *Physalaemus nattereri* (A) ilustrando as diferentes vias de administração do benzo(α)pireno utilizadas nesse projeto: cutânea (B), injetável subcutânea (C) e oral (D). 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos do benzo(α)pireno em anuros.

23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Indicadores ambientais	11
1.2 Biomarcadores	11
1.2.1 Anormalidades nucleares em eritrócitos	12
1.2.2 Células inflamatórias (mastócitos)	13
1.2.3 Células pigmentares	15
1.2.4 Sistema de defesa antioxidante	17
1.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	18
1.3.1 Benzo(α)pireno	19
1.3.2 Toxicidade do benzo(α)pireno	19
1.3.3 Estudos do benzo(α)pireno em anuros	22
1.4 JUSTIFICATIVA	24
2. OBJETIVO	25
3. RESULTADOS	26
Capítulo 1	27
Capítulo 2	66
Capítulo 3	82
Capítulo 4	98
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. INDICADORES AMBIENTAIS

A classe *Amphibia* (GRAY, 1825) representa o primeiro grupo de vertebrados a explorar com sucesso o ambiente terrestre, enquanto mantinha dependência do ambiente aquático ou de microhabitats úmidos para a reprodução (VITT; CALDWELL, 2014). Atualmente essa classe é constituída por três ordens (8419 sp.): Anura (sapos, rãs e pererecas – 7434 sp.), Caudata (salamandras e tritões – 771 sp.) e Gymnophiona (cecílias – 214 sp.) (FROST, 2021).

Dentre os vertebrados, os anfíbios são os que apresentam um maior número de espécies ameaçadas (IUCN, 2021), sendo seu declínio populacional relacionado à: doenças emergentes, introdução de espécies invasoras, mudanças climáticas, degradação e poluição ambiental (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002; COLLINS; STORFER, 2003; VERDADE et al., 2010). Os anfíbios são particularmente sensíveis a alterações físico-químicas no meio ambiente (VERDADE et al., 2010), devido a características como: ciclo de vida bifásico, ausência de cascas nos ovos, permeabilidade cutânea e baixa dispersão (BLAUSTEIN; WAKE, 1995; BLAUSTEIN; BANCROFT, 2007; VERDADE et al., 2010). Essas características e a sensibilidade a alterações ambientais conferem aos anfíbios o status de indicadores ambientais, podendo ser utilizados como bioindicadores [fornecem informações qualitativas sobre a qualidade do meio ambiente, por meio de sua presença/ausência, comportamento ou fisiologia] e biomonitores [fornecem informações quantitativas sobre o nível de contaminação ambiental, mediante o uso de biomarcadores] (BRODEUR; VERA-CANDIOTI, 2017).

1.2. BIOMARCADORES

Biomarcadores são definidos como uma resposta biológica – restrita a alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas – mensurável em células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo, indicando exposição ou efeito de um xenobiótico (PEAKALL, 1994; PEAKALL; WALKER, 1994; LAM; GRAY, 2003). Os biomarcadores apresentam diferentes tempos de resposta, sendo que as alterações bioquímicas-moleculares ocorrem antes das fisiológicas e histológicas (NASCIMENTO et al., 2006). Diferentes tipos de biomarcadores têm sido utilizados para avaliar a influência de agentes biológicos (ex: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*), físicos (ex:

radiação ultravioleta e hipo/hipertermia) e químicos (ex: agroquímicos, desreguladores endócrinos, hidrocarbonetos e metais), dentre eles: anormalidades nucleares em eritrócitos, células de resposta inflamatória (mastócitos), células pigmentares e o sistema de defesa antioxidante (SANTOS et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; FRANCO-BELUSSI et al., 2016; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016; FANALI et al., 2017, 2018; GREGORIO et al., 2019; FERNANDES et al., 2021; SANTOS et al., 2021).

1.2.1. Anormalidades nucleares em eritrócitos

Os eritrócitos correspondem a um dos três elementos celulares que compõem o sangue dos vertebrados, juntamente com leucócitos e trombócitos (RATCLIFFE; MILLAR, 1988; DUELLMAN; TRUEB, 1994; CLAVER; QUAGLIA, 2009). Anuros, assim como peixes, répteis e aves, possuem eritrócitos nucleados (CLAVER; QUAGLIA, 2009), que permitem caracterizar modificações celulares em resposta a diferentes condições, a partir de alterações em seus núcleos, como as anormalidades nucleares (e.g. micronúcleo, bud, células anucleadas e binucleadas) (Figura 1).

O micronúcleo é uma anormalidade nuclear originada a partir da fragmentação de parte ou de todo um cromossomo durante a divisão celular (FENECH, 2000). Esse fragmento é envolto por uma membrana nuclear e apresenta morfologia similar ao núcleo, exceto por apresentar um menor tamanho (FENECH et al., 2011). O *bud* apresenta a mesma morfologia do micronúcleo, porém encontra-se conectado ao núcleo por uma haste de material nucleoplasmático (FENECH, 2007). As células anucleadas e binucleadas são caracterizadas pela presença, respectivamente, de nenhum e dois núcleos (FENECH, 2007; SANTOS et al., 2021). O micronúcleo, *bud* e células binucleadas são indicativas de efeitos genotóxicos (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, 2005; FENECH, 2007; PALANIKUMAR et al., 2011), enquanto as células anucleadas podem representar uma adaptação, para aumentar a eficiência no transporte de oxigênio, a ambientes poluídos (BARNI et al., 2007).

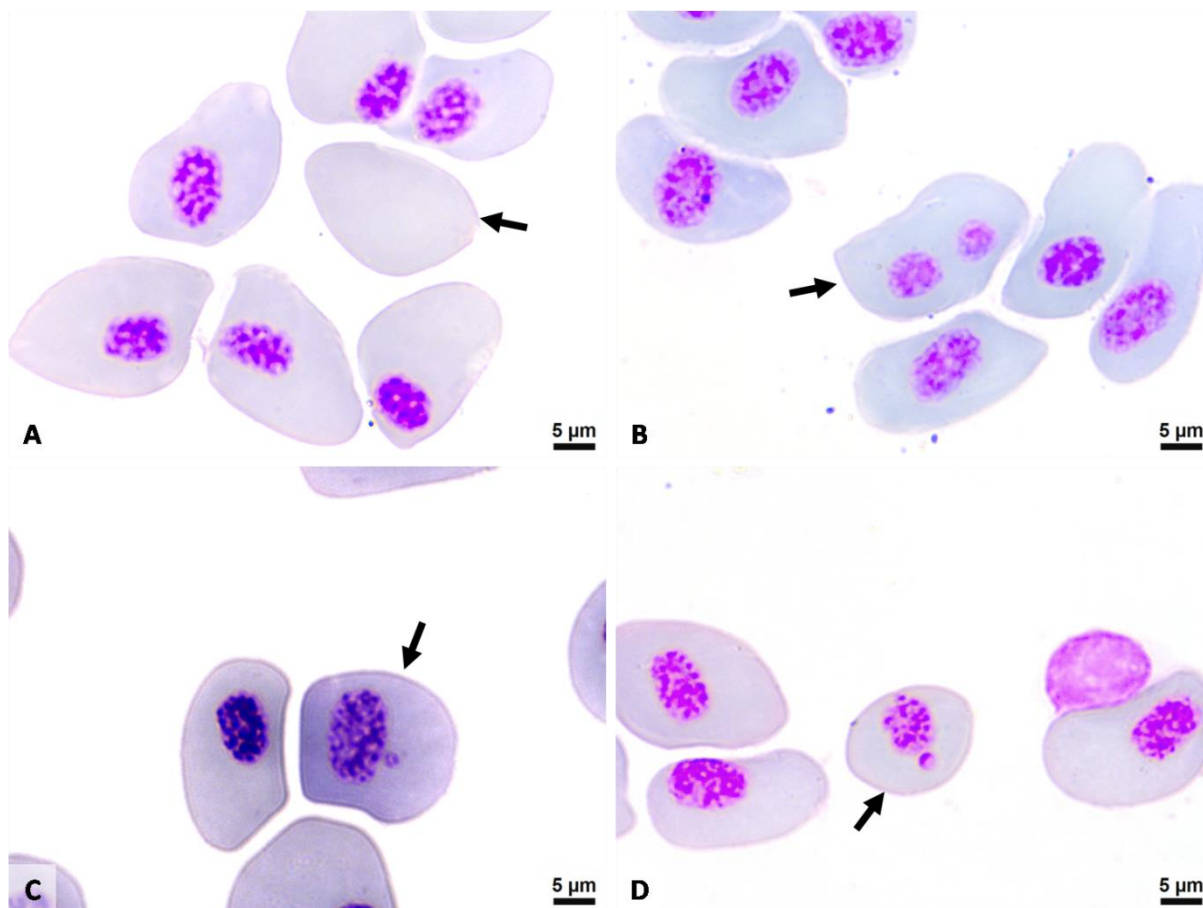


Figura 1 – Fotomicrografias ilustrando as anormalidades nucleares (setas) em eritrócitos. A: anucleada, B: binucleada, C: *bud*, D: micronúcleo. Coloração: Giemsa. Escala: 5 µm. Fonte: o autor.

1.2.2. Células inflamatórias (mastócitos)

O mastócito (Figura 2) compõem o sistema imunológico (PINELLI et al., 2010), estando presente em todas as classes de vertebrados (CHIU; LAGUNOFF, 1972; DI MATTEO et al., 2000; PINELLI et al., 2010; BACCARI et al., 2011), sendo encontrados em todos os órgãos e tecidos vascularizados (BACCARI et al., 2011). Esse tipo celular é originado a partir de células hematopoiéticas (YONG, 1997) e atuam em respostas inflamatórias contra patógenos (GALLI; WERSHIL, 1996), bem como as induzidas por compostos químicos (FANALI et al., 2018).

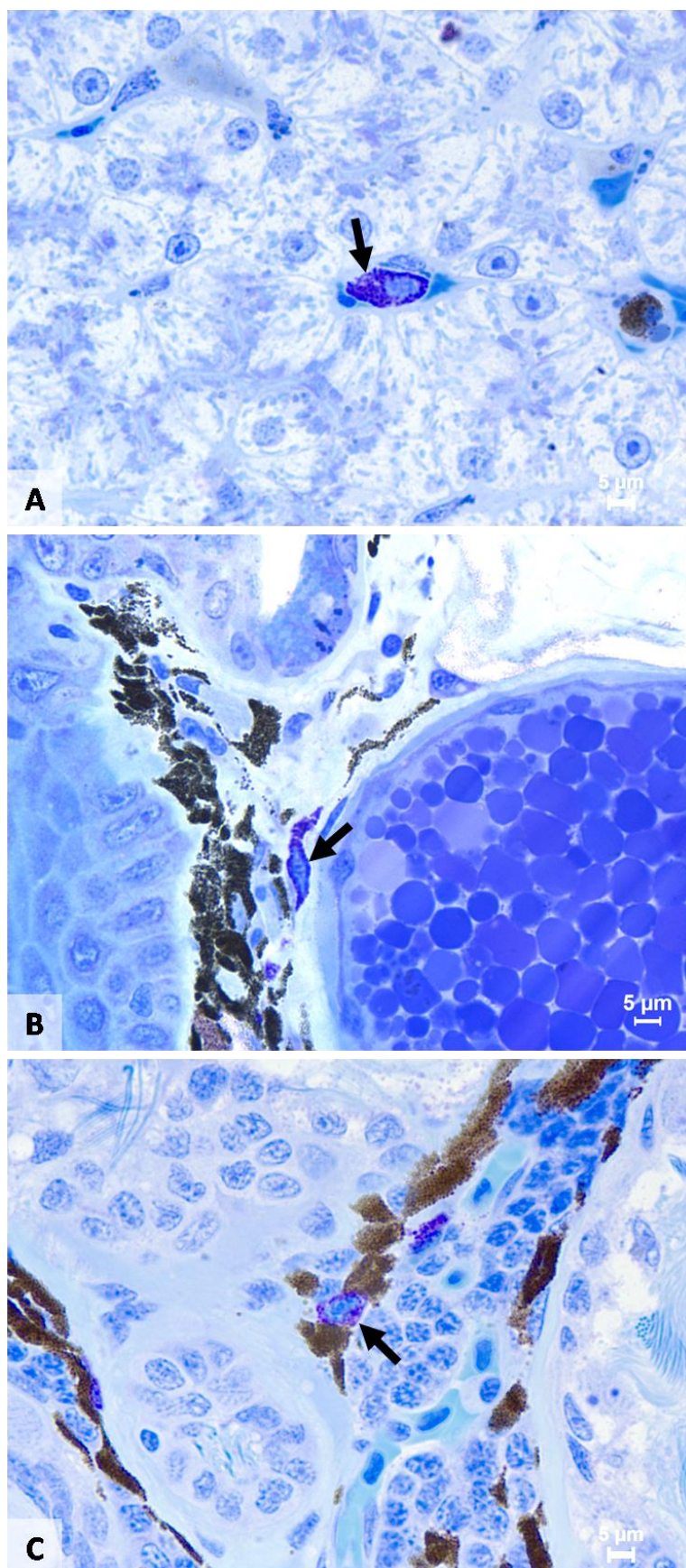


Figura 2 – Fotomicrografias ilustrando os mastócitos (setas) presentes no fígado (A), pele (B) e testículo (C). Coloração: azul de toluidina com bórax. Escala: 5 µm. Fonte: o autor.

1.2.3. Células pigmentares

Células pigmentares podem ser definidas como uma célula capaz de sintetizar/montar um pigmento, sendo ele armazenado em organelas – ligadas à membrana – que lhes confere cor (SCHARTL et al., 2016). Em anuros, duas linhagens celulares são utilizadas como biomarcadores: melanócitos e melanomacrófagos (DE OLIVEIRA et al., 2017), ambas responsáveis por sintetizar melanina (PURRELLO et al., 2001; SCHARTL et al., 2016) (Figura 3).

Os melanócitos são derivados de precursores – melanoblastos – da crista neural ectodérmica (SICHEL et al., 1997; COLOMBO et al., 2011; SCHARTL et al., 2016), sendo encontrados em diferentes órgãos e tecidos, como: coração, gônadas, intestino, meninges, pele, peritônio, pulmões e rins (BAGNARA; MATSUMOTO, 2006; MORESCO; OLIVEIRA, 2009; FRANCO-BELUSSI et al., 2011). Os melanomacrófagos, por sua vez, são derivados de células-tronco hematopoiéticas (SICHEL et al., 1997) e são encontrados em órgãos hematopoiéticos como o baço e o fígado (GALLONE et al., 2002; GUTIERRE et al., 2018). Além da melanina, os melanomacrófagos também armazenam pigmentos resultantes do catabolismo celular, sendo eles a hemosiderina (derivada da quebra de hemoglobina) e a lipofuscina (produto da degradação de componentes celulares) (AGIUS; AGBEDE, 1984; KRANZ, 1989; AGIUS; ROBERTS, 2003) (Figura 4). Ambas as células possuem função relacionada com a melanina, que fornece proteção contra a radiação ultravioleta e patógenos externos, além de absorver e neutralizar radicais livres e substâncias tóxicas (WOLKE et al., 1985; SICHEL, 1988; ZUASTI et al., 1989; FRANCO-BELUSSI et al., 2018). Os melanomacrófagos apresentam ainda atividade fagocítica e atuam na detoxificação de xenobióticos (AGIUS; AGBEDE, 1984; FENOGLIO et al., 2005; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016; GUTIERRE et al., 2017).

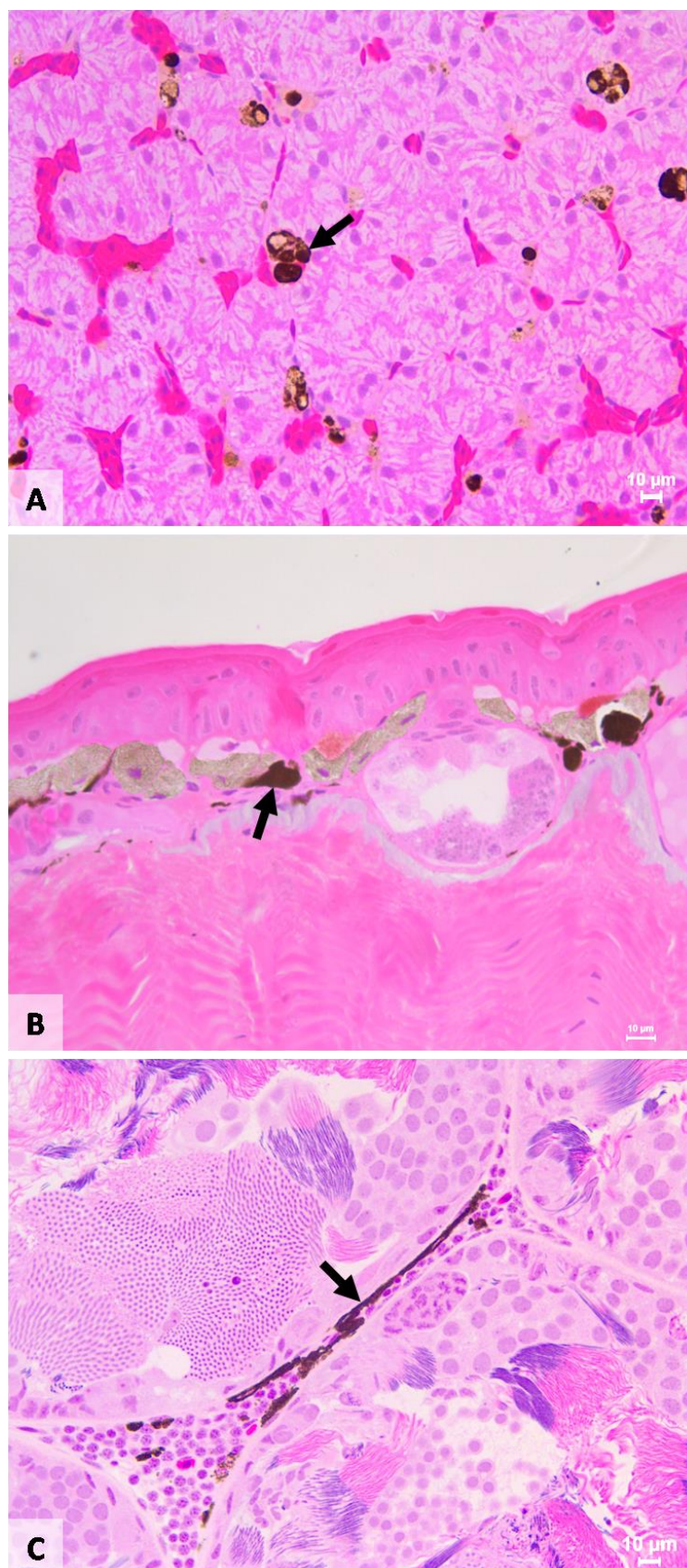


Figura 3 – Fotomicrografias ilustrando a melanina (setas) presente nos melanomacrófagos do fígado (A) e nos melanócitos da pele (B) e testículo (C). Coloração: hematoxilina-eosina. Escala 10 µm. Fonte: o autor.

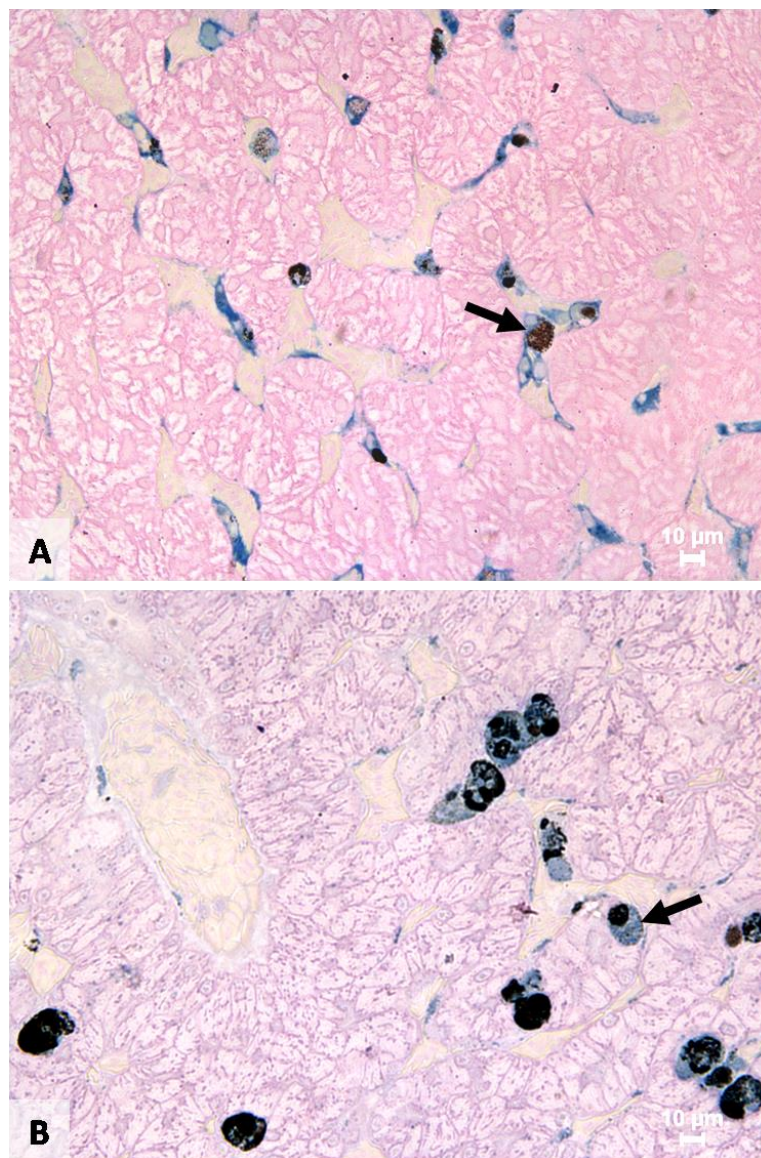


Figura 4 – Fotomicrografias ilustrando a hemosiderina (A) e lipofuscina (B) (setas) presentes nos melanomacrófagos do fígado. Coloração: solução ácida de ferrocianeto de potássio (A), solução de Schmorl (B). Escala 10 µm. Fonte: o autor.

1.2.4. Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante consiste em moléculas antioxidantes responsáveis por minimizar os danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCANDALIOS, 2005; VASCONCELOS et al., 2007). As EROs são geradas naturalmente durante o metabolismo celular (VALKO et al., 2004) e são importantes na regulação de processos fisiológicos e na sinalização celular (SCANDALIOS, 2005; VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, fatores externos (ex: radiação ultravioleta e xenobióticos) podem acelerar a produção de EROs e/ou inibir a atividade das moléculas antioxidantes (VAN DER OOST et al., 2003; SCANDALIOS, 2005), o que leva ao estresse oxidativo e suas consequências para moléculas (ex: DNA, lipídios e proteínas)

– no caso dos lipídios causando peroxidação (LPO) – e para a célula (SCANDALIOS, 2005; BARREIROS et al., 2006).

Para proteger o organismo dos danos oxidativos, componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema antioxidante convertem as EROs em espécies menos reativas/nocivas (SCANDALIOS, 2005). Dentre os componentes enzimáticos há o destaque para a: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2); catalase (CAT), que decompõem o peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio; e glutathione S-transferase (GST) que catalisa reações de conjugação da glutathione (GSH) (STOREY, 1996; OLSEN et al., 2001; VAN DER OOST et al., 2003; SCANDALIOS, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

1.3. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos químicos, caracterizados pela presença de dois ou mais anéis aromáticos condensados (NETTO et al., 2000), arranjados de maneira linear, angular ou em cluster (LI; CHEN, 2002). São formados durante a queima incompleta de matéria orgânica (ATSDR, 1995; IPCS, 1998), sendo originados naturalmente (exemplo: emissões vulcânicas e incêndios florestais) ou decorrente da atividade antrópica (exemplo: exaustão de carros e caminhões, incineração de lixo, queima de combustíveis fósseis e produção de alumínio, ferro e aço) (ATSDR, 1995; IPCS, 1998; LI; CHEN, 2002; MADUREIRA et al., 2014). Os HPAs ocorrem na forma de misturas complexas (ATSDR, 1995), podendo ser encontrados em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) (ATSDR, 1995; NETTO et al., 2000).

Dentre os mais de 100 tipos de HPAs, 17 apresentam um maior destaque, por terem uma maior quantidade de informações disponíveis e por serem, possivelmente, mais danosos do que outros, sendo eles: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(α)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e pireno (ATSDR, 1995). Dentre esses compostos, o benzo(α)pireno (BαP) é o mais conhecido e estudado (CARUSO; ALABURDA, 2008), sendo o composto modelo para estudar a carcinogênese dos HPAs (BRINKMANN et al., 2013) e o único classificado

como agente de grupo 1 – carcinogênico para humanos – pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2013).

1.3.1. Benzo(α)pireno

O BaP ($C_{20}H_{12}$) é um HPA de alta massa molecular (253.3g/mol), constituído por cinco anéis aromáticos (IPCS, 1998; JUHASZ; NAIBU, 2000). Pode ser encontrado em ecossistemas aquáticos (dissolvido em água ou aderido a matéria orgânica) (NASR et al., 2010) e terrestres (ar, solo, plantas) (WILCKE et al., 2003; GUPTA et al., 2011), onde sua concentração pode atingir a ordem de g/Kg em ambientes urbanos ou com atividade industrial (revisado por JUHASZ; NAIBU, 2000). Segundo a CETESB (CETESB nº256/2016) o valor de prevenção (“[...] concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais [...]” - CONAMA nº420/2009) do BaP para solos e águas subterrâneas é de 0.1 (mg/Kg de peso seco), sendo os valores de investigação (“[...] concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizada” - CONAMA nº420/2009) de 0,2 (agrícola), 0,8 (residencial) e 2,7 (industrial) (CETESB nº256/2016).

1.3.2. Toxicidade do benzo(α)pireno

O BaP, assim como todos os HPAs, é lipossolúvel e pode ser absorvido naturalmente por via cutânea, oral ou respiratória (NETTO et al., 2000). O BaP por si só não é tóxico (BRINKMANN et al., 2013), mas ao ser metabolizado são gerados elementos secundários que causam carcinogênese e toxicidade (GELBOIN, 1980). O metabolismo do BaP (Figura 5) é um processo complexo (VERMA et al., 2012) e ocorre obrigatoriamente dentro da célula. Podemos dividir o metabolismo do BaP em duas etapas: I – Indução: onde o BaP induz sua própria biotransformação, pela ativação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) (MADUREIRA et al., 2014), que se encontra no citoplasma, em um complexo com proteínas de choque térmico (HSP90) (MILLER; RAMOS, 2001). A ligação do BaP com o AhR induz sua translocação para o núcleo, onde interage com o Translocador Nuclear Aril-Hidrocarboneto (ARNT) (SHIMIZU et al., 2000; MILLER; RAMOS, 2001; MADUREIRA et al., 2014). O complexo BaP-AhR-ARNT se liga a elementos de resposta a xenobióticos (XRE) no DNA (MA; LU, 2003; TSUJI et al., 2011), ativando genes específicos para enzimas de metabolização

(MADUREIRA et al., 2014). II – Ativação metabólica: onde ocorre a participação de uma ampla variedade de enzimas, como: citocromo P450, epóxido hidrolase, glutathione S-epóxido transferase, UDP-glucuronil transferase e sulfonotransferase (GELBOIN, 1980). Esse metabolismo gera uma grande variedade de compostos secundários (Figura 6), como: fenóis, epóxidos, dióis, quinonas e hidroquinonas (GELBOIN, 1980; MILLER; RAMOS, 2001); incluindo o B α P 7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE), um composto responsável por reagir com o DNA (SIMS et al., 1974). Além disso, também são geradas EROs (SAUNDERS et al., 2006) (Figura 6), como: ânion superóxido, radical hidroxil (OH $\bullet$) e peróxido de hidrogênio (PENNING, 2004), o que contribui com o potencial carcinogênico do B α P e dos HPAs (PENNING et al. 1996).

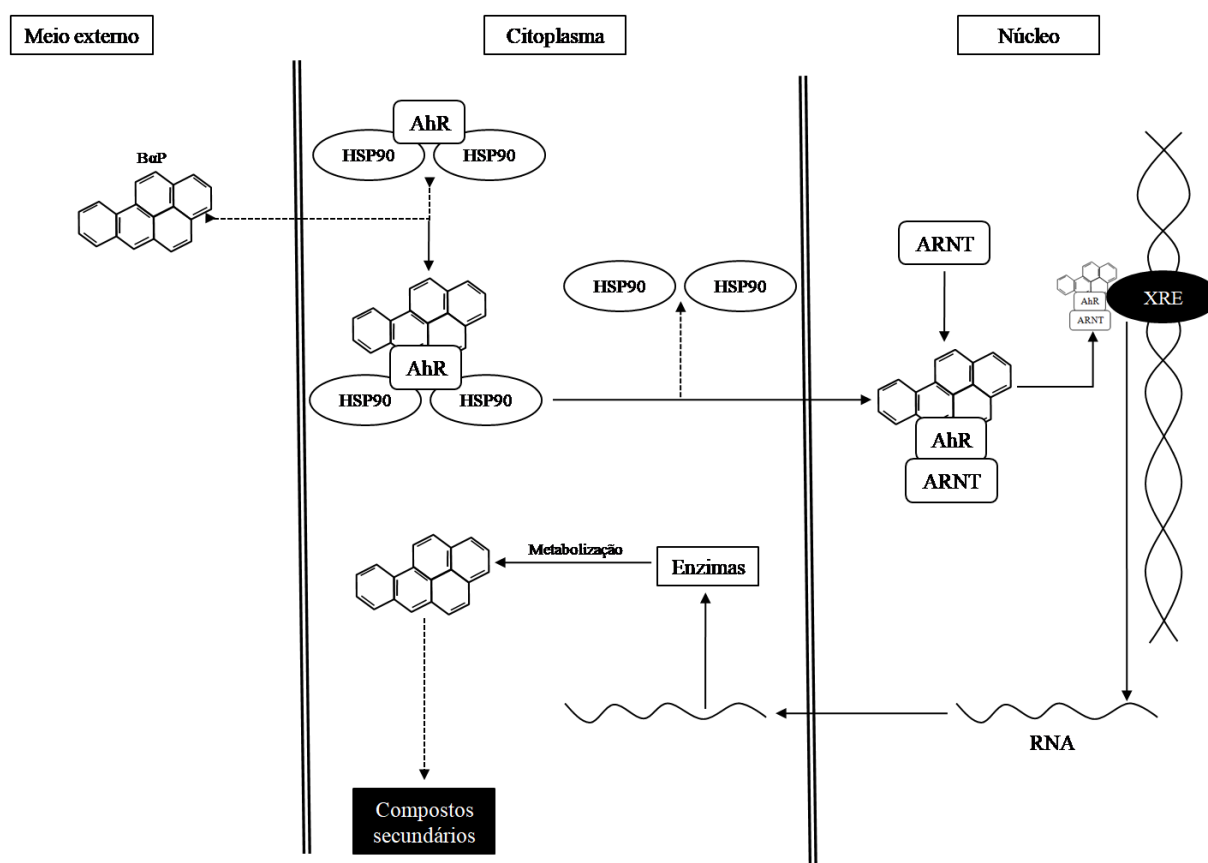


Figura 5 – Esquema da indução do metabolismo do benzo(α)pireno (BaP). AhR: receptor aril-hidrocarboneto. ARNT: translocador nuclear aril-hidrocarboneto. HSP90: proteínas de choque térmico. XRE: elementos de resposta a xenobióticos. Baseado em Hankinson (1995), Miller; Ramos (2001), Ma; Lu (2003), Baird et al. (2005).

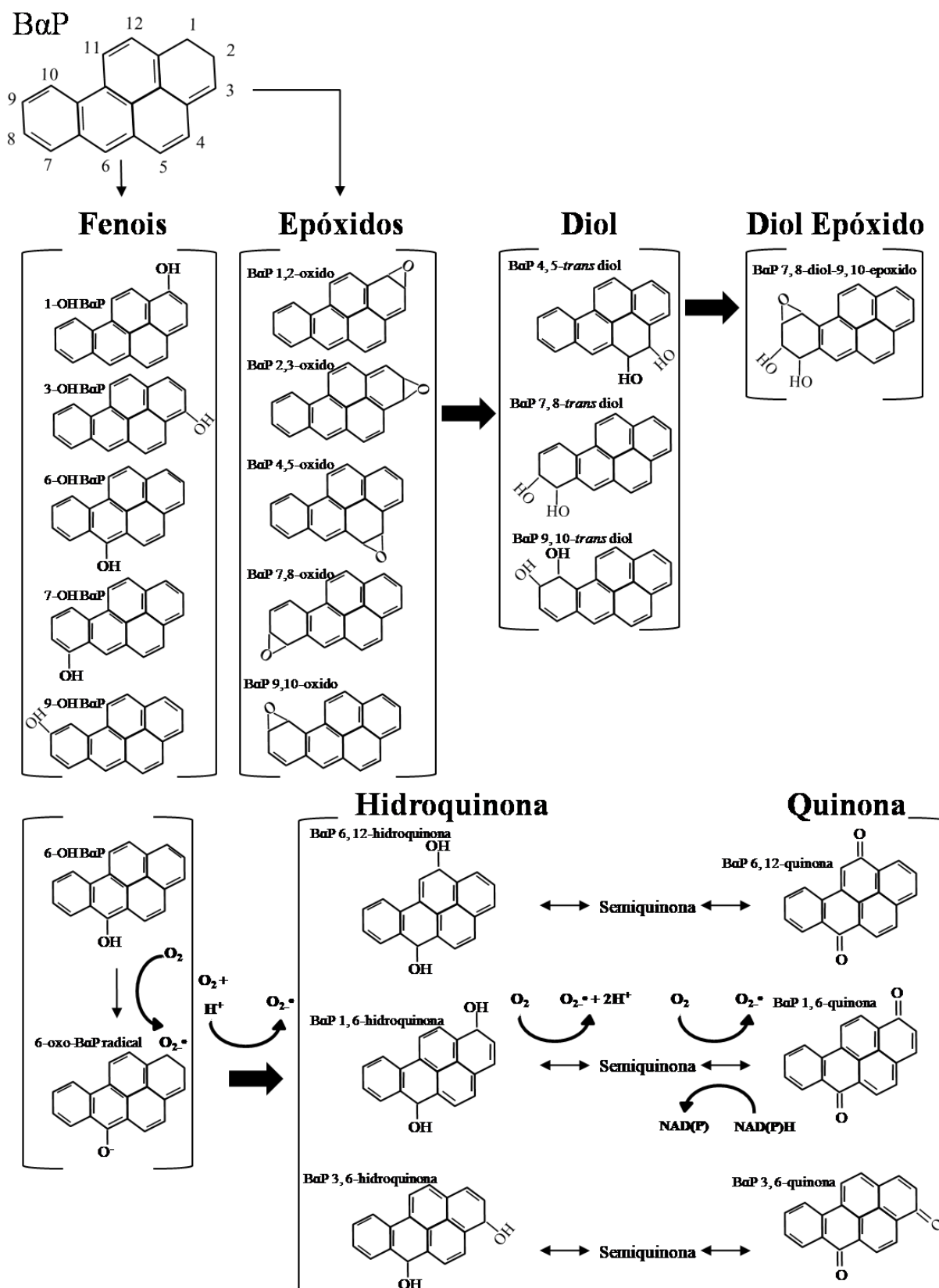


Figura 6 – Esquema do metabolismo do benzo(α)pireno (BaP). Baseado em Gelboin (1980), Phillips; Grover (1994), Mitchelmore et al. (1998), Miller; Ramos (2001), Penning (2004), Ramesh et al. (2004), Verma et al. (2012).

1.3.3. Estudos do benzo(a)pireno em anuros

Desde a década de 80, anuros são utilizados como modelo experimental para avaliar os efeitos do BaP (Tabela 1), que incluem: alterações bioquímicas (COLOMBO et al., 1996, 2003), genéticas (HÖHN-BENTZ et al., 1983; MOUCHET et al., 2005), metabólicas (REGNAULT et al., 2014; 2016) e morfológicas (DE OLIVEIRA et al., 2017; FANALI et al., 2017, 2018). Além dessas alterações, o BaP já foi identificado em anuros nativos (VOJINOVIC-MILORADOV et al., 1996) e seus efeitos adversos podem ser transmitidos entre gerações (USAL et al., 2019, 2021). O detalhamento dos efeitos do BaP nos anuros, bem como em outros anfíbios, será abordado no capítulo 1.

Tabela 1 – Estudos do benzo(α)pireno em anuros.

Tabela 1 – Efeitos do benzo(a)pireno em anuros.						
Espécie		Via	Tempo	Dose	Efeito	Referência
<i>Xenopus laevis</i>	Adulto	Injetável	60-90 min	125µg/g	Danos no DNA.	Höhn-Bentz et al., 1983
<i>Xenopus laevis</i>	Girino	Aquosa	12 dias	0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0ppm	Aumento de micronúcleo em eritrócitos.	Van Hummelen et al., 1989
<i>Xenopus laevis</i>	Girino	Aquosa	0, 2, 4, 8, 12, 14 e 16 dias	31, 62, 124, 248 e 496nM	Danos no DNA, alteração no estágio de desenvolvimento e tempo de metamorfose, aumento de micronúcleo em eritrócitos, diminuição de peso.	Sadinski et al., 1995
<i>Xenopus laevis</i>	Embrião	Aquosa	8 dias	10 e 100µg/L	Indução da CYP1A	Colombo et al., 1996
	Adulto	Injetável	72h	100mg/Kg		
<i>Xenopus laevis</i>	Girino	Aquosa	0, 3, 6, 24, 72 e 144h	0.01, 0.05 e 0.1mg/L	Danos no DNA.	Morse et al., 1996
<i>Bombina variegata</i>	Adulto	–	–	–	Identificação de BaP em anuros nativos	Vojinovic-Miloradov et al., 1996
<i>Rana dalmatina</i>	Adulto	–	–	–		
<i>Rana ridibunda</i>	Adulto	–	–	–		
<i>Xenopus laevis</i>	Adulto	Injetável	72, 120 e 168h	100mg/Kg	Indução da CYP1A	Colombo et al., 2003
<i>Xenopus laevis</i>	Girino	Aquosa	1, 2, 4, 8 e 12 dias	0.125, 1.0, 10mg/L	Genotoxicidade.	Mouchet et al., 2004
<i>Xenopus laevis</i>	Embrião	Aquosa	96h	1.32x10 ⁻⁵ - 13.2µM	Inibição de crescimento.	Saka, 2004
<i>Xenopus laevis</i>	Girino	Aquosa	1, 6 e 9 dias	8.36, 14.64, 89.06 e 309.47µg/L	Aumento da expressão de <i>hsp 70</i> e <i>IL -1β</i> (imunotoxicidade).	Martini et al., 2012
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	Adulto	Aquosa	1, 2, 4, 6 e 8 dias	10µg/L	Aumento de atividade enzimática.	Reynaud et al., 2012
<i>Xenopus tropicalis</i>	Adulto	Aquosa	6, 12, 18, 24h	10µg/L	Alterações no metabolismo hepático, apoptose de hepatócitos, diminuição da melanina hepática.	Regnault et al., 2014
<i>Xenopus tropicalis</i>	Adulto	Aquosa	12, 18, 24h	10µg/L	Alterações no metabolismo hepático, desorganização do tecido hepático.	Regnault et al., 2016
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Adulto	Injetável	72 e 168h	7mg/Kg	Alteração da melanina hepática.	De Oliveira et al., 2017
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Adulto	Injetável	7 e 13 dias	2mg/Kg	Alteração da melanina hepática.	
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Adulto	Injetável	7 e 13 dias	2mg/Kg	Diminuição da melanina hepática e testicular.	
<i>Physalaemus nattereri</i>	Adulto	Injetável	3 dias	3mg/Kg	Diminuição da melanina hepática e testicular.	
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Adulto	Injetável	72 e 168h	3 e 7mg/Kg	Alteração da melanina hepática e da altura do epitélio intestinal.	Fanali et al., 2017
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Adulto	Injetável	1, 7 e 13 dias	2mg/Kg	Aumento de mastócitos, diminuição da melanina hepática, genotoxicidade.	Fanali et al., 2018
<i>Xenopus tropicalis</i>	Girino	Aquosa	12 meses	50ng/L	Alterações no metabolismo hepático, atraso no tempo de metamorfose, desorganização do tecido hepático.	Regnault et al., 2018
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Adulto	Injetável	2 e 7 dias	2mg/Kg	Alteração da melanina hepática, diminuição do índice de fagocitose e de anormalidades em eritrócitos.	Fanali et al., 2021
<i>Xenopus tropicalis</i>	Girino	Aquosa	–	50ng/L	Alterações no metabolismo hepático, atraso no tempo de metamorfose, defeitos reprodutivos.	Usal et al., 2021

Fonte: o autor.

1.4. JUSTIFICATIVA

O BaP esta presente em diferentes ecossistemas (WILCKE et al., 2003; NASR et al., 2010; GUPTA et al., 2011), incluindo ambientes em que os anuros residem (MARQUIS et al., 2009), podendo ser absorvido por diferentes vias, como: alimentação, respiração e/ou absorção cutânea (NETTO et al., 2000). Estudos com mamíferos e peixes demonstraram que diferentes vias de exposição alteram a quantidade de BaP no organismo, seu tempo de meia-vida em órgãos específicos e a taxa de excreção/eliminação de seus metabólitos (LEMAIRE et al., 1990, 1992; MOREAU; BOUCHARD, 2015). A partir dessas informações, torna-se pertinente avaliar se diferentes vias levam a mudanças no efeito do BaP, que pode incluir diferentes respostas biológicas (aumento ou diminuição) ou potencialização/atenuação de um mesmo efeito. Propomos a utilização de três vias de exposição (Figura 7), sendo duas vias que simulam uma exposição natural, via cutânea e oral, e uma via artificial, injetável subcutânea, que é amplamente utilizada em trabalhos experimentais.

Após ser absorvido, o BaP é metabolizado, o que gera compostos secundários com propriedades carcinogênicas (GELBOIN, 1980) e espécies reativas de oxigênio (SAUNDERS et al., 2006) que podem provocar danos a macromoléculas celulares (SCANDALIOS, 2005; BARREIROS et al., 2006). Dessa forma, propomos avaliar um conjunto de enzimas relacionadas à defesa antioxidante (CAT, SOD e GST - fígado), assim como análises bioquímicas que podem indicar danos oxidativos (LPO - fígado). Também iremos avaliar danos genotóxicos por meio da quantificação de anormalidades nucleares em eritrócitos (sangue). Uma das propriedades da melanina é sua afinidade por compostos químicos (LINDQUIST et al., 1987, 1988; LARSSON, 1993), sendo que tecidos contendo melanina apresentam retenção de BaP (ROBERTO et al., 1996), que pode inibir a síntese (JOO et al., 2015) ou alterar a distribuição (FANALI et al., 2021a) do pigmento na célula. Dessa forma, propomos quantificar a área de melanina e a melanina total em diferentes órgãos (fígado, pele e testículo), assim como alterações na coloração dorsal dos espécimes. O BaP modifica a expressão de diferentes genes, alterando processos metabólicos e imunológicos (MARTINI et al., 2012; REGNAULT et al., 2014, 2016, 2018). Para avaliar esses efeitos, iremos quantificar pigmentos originados durante o catabolismo (hemosiderina e lipofuscina - fígado), bem como iremos analisar a frequência de células imunológicas que atuam em processos inflamatórios (mastócitos - fígado, pele e testículo). Todas essas análises possibilitam

avaliar os diferentes efeitos do BaP, especialmente no fígado e na pele, que são órgãos/tecidos diretamente relacionados com as vias de administração do composto.

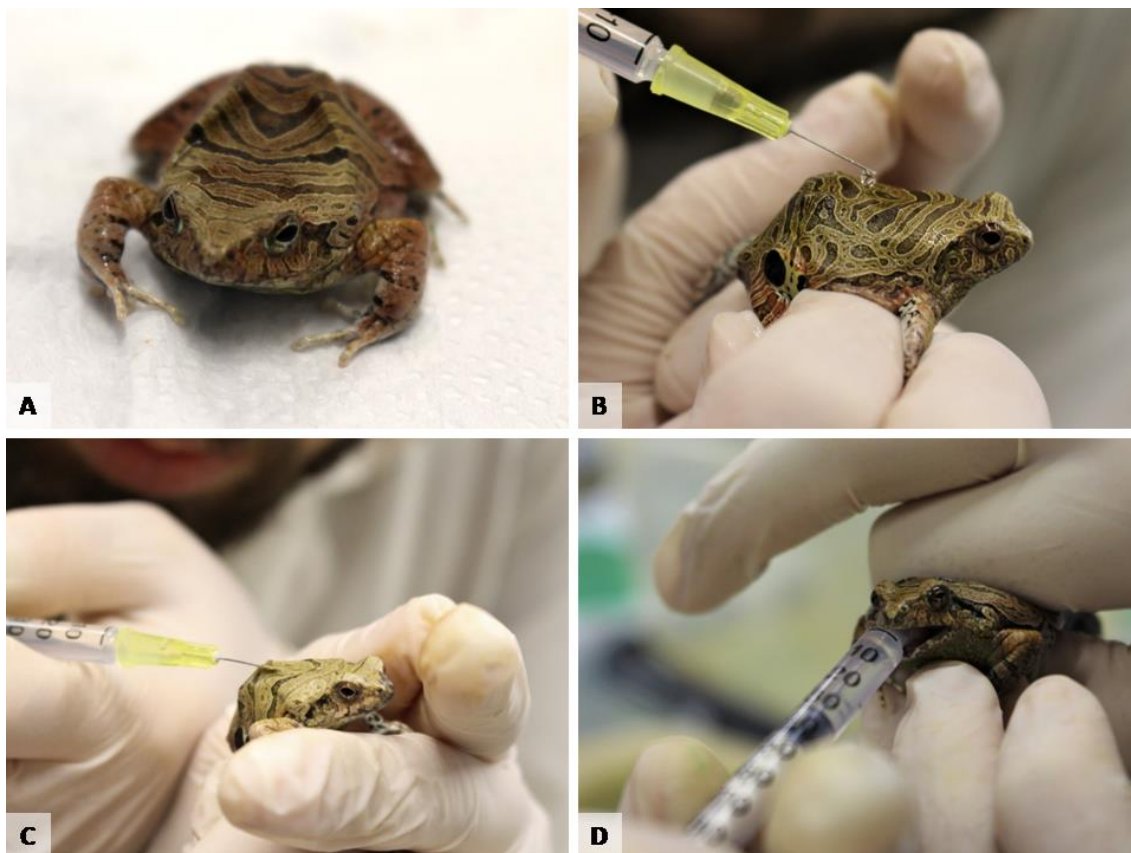


Figura 7 – *Physalaemus nattereri* (A) ilustrando as diferentes vias de administração do benzo(α)pireno utilizadas nesse projeto: cutânea (B), injetável subcutânea (C) e oral (D). Fonte: o autor.

2. OBJETIVO

O objetivo dessa tese é avaliar o efeito do BaP sobre os biomarcadores morfológicos e bioquímicos de *Physalaemus nattereri* (organismo teste – Figura 7A) e se esse efeito é influenciado pela via de administração do composto. Serão utilizadas duas vias que simulam um cenário real de contaminação (cutânea e oral) e uma via de exposição injetável, que assegura a entrada de todo o composto no organismo. Também serão utilizados três tempos de exposição (um, três e sete dias), uma vez que os biomarcadores morfológicos e bioquímicos apresentam diferentes tempos de resposta, além de possibilitar avaliar a influência do tempo sobre os biomarcadores.

3. RESULTADOS

Os resultados dessa tese serão apresentados em capítulos, escritos na forma de artigos científicos. O capítulo 1, “*In vitro* e *in vivo* – uma revisão dos efeitos do benzo(α)pireno nos anfíbio” é destinado a uma revisão bibliográfica dos efeitos do BaP nos anfíbios. O capítulo 2, “Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes”, trata sobre os efeitos do BaP sobre os biomarcadores morfológicos e bioquímicos presentes no fígado. O artigo foi publicado na revista *Ecotoxicology* como “*original research article*”, dessa forma o capítulo será apresentado como uma cópia da versão publicada online, com adição do material suplementar após as referências. O capítulo 3, “Effects of benzo(α)pyrene on *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) skin”, trata sobre os biomarcadores morfológicos presentes na pele. O artigo foi escrito nas normas da revista *Zoology*, dessa forma o capítulo será uma cópia da versão submetida. O capítulo 4, “Respostas dos eritrócitos, melanócitos e mastócitos de *Physalaemus nattereri* (Anura) ao benzo(α)pireno”, trata sobre as análises morfológicas realizadas no sangue e nos testículos. O artigo foi escrito nas normas da revista *Zoology*.

CAPÍTULO 1

***IN VIVO E IN VITRO* – UMA REVISÃO DOS EFEITOS DO BENZO(α)PIRENO NOS ANFÍBIOS**

Bruno Serra de Lacerda Valverde¹, Cleoni dos Santos Carvalho², Classius de Oliveira^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), campus São José do Rio Preto.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba.

³ Departamento de Ciências Biologia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), campus São José do Rio Preto.

RESUMO

Nessa revisão, abordamos os estudos em anfíbios (*in vitro* e *in vivo*) relacionados ao benzo(α)pireno (BaP), um contaminante ambiental da classe do Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Esse composto é encontrado em habitats naturais desses organismos, podendo ser absorvido por meio da alimentação, respiração ou pela pele. A absorção e metabolização do BaP é rápida e gera metabólitos secundários como: dióis, fenóis e quinonas. Após esses processos, alterações anatômicas, fisiológicas e ultraestruturais passam a ocorrer. Seguindo um caminho de efeitos progressivos, as primeiras manifestações são no material genético, o DNA (e.g. adutos, quebras e mutações), que alteram a expressão de genes relacionados ao metabolismo e estruturas celulares. Posteriormente, quadros histopatológicos passam a ser observados, como: alterações pigmentares, desorganização tecidual e infiltração leucocitária, e que se persistentes passam a causar patologias, malformações e tumores. Esses efeitos podendo causar danos permanentes que são transmitidos para gerações posteriores.

Palavras-chave: Anura, Benzo(α)pireno, Bioquímica, Caudata, Fisiologia, Morfologia.

1. INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) representam uma classe de compostos químicos amplamente estudados em vertebrados, invertebrados, microrganismos e plantas (Bukowska et al., 2022; Olker et al., 2022). Dentre os HPAs, o benzo(α)pireno (BaP) é o mais conhecido e estudado (Caruso & Alaburda, 2008), sendo o único da classe classificado como carcinogênico para humanos (IARC, 2013). Os aspectos gerais do BaP, como propriedades físico-químicas, concentração ambiental, metabolização e efeitos adversos são bem descritos na literatura, sobretudo em revisões (Juhász & Naibu, 2000; Verma et al., 2012; Williams et al., 2015; Bukowska et al., 2022). No entanto, não há revisão sobre os efeitos desse contaminante nos anfíbios.

Anfíbios representam excelentes modelos de estudo na toxicologia, além de serem indicadores da qualidade do meio ambiente (Mann & Bidwell, 1999; Burlibaşa & Gavrilă, 2011; Brodeur & Candioti, 2017), sendo que os efeitos nesse grupo podem ser extrapolados para outros organismos, como mamíferos – com destaque para os estudos direcionados ao desenvolvimento embrionário e teratogênese (Bantle et al., 1995). Os anfíbios estão naturalmente expostos ao BaP. Marquis et al. (2009) analisaram sedimentos em habitats de anuros, sendo observadas concentrações na ordem de mg/Kg de sedimento, e mesmo em populações relativamente distantes (7.5 Km) ainda eram observadas concentrações relevantes de BaP (0.032 mg/Kg)¹. Vojinovic-Miloradov et al. (1996) e Wallace et al. (2020) reportaram a presença de BaP em tecidos de espécies nativas em concentrações variáveis de ng/g até µg/g de tecido. A partir disso, torna-se importante compreender os efeitos do BaP sobre os anfíbios.

O objetivo desse trabalho é realizar uma revisão dos estudos envolvendo a exposição de anfíbios ao BaP. Assim, apresentaremos alguns dos aspectos metodológicos utilizados (e.g. espécie modelo, dose, tempo e via de exposição), para demonstrar a variedade dos estudos; e na sequência apresentaremos os efeitos do composto, a partir de um agrupamento lógico, para que possamos demonstrar uma sequência de eventos que se iniciam a partir da absorção e metabolização do composto.

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Para o levantamento de trabalhos relacionados aos efeitos do BaP em anfíbios foram utilizados bancos de dados e plataformas de pesquisa. Inicialmente os artigos foram obtidos do *Ecotoxicology Knowledgebase* (Olker et al., 2022) que conta com um acervo organizado

¹ Colocamos como concentração relevante, pois, apesar de estar de acordo com níveis de segurança estabelecido por órgãos nacionais (Conama, 2009) e estaduais (Cetesb, 2016), veremos adiante o uso de concentrações inferiores que são suficientes para causar efeitos adversos.

em: *Chemicals*, *Species* e *Effects*; sendo selecionado os dados referentes ao contaminante de interesse e a classe *Amphibia*. Posteriormente foram utilizados sites de pesquisa, como: *Google Scholar*, *Scielo* e *Periódicos CAPES*, com uma combinação de palavras-chave, sendo as principais: “benzo(a)pyrene” (variações: “benzo[a]pyrene”, “benzpyrene”), “amphibia”, “anura”, “caudata”, “frog”, “newt” e “toad”. Foram priorizados os trabalhos que abordam os efeitos individuais do B α P, bem como os artigos/capítulos publicados na língua inglesa, sendo desconsideradas dissertações, teses ou artigos/capítulos publicados em outro idioma (e.g. alemão, francês, italiano). Nosso levantamento bibliográfico também incluiu o rastreamento de referências dos artigos pesquisados, sendo que alguns artigos (especialmente prévios a 1970) não foram encontrados online. Com a finalidade de uma revisão completa, não houve restrição da data de publicação.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Os aspectos metodológicos utilizados nos diferentes estudos envolvendo anfíbios expostos ao B α P foram agrupados em diferentes tabelas, que abordam: a espécie utilizada (Tabela 1), dose (Tabela 2) e diluição (Tabela 3) do composto, tempo (Tabela 4) e via de exposição (Tabela 5).

4. ABSORÇÃO E METABOLISMO

O B α P é um carcinógeno, que necessita de ativação metabólica para poder desempenhar seus efeitos adversos (Sims et al., 1974; Brinkmann et al., 2013). Naturalmente ele pode ser absorvido por via cutânea, oral e respiratória (Netto et al., 2000). Em anfíbios, são empregadas diferentes técnicas para avaliar a absorção e o metabolismo do B α P, como: cintilação líquida, cromatografia líquida de alta eficiência, fluorescência e marcação de isótopo radioativo (e.g. [^3H]-B α P, [^{14}C]-B α P) (Colombo et al., 1996; Marquis et al., 2009; Reynaud et al., 2012; Regnault et al., 2014); sendo que a diminuição de B α P em fase orgânica (não metabolizado) é um indicador de absorção, enquanto o aumento de B α P em fase aquosa (metabolizado) e/ou ligado a proteínas são indicadores de metabolização.

4.1. *In vivo*

Anuros (*P. esculentus*, *R. temporaria*, *X. laevis* e *X. tropicalis*) (Colombo et al., 1996; Camatini et al., 1999; Marquis et al., 2009; Reynaud et al., 2012; Regnault et al., 2014, 2016) e salamandras (*P. waltl*) (Grinfeld et al., 1986; Marty et al., 1989; Garrigues et al., 2004) absorvem rapidamente o B α P em um período de 24h, e mesmo após um período de depuração (solução sem o contaminante) de 24-48h ainda é observado um aumento da fase aquosa e ligada a proteínas (Colombo et al., 1996; Camatini et al., 1999), demonstrando que o

composto continua a ser metabolizado mesmo após o término da exposição. Grinfeld et al. (1986) observaram que a taxa de absorção nas primeiras horas (1-12h) não é influenciada pela dose do composto, no entanto entre 12-24h a dose passa a influenciar, sendo que para a menor concentração (0.075×10^{-3} ppm) há um aumento de absorção, enquanto para as maiores concentrações ($0.15 - 0.3 \times 10^{-3}$ ppm) a taxa de absorção diminui. Em *P. waltl* é observada uma liberação progressiva de metabólitos hidrossolúveis (e.g. diols, fenóis e quinonas), sendo que 50% da dose inicial ($100 \mu\text{g/g}$ [^3H]-BaP) foi excretada após nove dias de exposição, com um máximo de liberação de metabólitos após 48h de exposição (Marty et al., 1989). Marty et al. (1995) obtiveram resultados similares, com 50% da dose inicial coletada após 10 dias da injeção intraperitoneal. Os autores ainda relataram uma diminuição da excreção de BaP, sendo que 2/3 da dose inicial foi recuperada após três meses da exposição. Em *R. temporaria* a taxa de absorção também é rápida, sendo que apenas 30% da concentração inicial permanece em fase orgânica após três dias da exposição (Marquis et al., 2009), enquanto que espécimes de *P. esculentus* absorvem todo o composto após seis dias (Reynaud et al., 2012). Regnault et al. (2014, 2016) calcularam a taxa de absorção em *X. tropicalis*, sendo que em um período inicial de exposição (0-6h) a taxa é de $0.88 \pm 1.44 \mu\text{g/h}$, com posterior redução (6-12h) para $0.6 \mu\text{g/h}$ ($0.77 \pm 0.02 \mu\text{g/h}$ – Regnault et al., 2016). Da metade ao fim do experimento (12-24h) não houve alterações na quantidade do composto, restando $1.6 \mu\text{g/L}$ de BaP, 16% da concentração inicial ($0.5 \mu\text{g/L}$, 5% da inicial – Regnault et al., 2016). Concomitante à absorção houve um aumento da concentração de metabólitos na vesícula biliar, sendo seu auge no período de 18-24h com taxa de 65 ng de BaP metabolizado por hora (Regnault et al., 2014). Reynaud et al. (2012) observaram que a distribuição do BaP pelo organismo é heterogênea, sendo que o órgão que exibiu os maiores valores de bioconcentração foi a vesícula biliar, seguido pelo intestino e pelos rins. Os demais órgãos (e.g. ovários, ovidutos e corpos adiposos) tiveram uma taxa similar e sete vezes inferior ao dos rins. Marty et al. (1998) também observaram metabólitos no fígado e na vesícula biliar de *P. waltl*, demonstrando que o fígado é o principal órgão relacionado a metabolização do BaP.

Fatores bióticos e abióticos alteram a metabolização do BaP. Marty et al. (1989) realizaram diferentes cenários de exposição para *P. waltl*, adicionando e/ou removendo luz e *Daphnia*. Essas diferentes condições causam uma mudança nos metabólitos hidrossolúveis identificados no meio aquoso. Na presença de luz e de *Daphnia* há maior quantidade de quinonas, na ausência de ambos há prevalência de diols e fenóis, enquanto apenas na presença de luz os três metabólitos (diols, fenóis e quinonas) apresentaram níveis similares. Esse

resultado indica influência da luz na parte da fotodegradação do composto em meio aquoso, além de uma possível participação de *Daphnia* na metabolização do composto.

4.2. *In vitro*

Waddington & Goodhart (1949) avaliaram a distribuição do BaP em células embrionárias de *T. alpestris*, sendo que a coloração fluorescente do composto ocorre próximo ao núcleo e nas estruturas constituídas por lipídios (e.g. lipossomos). Diamond & Clark (1970) demonstraram que células embrionárias de *B. americanus* e *R. pipiens* tem capacidade de metabolizar o BaP em derivados hidrossolúveis; enquanto Clark & Diamond (1971) relataram que a degradação do composto é influenciada pela temperatura de incubação, sendo valores crescentes entre 4°C (0.17 µg BaP degradado/10⁷ células/6 horas), 10-15°C (0.37 µg) e 30°C (1.16 µg), com redução em 40°C (0.82 µg) e o máximo de eficiência de metabolização entre 30-35°C. Comparado com linhagens celulares de homeotérmicos (e.g. mamíferos e aves) e poiquilotérmicos (e.g. peixes e répteis), os valores de degradação em *B. americanus* sempre foram mais elevados nas faixas de temperatura entre 4-30°C (Clark & Diamond, 1971). Diamond & Clark (1970) também observaram, que para as células embrionárias de *B. americanus*, que foram eficientes na metabolização do BaP, houve um efeito citotóxico, avaliado pela inibição da multiplicação celular. O metabolismo do BaP também foi avaliado no retículo endoplasmático de *A. tigrinum* (Busbee et al., 1978; Anderson et al., 1982) e *R. pipiens* (Cheh et al., 1980), por meio do uso dos microsossomos hepáticos. O microsossomo é responsável pelo metabolismo de xenobióticos, diminuindo sua toxicidade e convertendo para compostos de fácil excreção (hidrossolúveis) (Walton, 1977). Busbee et al. (1978) identificaram oito metabólitos, sendo eles dióis, fenóis e quinonas. Cheh et al. (1980) e Anderson et al. (1982) avaliaram a capacidade dos microsossomos em gerar metabólitos mutagênicos para *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), sendo um resultado positivo para *R. pipiens*, mas negativo para *A. tigrinum* (i.e. não houve formação de metabólitos mutagênicos). Noshiro & Omura (1984) estabeleceram um comparativo entre os microsossomos hepáticos e sua capacidade de oxidar o BaP em diferentes espécies. A composição dos microsossomos (e.g. citocromo P-450, citocromo *b*₅, NADPH/NADH-citocromo *c* redutase) e a metabolização do BaP – levando em conta a quantidade de citocromo P-450 – é similar entre mamíferos e anuros. No entanto, dentre os anuros, *X. laevis* apresentou a menor atividade de oxidação, seguido por *R. nigromaculata*, *R. catesbeiana* e *B. bufo japonicus*. Schwen & Mannering (1982) também compararam as taxas de metabolismo entre diferentes grupos, sendo que *R. pipiens* apresenta uma taxa de oxidação menor do que roedores, mas mais elevada do que em peixes (*Salmo trutta*) e répteis (*Thamnophis*).

4.3. Enzimas de metabolismo

Outro indicador de metabolização do BaP é a atividade das enzimas relacionadas ao seu metabolismo, como a citocromo P450 (CYP450) e a glutathione S-transferase (GST) (Johanning et al., 2012; Strobel et al., 2015). Marty et al. (1989) observaram um aumento de atividade da CYP450 nos microsomos de girinos e adultos de *P. waltl*. Marty et al. (1998) e Rankouhi et al. (2005) também observaram resultados similares (atividade da CYP450 mensurada pela ethoxyresorufin-O-deethylase), sendo que a atividade apresentou relação positiva com o aumento da concentração do composto (Marty et al., 1998). Reynaud et al. (2012) mensuraram a atividade dessas enzimas (atividade da CYP450 mensurada pela ethoxycoumarin-O-deethylase) no fígado e rins de *P. esculentus*, havendo uma indução após um (GST) e dois dias (CYP450 e GST) de exposição ao BaP, sendo a atividade enzimática do fígado mais elevada do que nos rins. Valverde et al. (2022) expondo *P. nattereri* ao BaP por diferentes vias (cutânea, injetável e oral) e tempos (1, 3 e 7 dias) não observaram alterações na atividade da GST no fígado. Isoformas da CYP450, como a P4501A (CYP1A), também apresentam um aumento de atividade em *X. laevis* expostos a 0.04 μ M (Camatini et al., 1999) e 10-100 μ g/L de BaP, sendo que essa indução é dose dependente, apresentando maior atividade na maior concentração (Colombo et al., 1996). A indução da CYP1A também ocorre no fígado de espécimes adultos (*X. laevis*), com pico de atividade após 72h de exposição e uma diminuição após 120 e 168h (Colombo et al., 2003). Höhn-Bentz et al. (1983) avaliaram, de maneira geral, a atividade das oxidases de função mista (MFO) – grupo de enzimas em que a CYP450 esta inserida (Bachmann, 2009) – em *X. laevis*, não sendo observada alterações após uma rápida exposição (60 minutos). No entanto, após uma semana (8 e 14 dias) a atividade das MFO apresenta um aumento (aproximadamente) quatro vezes maior em relação ao controle.

Outras enzimas também podem ser relacionadas indiretamente ao metabolismo do BaP, como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Durante as etapas de metabolização do BaP são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Penning et al., 2004). Essas EROs são o substrato de ação da SOD e da CAT, respectivamente; dessa forma alterações na atividade dessas enzimas é um indício de estresse oxidativo decorrente da metabolização do BaP. Valverde et al. (2022) relataram um aumento pontual, no fígado, da atividade da SOD, enquanto a CAT não apresentou alterações. No entanto, para os espécimes expostos ao BaP a tendência foi um aumento de atividade dessas enzimas em relação ao controle.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1. FETAX

O FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus*) é um teste para avaliar xenobióticos que alteram o desenvolvimento embriológico de *X. laevis*, possibilitando avaliar malformações em todo o embrião, além de fornecer valores de: 96-h LC₅₀, (concentração letal), 96-h EC₅₀, (concentração que induz malformações), TI (índice de teratogênese – razão entre LC₅₀ e EC₅₀) e MCIG (concentração mínima para inibir o crescimento) (Bantle, 1995). Como embriões de *X. laevis* carecem de enzimas metabólicas, um sistema exógeno de ativação metabólica (MAS – *Metabolic Activation System*) pode ser adicionado, sendo ele responsável pela metabolização do xenobiótico (Fort et al., 1988, 1989). A adição do MAS ao FETAX tem a finalidade de gerar resultados extrapoláveis para mamíferos (Bantle et al., 1995).

Fernandez & L'Haridon (1994) relataram para *P. waltl* as fases de maior sensibilidade ao contaminante – união das dobras neurais e o aparecimento do broto da cauda (fases antes da eclosão das larvas) – onde a exposição ao BaP ou exposição concomitante de BaP+UVA causam uma mortalidade entre 69-93.5% dos embriões. Em estádios pós-eclosão, a mortalidade de *R. temporaria* ocorre apenas quando o BaP é exposto juntamente com a UVB (Marquis et al., 2009), o que reforça a maior sensibilidade do estágio embrionário. Dentre os efeitos teratogênicos em *P. waltl* foram observadas: anormalidades nos olhos (e.g. ausência de pigmentação, ciclopia e anoftalmia), nadadeira e no formato do corpo (Fernandez & L'Haridon, 1994). Em *X. laevis* concentrações >2.5 µg/mL de BaP inativo (sem MAS) induzem malformações no intestino, enquanto concentrações >7.5 µg/mL produzem anormalidade severas no intestino e malformações na boca. Na forma ativa (com MAS), concentrações >0.5 µg/mL provocam edema nos olhos, enrolamento do intestino e malformações na boca, e em concentrações >5 µg/mL causam malformações nos olhos, torções esqueléticas e microcefalia (Fort et al., 1989). Saka (2004), utilizando múltiplas concentrações de BaP (1.32 x 10⁻⁵ a 13.2 µM) não observou anormalidades ou malformações. Múltiplos estudos determinaram a LC₅₀, EC₅₀, TI e MCGI do BaP (Fort et al., 1989; Bantle et al., 1995; Propst et al., 1997; Saka, 2004), sendo esses valores apresentados na Tabela 1. Adicionalmente, Propst et al. (1997) ainda relataram que a adição de inibidores enzimáticos (α-naftoflavona {CYP1A/2A}, cimetidina {CYP450}, elipticina {CYP1A}, maleato de dietila {glutathione} e óxido de ciclohexeno {epóxido hidrolase}) juntamente ao MAS, altera os valores de LC₅₀, EC₅₀ e TI.

5.2. Metamorfose

A metamorfose em anuros é controlada por hormônios tireoidianos (Trudeau et al., 2020) como o T₄ (tiroxina), o principal em circulação, e o T₃ (triiodotironina), forma ativa que atua em tecidos alvo (Mann et al., 2009). Apenas dois trabalhos, relacionando o efeito do BaP sobre o T₃, foram encontrados, sendo ambos os estudos *in vitro*. Yamauchi et al. (2002) avaliaram a capacidade de múltiplos compostos químicos em inibir a ligação do [¹²⁵I]T₃ com TTR (transtirretina – proteína de ligação de hormônios tireoidianos), onde o BaP é um inibidor moderado, sendo necessário 3070 nmol/L de BaP para inibir 50% da ligação do [¹²⁵I]T₃ (comparativo: o dietilestilbestrol teve o maior efeito inibidor na concentração de 72.3 nmol/L). Shimada & Yamauchi (2004) relataram que a taxa de absorção de [¹²⁵I]T₃ pelos eritrócitos de *R. catesbeiana* é ativado pelo BaP, apresentando um valor de 150% em relação ao controle (100%).

Com relação a efeitos *in vivo*, exposições prolongadas ao BaP (14 dias – Sadinski et al., 1995; 12 meses – Regnault et al., 2018) atrasam o tempo para *X. laevis* (4 dias) e *X. tropicalis* (21 dias) atingirem a metamorfose. *X. laevis* ainda apresenta alterações biométricas e um retardo de desenvolvimento, e quando expostos por 4, 8 e 16 dias exibem menor massa corpórea e estágio mais inicial (próximo ao 54 – Nieuwkoop & Faber, 1975) do que os expostos por 0-2 dias (próximo ao 56) (Sadinski et al., 1995). Apesar do atraso no tempo de metamorfose em ambas as espécies, quando os indivíduos atingiram a metamorfose não houve diferenças biométricas em relação ao controle. Após a metamorfose, fêmeas de *X. tropicalis* não tiveram atraso para a maturação sexual (Regnault et al., 2018).

Em estudos transgeracionais, girinos de *X. tropicalis* foram expostos ao BaP até atingirem a fase adulta (12 meses de exposição) e as suas linhagens subsequentes F1 e F2 – não expostas ao BaP – apresentaram um atraso de 35 e 20 dias para completar a metamorfose, além de um atraso de 141 e 80 dias para atingirem a maturidade sexual. Além do atraso para a maturação sexual, os espécimes ainda tiveram alterações reprodutivas, como: diminuição de índice gonadossomático, atraso e pouca formação de amplexo e baixa viabilidade de ovos, com pouca (F1) ou nenhuma (F2) eclosão de novas larvas. Indivíduos da F1 ainda apresentaram alterações biométricas, com redução de tamanho e de massa corpórea (Regnault et al., 2018; Usal et al., 2021).

6. MORFOLOGIA

6.1. Anatomia/Patologia

Algumas espécies de anfíbios possuem a capacidade de regenerar membros amputados, processo que envolve a desdiferenciação tecidual, proliferação celular e formação de novas estruturas (Scadding, 1977, 1981). Devido a esse aspecto, diferentes compostos

químicos foram utilizados para avaliar interrupções e alterações na regeneração (Tsonis & Eguchi, 1982). Matos & Lustig (1973) promoveram a amputação de metade da cauda de girinos de *B. arenarum*, com posterior administração de BaP em sua forma pura (cristal). Após o processo regenerativo (20-30 dias) foram observadas nadadeiras supranumerárias nos espécimes expostos ao BaP. Tsonis & Eguchi (1982) amputaram os membros anteriores de *C. pyrrhogaster* e relataram que sua regeneração, após adição de cristais de BaP, tem um atraso de dois meses em relação à regeneração normal – duração de três meses – e foi considerada anormal, com alguns indivíduos apresentando: ausência completa do rádio ou da ulna, anormalidades nos carpos, metacarpos e falanges, e formação de membros acessórios (estruturas semelhantes a dedos com presença de carpos). A respeito de membros acessórios, Breedis (1952) avaliou sua formação espontânea após administração de diferentes carcinógenos sobre os membros anteriores de *T. viridescens*, sendo que o BaP (diluído em vaselina) não provoca formação de membros acessórios. Entretanto, quando o composto é diluído e aplicado em conjunto com alcatrão, são observados dois espécimes (11% do grupo) com membros acessórios após 87 dias da aplicação (comparativo: alcatrão de maneira singular produz 20 espécimes com membros acessórios – 26% do grupo – 41 dias após a aplicação). Um efeito potencializado ocorre quando o BaP é administrado juntamente com alcatrão, metilcolantireno, 2-acetilaminofluoreno e *Scarlet red*, onde 20 espécimes (40% do grupo) apresentaram membros acessórios após 42 dias. Arffmann & Christensen (1961) observaram alterações macroscópicas na cauda de *T. cristatus*, especificamente na região de aplicação do BaP, que apresentava uma proeminência ou uma depressão, que foram relacionadas, respectivamente, a uma hiperplasia ou ulceração parcial do tecido. Strauss & Mateyko (1964) realizaram uma aplicação direta de BaP nos rins de *R. pipiens* para avaliar a formação de tumores. Após cinco dias da administração, todos os espécimes morreram não havendo tumores no tecido. Nesse mesmo experimento outros agentes carcinogênicos (e.g. 4-animoazobenzeno, dibenz[a,h]antraceno) foram capazes de induzir a formação de tumores que evoluíram para adenocarcinomas. Em um estudo similar, Balls (1964) inseriu cristais de BaP na cavidade abdominal ou no saco linfático de *X. laevis*, o que levou a formação de linfosarcomas e tumores em múltiplos órgãos viscerais, em particular o fígado e os rins.

6.2. Histologia/Histopatologia

Cristais de BaP implantados diretamente sobre a cauda de *B. arenarum* (sem amputação) levam a formação de nódulos constituídos por células similares a leucócitos (Matos & Lustig, 1973). Arffmann & Christensen (1961) e Arffmann (1963) avaliaram os efeitos do BaP sobre a epiderme de *T. cristatus*, após uma exposição por via injetável. Ambos

os estudos relataram a ocorrência de hiperplasia no tecido da cauda (Arffmann & Christensen, 1961) e das costas (Arffmann, 1963), além de invasão de células epiteliais irregulares na derme e na camada superficial da musculatura, destruição de glândulas, infiltração leucocitária e proliferação de tecido conectivo (Arffmann & Christensen, 1961). Arffmann (1962) também avaliou os efeitos do BaP sobre a epiderme, mas nesse caso comparando diferentes solventes, como a butirina e o propilenoglicol. No caso da butirina, não houve diferença entre o controle (solvente) e o tratamento (solvente + BaP), havendo em ambos os casos severas lesões necróticas, edema, sangramento, infiltração leucocitária e hiperplasia da epiderme. Para o propilenoglicol, houve uma pequena diferença entre o controle e o tratamento, sendo observada inflamação do tecido, edema e hiperplasia. Arffmann & Christensen (1961) e Arffman (1963) também utilizaram diferentes solvente para o BaP, como óleo de amendoim, oliva e soja; sendo observados diferentes resultados dependendo do tempo e da concentração do composto. Alterações cutâneas, induzidas pelo BaP, são relatadas por Seilern-Aspang & Kratochwil (1962) e por oito estudos revisados por Balls & Ruben (1964), sendo observados: tumores, neoplasia, metástase, hiperplasia e proliferação epitelial. Duran-Reynals (1939), administrando BaP no músculo de *R. pipiens*, observou um efeito necrótico no tecido da coxa, sendo a lesão caracterizada por degeneração das fibras musculares, edema, hemorragia e deposição de fibrina. O autor também relatou uma congestão, hemorragia e necrose em outros órgãos, como: baço, fígado, testículos e pulmão; além de aumento do número de células fagocíticas contendo pigmento no baço, fígado e pulmão.

A respeito de alterações histopatológicas no fígado, *X. tropicalis* rapidamente expostos ao BaP (24h) apresentam aumento de apoptose celular, esteatose e hepatócitos de formato irregular com pouco contato célula-célula (Regnault et al., 2014, 2016). Em espécimes expostos de maneira prolongada (12 meses), o desarranjo tecidual foi mais pronunciado e incluíam: necrose e infiltração leucocitária (Regnault et al., 2018), além dos aspectos já relatados por Regnault et al. (2014, 2016). Alterações histopatológicas similares (e.g. necrose, inflamação e hepatócitos balonizados e irregulares) são observadas quando o BaP é administrado juntamente com o triclosan (outro desregulador endócrino) (Usal et al., 2019, 2022). A reversibilidade dos efeitos do BaP foi avaliada por Regnault et al. (2018) em *X. tropicalis* mantidos em depuração durante 12 meses. Mesmo após esse período de recuperação os espécimes ainda exibiam esteatose hepática, demonstrando que alguns efeitos do BaP são irreversíveis. Usal et al. (2021) avaliaram efeitos transgeracionais em duas gerações de *X. tropicalis* (F1 e F2), que não foram expostas ao contaminante. A F1 teve um

aumento de lipídios no fígado, infiltração leucocitária, hepatócitos irregulares com pouco contato célula-célula e vasos sanguíneos com fenótipo progressivo para uma esteato-hepatite não alcoólica (NASH). A F2 também exibiu um processo inflamatório e alterações nos hepatócitos, mas diferentemente da F1 houve um aumento do índice hepatossomático e de tecido adiposo e uma dilatação nos vasos sanguíneos, além de uma infiltração leucocitária no pâncreas.

Com relação ao intestino, espécimes adultos de *H. albopunctatus* apresentam uma diminuição da espessura do epitélio intestinal após três dias de exposição, com um posterior aumento no tempo de sete dias (Fanali et al., 2017). No testículo, uma rápida exposição ao BaP não provoca alterações na organização dos túbulos seminíferos (Regnault et al., 2016), mas há alterações na área de melanina (*item 6.3.*).

6.3. Pigmentos e Células Pigmentares

Pigmentos (e.g. melanina, hemosiderina e lipofuscina) são sintetizados e armazenados por células pigmentares especializadas, denominadas melanócitos e melanomacrófagos (Purello et al., 2001; Agius & Roberts, 2003; Scharl et al., 2016). Os melanócitos são derivados de precursores da crista neural ectodérmica (Sichel et al., 1997; Scharl et al., 2016) e são encontrados nos testículos (Franco-Belussi et al., 2011). Os melanomacrófagos são derivados de células-tronco hematopoiéticas (Sichel, 1998), sendo idênticos aos macrófagos residentes no fígado (célula de Kupffer), diferindo pela presença de grânulos de melanina em seu citoplasma (Fenoglio et al., 2005), atuando na fagocitose (Gutierrez et al., 2018) e na detoxificação de xenobióticos (Fenoglio et al., 2005; Pérez-Iglesias et al., 2016). Santos et al. (2014) desenvolveram uma técnica de análise de pigmentação, por meio de uma restrição de área pigmentar por diferença de coloração, o que possibilitou avaliar alterações na área ocupada por esses pigmentos. A partir dessa análise os pigmentos hepáticos e testiculares, passaram a ser utilizados como indicadores de exposição para diferentes compostos químicos (Gregorio et al., 2016; Fernandes et al., 2021; Santos et al., 2021), além de estressores físicos e biológicos (Franco-Belussi et al., 2016; Gregorio et al., 2018).

A melanina é um biopolímero, sintetizado a partir do aminoácido tirosina (Riley, 1997), que atua na absorção e neutralização de radicais livres e substâncias tóxicas, proteção contra radiação ultravioleta e patógenos externos, termorregulação e interações comportamentais (Zuasti et al., 1989; Hoogdujin et al., 2004; Dubey & Roulin, 2014; Scharl et al., 2016). Uma característica da melanina é sua afinidade por compostos químicos (Lindquist et al., 1987, 1988; Larsson, 1993), dentre eles, o BaP e o 7,12-dimetilbenz(α)antraceno, que ficam retidos em tecidos de mamíferos que contêm melanina

(e.g. olho e folículo piloso) (Roberto et al., 1996). Em um estudo *in vitro*, foi demonstrado que o BaP inibe a síntese de melanina em células de melanoma de roedores, ao diminuir a expressão de enzimas relacionadas à melanogênese (Joo et al., 2015). Em anuros, a melanina presente no testículo foi quantificada em apenas um trabalho, envolvendo o BaP, ocorrendo uma diminuição de sua área em *P. cuvieri* e *P. nattereri* (De Oliveira et al., 2017). No fígado, *X. tropicalis* expostos ao BaP, por via aquosa, apresenta diminuição da área de melanina após 12-24h de exposição (Regnault et al., 2014). De Oliveira et al. (2017) utilizando *H. albopunctatus*, relataram uma diminuição da área em espécimes expostos a 7 mg/Kg por três dias e aumento em sete dias. De maneira similar, Fanali et al. (2017) obtiveram um aumento de área para a concentração de 3 mg/Kg e uma diminuição para a de 7 mg/Kg após três dias de exposição. Fanali et al. (2018) observaram a diminuição da melanina em *L. fuscus* e *P. cuvieri* após sete dias de exposição a 2 mg/Kg de BaP. Valverde et al. (2022), expondo *P. nattereri* por múltiplas rotas (cutânea, oral e injetável) observou um aumento da área de melanina na via injetável e uma diminuição nas vias cutânea e oral. De maneira distinta, De Oliveira et al. (2017) observou a diminuição da área de melanina em *P. nattereri* expostos por via injetável. A partir desses resultados, e considerando que os trabalhos de Fanali et al. (2017, 2018) utilizaram apenas via de exposição injetável, podemos observar que as vias que simulam exposição natural (aquosa, cutânea e oral) causam a diminuição da área de melanina, enquanto a via injetável pode causar efeitos mistos (aumento/diminuição).

Além da melanina, outros pigmentos são relacionados aos efeitos do BaP. A hemosiderina e lipofuscina são encontradas apenas nos melanomacrófagos e consistem em pigmentos catabólicos originados a partir da quebra de hemoglobina (hemosiderina) ou da degradação de componentes celulares (lipofuscina) (Agius & Agbede, 1984; Kranz, 1989; Agius & Roberts, 2003). Alterações nesses pigmentos podem estar relacionadas a alterações na degradação de eritrócitos danificados, retenção de ferro nos melanomacrófagos (mecanismo de proteção) ou devido a alterações patológicas (Agius & Roberts, 2003). Valverde et al. (2022) relataram um aumento da área de hemosiderina em três vias de exposição, após um e três dias de exposição; sendo seguido por uma diminuição, na via cutânea, após sete dias. Para a lipofuscina foi relatado um aumento na via cutânea e injetável, enquanto houve diminuição para a via oral e cutânea (diminuição no tempo de 7 dias).

Alterações na área de melanina podem estar associadas a três possibilidades: (1) Alteração da síntese de melanina, nesse caso a alteração da área pigmentar está relacionada diretamente com a quantidade de melanina presente no órgão. Fanali et al. (2021) observaram que a exposição a 2 mg/Kg de BaP por dois dias aumenta a quantidade de melanina no fígado

de *P. cuvieri*. No entanto, em exposições de um, três e sete dias não ocorrem alterações (Valverde et al., 2022). (2) Alteração da distribuição dos grânulos de melanina, estando às alterações ligadas à dispersão (aumento) ou agregação (diminuição) da melanina no citoplasma dos melanomacrófagos. Fanali et al. (2021) também avaliaram componentes do citoesqueleto celular, especificamente os microtúbulos, não havendo alterações. (3) Alteração fisiológica (especialmente nos melanomacrófagos), que pode envolver os itens anteriores. Fanali et al. (2021) utilizaram o corante azul de tripan para avaliar o índice de fagocitose nos melanomacrófagos, sendo que após 48h de exposição houve uma diminuição em relação ao controle. Isso demonstra uma mudança na fisiologia da célula pigmentar, o que pode estar relacionado a alterações nos processos catabólicos (hemosiderina e lipofuscina) ou relacionados à melanina (síntese e distribuição). Os estudos envolvendo alterações pigmentares em anuros após exposição ao BαP ainda são recentes, um total de seis trabalhos foram publicados desde 2014, sendo necessários estudos complementares.

7. EFEITOS NO DNA E EXPRESSÃO GÊNICA

7.1. Adutos

Adutos de DNA consistem em uma ligação covalente de compostos químicos nas bases nitrogenadas do DNA, provocando uma modificação estrutural da molécula, o que pode impedir os processos de duplicação e transcrição do material genético, sendo uma das etapas iniciais para a carcinogênese (Bartsch, 1996; Schärer, 2003). Girinos de *X. laevis* expostos ao BαP apresentam aumento na quantidade de adutos de DNA (Morse et al., 1996; Camatini et al., 1999), sendo essa alteração mantida mesmo após um período de depuração (Camatini et al., 1999). Morse et al. (1996) também relataram que a formação de adutos é proporcional ao aumento da concentração do composto, além de ser influenciado pelo estágio de desenvolvimento dos espécimes. Estádios mais elevados (e.g. 45 e 50 – Nieuwkoop & Faber, 1975) apresentam maior quantidade de adutos do que um estágio inicial (e.g. 38), além disso, nos estádios 38 e 45 a maioria dos adutos é reparada após 24h de depuração, sendo o DNA quase totalmente reparado após 144h. O estágio 50, por sua vez, apresenta uma taxa de reparo pequena, sendo os adutos facilmente detectados após 144h. Adutos de DNA também são observados no fígado e no sangue de *P. waltl* e *X. laevis* (Sadinski et al., 1995; Pfohl-Leszkowicz et al., 1996; Marty et al., 1998), com a sua quantidade influenciada pela concentração (31 nM: 1.6×10^{-7} ; 496 nM: 13.7×10^{-7}) e pelo tempo de exposição (2 dias: 0.4×10^{-7} ; 16 dias: 10×10^{-7}) (Sadinski et al., 1995).

Pfohl-Leszkowicz et al. (1996) ainda estabeleceram uma comparação de adutos entre diferentes espécies (e.g. mamíferos {camundongo e rato}, peixes {*Oncorhynchus mykiss*} e

plantas (*Echinacea purpurea*, *Phaseolus vulgaris*}), sendo alguns específicos para cada espécie. Os autores observaram que essa diferença está relacionada aos processos metabólicos de cada organismo. Ironicamente o principal aduto relatado para *X. laevis* (com característica similar à reação do 9-OH B α P com o DNA) também foi o principal relatado para as plantas.

7.2. Quebras na cadeia de DNA

Höhn-Bentz et al. (1983), por meio da técnica de eluição, avaliaram a formação de quebras na cadeia de DNA. Após uma hora de exposição a 125 μ g/g de B α P houve um aumento de quebras na molécula, que por consequência gerou fragmentos de menor massa molecular (controle: 40.9, tratamento: 28.1 megadaltons). Após três horas de exposição o número de quebras apresentou uma diminuição, atingindo valores similares aos do controle. Os autores também determinaram, para esse cenário experimental, que a concentração mínima de B α P para promover quebras no DNA é de 10 μ g/g. No entanto, o valor da concentração é influenciado pela alimentação do animal, onde espécimes não alimentados apresentam valores similares ao controle, enquanto animais alimentados com fígado de frango apresentam um aumento significativo no número de quebras. Isso pode estar relacionado com alterações no metabolismo do B α P pelo organismo.

O ensaio cometa é outro método para avaliar e quantificar danos ao DNA. O ensaio consiste na lise de células (e.g. eritrócitos), com posterior eletroforese em gel de agarose. Por meio de corantes específicos o DNA pode ser analisado em microscópio de fluorescência (Collins, 2002), onde podem ser avaliados diferentes parâmetros como o ETM (extensão de cauda – extensão da cauda ponderada pelo de DNA na cauda) e TL (comprimento de cauda – distância entre o primeiro e o último fragmento de DNA) (Mouchet et al., 2005). Girinos de *X. laevis* apresentaram um efeito genotóxico para as concentrações de 0.125 (1 dia, aumento de ETM e TL) e 1.0 mg/L (2 e 8 dias, aumento de ETM). Também foi observada diminuição de danos no DNA (diminuição de ETM e TL) para as concentrações 0.125 – 1.0 (2, 4 e 12 dias) e 10 mg/L (1, 2, 4 e 12 dias) (Mouchet et al., 2005).

7.3. Micronúcleo & Anormalidades Nucleares

A análise de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares (e.g. células anucleadas, binucleadas e com *bud*) é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar efeitos induzidos por compostos químicos, agentes físicos ou para monitorar o status de populações nativas (Ferrier et al., 1998; Josende et al., 2015; Pollo et al., 2015; Franco-Belussi et al., 2018; Santos et al., 2021). Trata-se de uma técnica rápida, efetiva e de baixo custo que fornece indicativos de efeitos genotóxicos (Fenech, 2007) ou adaptações fisiológicas do organismo

em ambientes poluídos (Barni et al., 2007). O micronúcleo é formado durante a divisão celular, podendo ser constituído por fragmentos de um cromossomo ou um cromossomo inteiro que se separaram durante a mitose (Fenech, 2007). O *bud* (ou brotamento nuclear) está relacionado com a amplificação do material genético, com posterior eliminação do DNA amplificado, resultando em uma estrutura similar ao micronúcleo, mas ainda conectado ao núcleo por uma haste de material nucleoplasmático (Fenech, 2007; Fenech et al., 2011). Células binucleadas também são originadas durante os eventos da divisão celular, sendo possível que os dois núcleos apresentem conexão por uma ponte nucleoplasmática (Fenech, 2000, 2007). As células anucleadas são pouco avaliadas nos estudos, sendo que um aumento em sua frequência está relacionado à melhor eficiência no transporte de oxigênio em ambientes poluídos (Barni et al., 2007).

Anuros (*L. fuscus*, *P. cuvieri*, *R. temporaria*, *X. leavis*) (Van Hummelen et al., 1989; Fernandez et al., 1993; Sadinski et al., 1995; Marquis et al., 2009; Fanali et al., 2018) e salamandras (*A. mexicanum* e *P. waltl*) (Siboulet et al., 1984; Grinfeld et al., 1986; Jaylet et al., 1986a, b; Fernandez & Jaylet, 1987; Marty et al., 1989; Fernandez et al., 1989, 1993; Fernandez & L'Haridon, 1994; Djomo et al., 1995; Godet et al., 1996; Marty et al., 1998) apresentam aumento de micronúcleo após exposição ao BaP, sendo esse aumento relacionado positivamente com o aumento da dose e do tempo de exposição ao composto. No entanto, em alguns casos, concentrações elevadas de BaP (Jaylet: 0.3, 0.5, 0.7; Van Hummelen: 1.0, 2.0 e 4.0 ppm) provocam menor quantidade de micronúcleos em comparação a concentrações intermediárias (Jaylet: 0.1, 0.2; Van Hummelen: 0.5 ppm) (Jaylet et al., 1986b; Van Hummelen et al., 1989). Dentre as espécies de salamandras utilizadas, *P. waltl* demonstrou ser mais resistente ao BaP, uma vez que a maior quantidade de alterações observadas foi para a concentração de 0.5 ppm, enquanto para *A. mexicanum* a dose de 0.2 causou o maior número de alterações (Jaylet et al., 1986a, b). Alterações na frequência de micronúcleo também ocorrem devido a mudanças nos parâmetros bióticos e abióticos dos experimentos. Marty et al. (1989) relataram que *P. waltl* expostos ao BaP, na presença de luz e de *Daphnia*, tem maior quantidade de micronúcleos do que em girinos expostos na ausência de luz e *Daphnia*. Os autores relacionaram esse fato com as alterações nos metabólitos identificados em fase aquosa (ver item 4.1.). Fernandez & L'Haridon (1994) observaram uma influência de diferentes cenários de luminosidade, sendo que em todos esses cenários a exposição ao BaP aumenta a quantidade de micronúcleo em relação ao controle. Em condições de luz artificial ou de escuridão há diminuição na quantidade de micronúcleos em relação à luz natural (fotoperíodo), o que foi relacionado a uma potencialização dos efeitos tóxicos do composto

devido à radiação solar. Marquis et al. (2009) também relataram influência relacionada com a altitude em oito populações nativas de *R. temporaria*, sendo que com o aumento da altitude (294-2450 metros) houve diminuição da frequência de micronúcleo. Os autores também tentaram estabelecer a relação entre a quantidade de micronúcleo com a quantidade de poluentes identificados nos sítios de coleta, não havendo resultado significativo. Com relação a outras anormalidades nucleares, *P. cuvieri* apresenta diminuição no número de células anucleadas, binucleadas e na quantidade total de anormalidades (soma de todas as anormalidades) após exposição ao BaP (Fanali et al., 2021).

7.4. Mutações

O BaP induz mutações pontuais no gene α_1 -globina, especificamente em um sítio de restrição (posição 913-917, CCTGG), alterando o nucleotídeo G (Guanina) pelo T (Timina) – mudança do aminoácido aspartato para tirosina. A taxa de mutação foi dose dependente para girinos (10 $\mu\text{g/L}$: 6×10^{-3} ; 50 $\mu\text{g/L}$: 8×10^{-3}) e distinta entre os órgãos dos adultos. O fígado e o coração apresentaram as maiores taxas de mutação (20×10^{-3}), seguidos pelos pulmões e rins (18×10^{-3}). O tempo (em depuração) que cada órgão leva para atingir essa taxa varia, sendo: 14 dias para o fígado, 18 para o coração, 10 para os pulmões e 8 para os rins (Kennerley & Parry, 1994).

7.5. Expressão Gênica

A expressão de genes foi avaliada em três trabalhos envolvendo *X. tropicalis*, sendo que após uma rápida exposição (6-24h), houve um excesso de transcrição para a maioria dos genes (308 – Regnault et al., 2014; 9 – Regnault et al., 2016). Um resultado similar foi observado por Regnault et al. (2018), com a diminuição da transcrição de 322 genes (maioria) após 12 meses de exposição ao BaP. Os genes alterados nesses trabalhos eram atribuídos ao metabolismo (e.g. aminoácidos, carboidratos, dicarboxilato, glioxilato, lipídios, proteínas e xenobióticos), biossíntese (e.g. aminoácidos, hormônios esteróides), codificação de proteínas (e.g. detoxificação, estrutura celular, imunidade, interação e reparo do DNA e sinalização da insulina), sinalização/transporte, morte celular/proliferação, carcinogênese de compostos químicos e aos peroxissomos (Regnault et al., 2014, 2016, 2018).

A partir da alteração na transcrição gênica, foi observado um aumento no conteúdo de lipídios nos hepatócitos (Regnault et al., 2014, 2016, 2018) e diminuição do conteúdo de colesterol na vesícula biliar (Regnault et al., 2014), indicando um fenótipo de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). Regnault et al. (2018) determinou que o aumento de conteúdo de lipídios nos hepatócitos (i.e. esteatose) foi causado por um estresse oxidativo

induzido pelo BaP, que altera a atividade das mitocôndrias (diminuição do índice de controle respiratório e da atividade da aconitase), responsáveis por regular o metabolismo de lipídios. Os trabalhos de Regnault et al. (2014, 2016, 2018) ainda relataram aumento de glicemia após exposição ao BaP, juntamente com o aumento da síntese de insulina pelo pâncreas (Regnault et al., 2018), o que indica que *X. tropicalis* desenvolveu síndrome de resistência à insulina.

Usal et al. (2021) avaliaram os efeitos transgeracionais do BaP em duas gerações de *X. tropicalis* (F1 e F2), que não foram expostas ao contaminante. A F1 teve alteração na expressão de 130 genes (70% com redução de transcrição) de metabolismo (e.g. carboidrato, lipídio, piruvato, proteínas e rotas metabólicas), biossíntese (e.g. aminoácidos, esteróides e terpenóides), sinalização (insulina e PPAR – Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma), imunidade e adesão/proliferação/morte celular. Com relação a F2, 104 genes relacionados com: carboidratos, insulina, lipídios e proteínas, tinham excesso de transcrição em 54% dos casos.

8. PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

A avaliação dos diferentes componentes do sistema imunológico é importante para tentar entender os padrões de saúde e doença dos espécimes (Allender & Fry, 2008; Claver & Quaglia, 2009), além de fornecer uma ferramenta para os efeitos de estressores ambientais (Barni et al., 2007, Franco-Belussi et al., 2018). A melanina, presente nos melanócitos e melanomacrófagos, é um componente do sistema imune (Steinel & Bolnick, 2017; Mcnamara et al., 2021) que já foi abordado anteriormente (*ver item 6.3.*), apesar de que os trabalhos que avaliam esse pigmento não o relacionam diretamente com aspectos imunológicos, mas com os aspectos fisiológicos da célula/órgão analisado. Para esse tópico serão abordados os trabalhos relacionados diretamente com o sistema imunológico ou suas células.

Martini et al. (2012) avaliaram genes pró-inflamatórios de citocinas e de proteínas de choque térmico. Em mamíferos, as citocinas são responsáveis por iniciar e regular a resposta imune inata e adaptativa, sendo que a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) podem ter respostas universais ou equivalência funcional dentre os vertebrados (Kaiser et al., 2004). Proteínas de choque térmico (e.g. HSP70) apresentam propriedades imunológicas, produzindo citocinas e quimiocinas, e regulando moléculas co-estimuladoras (Robert et al., 2009). O BaP induz um aumento de expressão de mRNA de HSP70 e de IL-1 β , havendo em ambos os casos efeito dose-dependente (aumento da expressão com o aumento da concentração). Não houve alteração da expressão de TNF- α (Martini et al., 2012).

Com relação às células relacionadas ao sistema imune, leucócitos compreendem um dos três elementos celulares do sangue, juntamente com os eritrócitos e trombócitos (Claver

& Quaglia, 2009). Em anfíbios são identificados cinco tipos de leucócitos, divididos em agranulócitos (e.g. linfócito e monócito) e granulócitos (e.g. basófilo, eosinófilo e neutrófilo) (Claver & Quaglia, 2009; Das & Mahapatra, 2012). Fanali et al. (2018) avaliaram o perfil leucocitário de anuros (*L. fuscus* e *P. cuvieri*) após exposição a 2 mg/Kg de BaP, sendo que não foram observadas alterações. Outros trabalhos já relataram um quadro histopatológico de infiltração leucocitária em diferentes órgãos, especialmente no fígado (*ver item 6.2.*). Mastócitos são células do sistema imunológico (Pinelli et al., 2010) que atuam na resposta imune inata e adaptativa (Crivellato et al., 2015) e em processos inflamatórias (Galli & Wershil, 1996). *L. fuscus* e *P. cuvieri* apresentam aumento da frequência de mastócitos após uma exposição a 2 mg/Kg de BaP, sendo que para *P. cuvieri* a frequência de mastócitos dobra entre os tempos de exposição (1, 7 e 13 dias), enquanto em *L. fuscus* o aumento no primeiro dia é dez vezes maior do que o controle (Fanali et al., 2018). Em *P. nattereri* há um aumento de mastócitos quando o BaP é administrado por via oral, e diminuição por via injetável (Valverde et al., 2022). Considerando que Fanali et al. (2018) utilizaram uma via de exposição injetável, podemos observar uma variação de resposta entre diferentes espécies sobre uma mesma via de exposição, o que necessita de investigações adicionais para compreender o padrão de resposta dos mastócitos.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A classe Amphibia é atualmente composta por três ordens: Anura (7479 sp.), Caudata (773 sp.) e Gymnophiona (214 sp.) (Frost et al., 2021). De um total de 8466 espécies, apenas 22 são utilizadas em estudos envolvendo o BaP, sendo as principais – em número de estudos – *X. laevis* e *P. waltl* (Tabela 1). Independente do grupo avaliado (Anura ou Caudata), estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a capacidade desses vertebrados em metabolizar o BaP, sendo gerados metabólitos como: dióis (e.g. BaP-7,8-diol), fenóis e quinonas (Busbee et al., 1978; Marty et al., 1989). A respeito do BaP-7,8-diol, ele é precursor do BaP-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE), considerado o metabólito carcinogênico final, que tem capacidade de reagir com o DNA, formando adutos (Sims et al., 1974; Barnes et al., 2018). Dessa forma, os anfíbios têm a capacidade de metabolizar o BaP para formas precursoras de compostos carcinogênicos, que podem causar diferentes efeitos adversos. Ao longo dessa revisão, abordamos diferentes efeitos desencadeados pelo BaP, que estão sumarizados na Tabela 6, sendo os principais estudos relacionados ao componente genético dos animais (ênfase nos danos no DNA avaliado pela técnica de micronúcleo, *ver item 7.4.*), seguido por alterações histológicas e histopatológicas. A concentração mínima para causar essas alterações é de 0.05 µg/L (ou 50 ng/L), que é inferior a valores estabelecidos pelo CONAMA (2009) e pela CETSb (2016) –

0.7 µg/L – que podem causar prejuízos à saúde humana. Os danos ocasionados pelo BαP ocorrem a partir de uma rápida exposição (≤ 1 hora), podendo ser revertidos ao cessar a exposição (Morse et al., 1996). Entretanto, em uma exposição contínua e duradoura, que pode representar um cenário real da vida dos anfíbios, os danos são irreversíveis e comprometem as gerações subsequentes (Regnault et al., 2018; Usal et al., 2021). Apesar de não abordarmos um tópico diretamente relacionado à como o desenho experimental altera os efeitos do BαP, observamos que os diferentes parâmetros utilizados (espécie, estágio de desenvolvimento, dose, tempo de exposição, via de administração, fatores bióticos e abióticos e alimentação) influenciam diretamente nos efeitos do composto. Esperamos que essa revisão auxilie na elaboração e na criação de futuros estudos envolvendo a exposição de anfíbios ao BαP.

TABELAS

Tabela 1 – Espécies de anfíbios utilizadas nos estudos com benzo(α)pireno.

Ordem	Família	Espécie	Referência
Anura	Bufonidae	<i>Bufo americanus</i> ^a	[25, 34]
		<i>Bufo arenarum</i> ^b	[81]
		<i>Bufo bufo japonicus</i> ^c	[92]
	Hylidae	<i>Hypsiboas albopunctatus</i> ^d	[33, 40]
	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	[33, 38]
		<i>Physalaemus cuvieri</i>	[33, 38, 39]
		<i>Physalaemus nattereri</i>	[33, 132]
		<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	[105]
	Ranidae	<i>Rana catesbeiana</i> ^e	[92, 119]
		<i>Rana esculenta</i> ^f	[101]
		<i>Rana nigromaculata</i> ^g	[92]
		<i>Rana pipiens</i> ^h	[24, 34, 37, 117, 125]
		<i>Rana temporaria</i>	[82]
		<i>Xenopus laevis</i>	[9, 11, 21, 28, 29, 48, 52, 64, 74, 83, 88, 89, 92, 96, 99, 109, 110, 133, 140]
		<i>Xenopus tropicalis</i>	[103-105, 129-127]
Caudata	Ambystomatidae	<i>Ambystoma mexicanum</i>	[48, 68]
		<i>Ambystoma tigrinum</i>	[4, 20]
		<i>Cynops pyrrhogaster</i>	[128]
		<i>Pleurodeles waltl</i>	[35, 45-48, 58, 59, 62, 67, 84-86, 120]
	Salamandridae	<i>Triturus alpestris</i> ⁱ	[136]
		<i>Triturus cristatus</i>	[5-7, 118]
		<i>Triturus viridescens</i> ^j	[15]

a: Sinônimo de *Anaxyrus americanus*b: Sinônimo de *Rhinella arenarum*c: Sinônimo de *Bufo japonicus*d: Sinônimo de *Boana albopunctata*e: Sinônimo de *Lithobates catesbeianus*f: Sinônimo de *Pelophylax lessonae*g: Sinônimo de *Pelophylax nigromaculatus*h: Sinônimo de *Lithobates pipiens*i: Sinônimo de *Ichthyosaura alpestris*j: Sinônimo de *Notophthalmus viridescens*

Tabela 2 – Concentrações de benzo(α)pireno utilizadas, apresentadas na mesma unidade de medida do experimento.

Unidade	Concentração		Referência
	mínima	máxima	
ppm	0.004	4	[35, 45, 46, 48, 62, 67, 68, 84, 120, 133]
cc.	0.005	0.02	[15]
nM	31	496	[109]
μ M	1.32×10^{-5}	13.2	[21, 110, 119]
mM	0.064		[117]
nmol/L	10		[140]
μ g/mL	0.02	2.5	[20, 25, 34, 85, 96]
ng/L	50		[102, 129-131]
μ g/L	5	500	[28, 47, 59, 74, 82, 83, 103-105]
mg	1.5	2	[9, 37]
mg/ μ L	0.166		[86]
mg/mL	1	2	[5-7]
mg/L	0.01	10	[88, 89]
μ g/g	125		[64]
mg/g	0.1	1.35	[28, 58]
mg/Kg	2	100	[29, 33, 38-40, 132]

Tabela 3 – Diluição do benzo(α)pireno.

Composto	Referência
Acetona	[58]
Alcatrão	[15]
Benzeno	[119, 140]
Butirina	[5]
Dimetilsulfóxido	[11, 21, 24, 28, 29, 35, 45-48, 52, 59, 62, 67, 68, 74, 82, 84-86, 88, 89, 99, 102, 109, 110, 120, 129-131, 133]
Etanol	[103-105]
Gordura/Suspensão coloidal	[37]
Hexano	[84, 86]
Óleo vegetal	[6, 7, 28, 64, 118]
Óleo mineral	[33, 38-40, 132]
Propilenoglicol	[5]
Trietilenoglicol	[83]
Vaselina	[15]

Tabela 4 – Tempo de exposição ao benzo(α)pireno.

Unidade	Tempo		Referência
	mínimo	máximo	
Minutos	2	30	[20, 58, 119]
Horas	1	24	[21, 25, 28, 34, 38, 64, 74, 86, 88, 89, 103-105, 109, 132]
Dias	2	90	[5-7, 9, 11, 15, 21, 28, 29, 33, 35, 37-40, 41-48, 52, 58, 59, 62, 67, 68, 81-86, 89, 96, 99, 105, 109, 110, 118-120, 128, 132, 133]
Meses	4	12	[9, 102, 128-131]

Tabela 5 – Via de exposição ao benzo(α)pireno.

Via	Referência
Aquosa	[11, 20, 21, 25, 34, 35, 45-48, 52, 58, 59, 62, 67, 68, 74, 82, 83, 84, 88, 89, 96, 99, 102-105, 109, 110, 119, 120, 129-131, 133, 140]
Cutânea	[132]
Injetável	[5-7, 15, 28, 29, 33, 37-40, 64, 86, 118, 132]
Intra-corpórea	[9]
Oral	[132]

Tabela 6 – Resumo dos efeitos adversos do benzo(α)pireno. No caso da dose, os valores de concentração foram convertidos para uma mesma unidade ($\mu\text{g/Kg}$ ou $\mu\text{g/L}$).

Efeito	Dose ($\mu\text{g/Kg}$ ou $\mu\text{g/L}$)		Análise	Referência
	mínima	máxima		
Anatômico	12.5	10^{+6}	Mal-formação & Patologia	[7, 9, 15, 47, 52, 84, 128]
Desenvolvimento		$2.50 \times 10^{+6}$	Hormônios tireoideanos	[119, 140]
		0.05	Maturidade sexual	[102, 130]
	0.05	62	Metamorfose	[102, 109, 130]
Genético	4	$125 \times 10^{+3}$	DNA	[21, 35, 37, 39, 45-48, 59, 62, 64, 67, 68, 74, 82, 84, 85, 88, 89, 96, 109, 120, 133]
	0.05	10	Expressão gênica	[102-104, 130]
Histológico	0.05	10^{+6}	Histopatologia	[5-7, 10, 37, 40, 84, 102-104, 118, 130]
	10	7000	Células pigmentares	[33, 38-40, 104, 132]
Imunológico	8.36	309.47	Genes Pró-Inflamatórios	[83]
		2000	Mastócitos	[38, 132]

REFERÊNCIAS

- [1] Agius, C.; Agbede, S.A. 1984. An electron microscopical study on the Genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, 24: 471-488. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>
- [2] Agius, C.; Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, 26: 499-509. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- [3] Allender, M.C.; Fry, M.M. 2008. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, 11: 463-480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.006>
- [4] Anderson, R.S.; Döös, J.E.; Rose, F.L. 1982. Differential ability of *Ambystoma tigrinum* hepatic microsomes to produce mutagenic metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines. **Cancer Letters**, 16: 33-41. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(82\)90088-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(82)90088-X)
- [5] Arffmann, E. 1962. Studies on the newt test for carcinogenicity: 2. tributyrin and propylene glycol as solvents. **Acta Pathologica Microbiologica**, 55: 281-288. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1962.tb04127.x>
- [6] Arffmann, E. 1963. Studies on the newt test for carcinogenicity: 3. non-carcinogenic and weak carcinogenic hydrocarbons. **Acta Pathologica Microbiologica**, 57: 375-394. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1963.tb05106.x>
- [7] Arffmann, E.; Christensen, B.C. 1961. Studies on the newt test for carcinogenicity: 1. benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and 3-methylcholanthrene. **Acta Pathologica Microbiologica**, 52: 330-342. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1961.tb03201.x>
- [8] Bachmann, K. 2009. Drug Metabolism. In: Hacker, M.; Messer, W.; Bachmann, K. (eds.). **Pharmacology: principles and practice**. Academic Press, p. 131-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00008-7>
- [9] Balls, M. 1964. Benzpyrene-Induced tumours in the clawed toad, *Xenopus laevis*. **Experientia**, 20: 143-145. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02150702>
- [10] Balls, M.; Ruben, L.N. 1964. A review of the chemical induction of neoplasms in amphibian. **Experientia**, 20: 241-296. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02151781>
- [11] Bantle, J.A. 1995. FETAX – a developmental toxicity assay using frog embryos. In: Rand, G.M. (Ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Second Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- [12] Barnes, J.L.; Zubair, M.; John, K.; Poirier, M.C.; Martin, F.L. 2018. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, 46: 1213-1224. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
- [13] Barni, S.; Boncompagni, E.; Grosso, A.; Bertone, V.; Freitas, I.; Fasola, M.; Fenoglio, C. 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic toxicology**, 81: 45-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>
- [14] Bartsch, H. 1996. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. **Mutation Research**, 340: 67-79. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90040-8](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90040-8)
- [15] Breedis, C. 1952. Induction of accessory limbs and of sarcoma in the newt (*Triturus viridescens*) with carcinogenic substances. **Cancer Research**, 12: 861-866.
- [16] Brinkmann, J.; Stolpmann, K.; Trappe, S.; Otter, T.; Genkinger, D.; Bock, U.; Liebsch, M.; Henkler, F.; Hutzler, C.; Luch, A. 2013. Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. **Toxicological Sciences**, 131: 351-359. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs316>
- [17] Brodeur, J.C.; Vera-Candiotti, J. 2017. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the pampa region of Argentina. In: Larramendy, M.L. (ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models**. The Royal Society of Chemistry, p. 163-194. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00163>
- [18] Bukowska, B.; Mokra, K.; Michalowicz, J. 2022. Benzo[a]pyrene – environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, 23: 6348. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116348>
- [19] Burlibaşa, L.; Gavrilă, L. 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology and Environmental Research**, 9: 1-15. DOI: https://doi.org/10.15666/aeer/0901_001015
- [20] Busbee, D.L.; Guyden, J.; Kingston, T.; Rose, F.L.; Cantrell, E.T. 1978. Metabolism of benzo(a)pyrene in animals with high aryl hydrocarbon hydroxylase levels and high rates of spontaneous cancer. **Cancer letters**, 4: 61-67. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(78\)93467-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(78)93467-5)
- [21] Camatini, M.; Bonfanti, P.; Colombo, A.; Urani, C.; Crippa, S. 1999. Cellular and molecular targets of benzo[a]pyrene and metal toxicity in *Xenopus laevis* embryos and in Hep G2 cells. **Alternatives to Laboratory Animals**, 27: 325-337. DOI: <https://doi.org/10.1177/026119299902700321>

- [22] Caruso, M.S.F.; Alaburda, J. 2008. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 67: 1-27. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2008.v67.32785>
- [23] CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Decisão de diretoria nº 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016. Dispõe sobre a aprovação dos “valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo – 2016” e dá outras providências. **Diário Oficial Estado de São Paulo**: Caderno Executivo I (Poder Executivo, seção 1) n. 126, p. 55-56, 24 nov. 2016. Disponível em: <https://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016-Intranet.pdf>
- [24] Cheh, A.M.; Hooper, A.B.; Skochdopole, J.; Henke, C.A.; McKinnell, R.G. 1980. A comparasion of the ability of frog and rat S-9 to activate promutagens in the Ames test. **Environmental Mutagenesis**, 2: 487-508. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860020407>
- [25] Clark, H.F.; Diamond, L. 1971. Comparative studies in the interaction of benzpyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. II. Effect of temperature on benzpyrene metabolism and cell multiplication. **Journal of Cellular Physiology**, 77: 385-392. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.1040770313>
- [26] Claver, J.A.; Quaglia, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, 18: 87-97. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>
- [27] Collins, A.R. 2002. The Comet Assay. In: Didenko, V.V. (Ed.) In situ detection of DNA damage. *Methods in molecular biology*, v. 203. Humana Press. pp. 163-177. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163>
- [28] Colombo, A.; Bonfanti, P.; Ciccotelli, M.; Doldi, M.; Dell’Orto, N.; Camatini, M. 1996. Induction of cytochrome P4501A isoform in *Xenopus laevis* is a valid tool for monitoring the exposure to benzo[a]pyrene. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, 5: 207-211. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00124108>
- [29] Colombo, A.; Bonfanti, P.; Orsi, F.; Camatini, M. 2003. Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hydrocarbon receptor agonists and thyroid hormone in *Xenopus laevis* liver and intestine. **Aquatic Toxicology**, 63: 173-186. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00178-9](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00178-9)
- [30] CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009 [Alterada pela Resolução CONAMA nº 460/2013 (altera o prazo do art. 8º, e acrescenta novo parágrafo)]. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de

atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**: n. 249, p. 81-84, 30 dez. 2009. Disponível em: http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=601

[31] Crivellato, E.; Travan, L.; Ribatti, D. 2015. The phylogenetic profile of mast cells. **Methods in Molecular Biology**, 1220: 11-27. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_2

[32] Das, M.; Mahapatra, P.K. 2012. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). **The Scientific World Journal**, 2012. doi:10.1100/2012/701746

[33] De Oliveira, C.; Franco-Belussi, L.; Fanali, L.Z.; Santos, L.R.S. 2017. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects os agrachemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. In: Larramendy, M.L. (ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models**. The Royal Society of Chemistry, p. 123-142. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00123>

[34] Diamond, L.; Clark, H.F. 1970. Comparative studies on the interaction of benzo[a]pyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I. Metabolism of benzo[a]pyrene. **Journal of the National Cancer Institute**, 45: 1005-1012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/45.5.1005>

[35] Djomo, J.E.; Ferrier, V.; Gauthier, L.; Zoll-Montreux, C.; Marty, J. 1995. Amphibian micronucleus test *in vivo*: evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. **Mutagenesis**, 10: 223-226. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/10.3.223>

[36] Dubey, S.; Roulin, A. 2014. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 27: 327-338. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12231>

[37] Duran-Reynals, F. 1939. A note on the action of some carcinogenic hydrocarbons on amphibian. **Yale Journal of Biology and Medicine**, 11: 613-617.

[38] Fanali, L.Z.; Franco-Belussi, L.; Bonini-Domingos, C.R.; De Oliveira, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollutions**, 237: 93-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>

[39] Fanali, L.Z.; Sturve, J.; De Oliveira, C. 2021. Exposure of *Physalaemus cuvieri* (Anura) to benzo[a]pyrene and α -naphthoflavone: morphofunctional effects on hepatic melanomacrophages and erythrocytes abnormalities. **Environmental Pollution**, 285: 117526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117526>

- [40] Fanali, L.Z.; Valverde, B.S.L.; Franco-Belussi, L.; Provete, D.B.; De Oliveira, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[α]pyrene. **Amphibia-Reptilia**, 38: 175-185. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-00003101>
- [41] Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)
- [42] Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2: 1084-1104. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- [43] Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A. T.; Surrallés, J.; Crott, J.W.; Parry, J.; Norppa, H.; Eastmond, D.A.; Tucker, J.D.; Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26: 125-132. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- [44] Fenoglio, C.; Boncompagni, E.; Fasola, M.; Gandini, C.; Comizzoli, S.; Milanesi, G.; Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60: 259-268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>
- [45] Fernandez, M.; Gauthier, L.; Jaylet, A. 1989. Use of newt larvae for *in vivo* genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by the micronucleus test. **Mutagenesis**, 4: 17-26. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.17>
- [46] Fernandez, M.; Jaylet, A. 1987. An antioxidant protects against the clastogenic effects of benzo[a]pyrene in the newt *in vivo*. **Mutagenesis**, 2: 293-297. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/2.4.293>
- [47] Fernandez, M.; L'Haridon, J. 1994. Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 24: 124-136. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2850240208>
- [48] Fernandez, M.; L'Haridon, J.; Gauthier, L.; Zoll-Montreux, C. 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating *in vivo* genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 292: 83-99. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(93\)90010-W](https://doi.org/10.1016/0165-1161(93)90010-W)
- [49] Fernandes, I.F.; Utsunomiya, H.S.M.; Valverde, B.S.L.; Ferraz, J.V.C.; Fujiwara, G.H.; Gutierrez, D.M.; Oliveira, C.; Franco-Belussi, L.; Fernandes, M.N.; Carvalho, C.S. 2021. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Chemosphere**, 275. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>

- [50] Ferrier, V.; Gauthier, L.; Zoll-Montreux, C.; L'Haridon, J. 1998. Genotoxicity tests in amphibians – a review. *In*: Wells, P.G.; Lee, K.; Blaise, C.; Gauthier, J. **Microscale testing in aquatic toxicology**. CRC Press, p. 507-519. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780203747193-35>
- [51] Fort, D.J.; Dawson, D.A.; Bantle, J.A. 1988. Development of a Metabolic Activation System for the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX). **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 8: 251-263. DOI: <https://doi.org/10.1002/tcm.1770080502>
- [52] Fort, D.J.; James, B.L.; Bantle, J.A. 1989. Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX) and a metabolic activation system. **Journal of Applied Toxicology**, 9: 377-388. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2550090603>
- [53] Franco-Belussi, L.; Fanali, L.Z.; De Oliveira, C. 2018. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 180: 109-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>
- [54] Franco-Belussi, L.; Santos, L.R.S.; Zieri, R.; Oliveira, C. 2011. Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): occurrence and comparasion. **Zoologischer Anzeiger**, 250: 102-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2010.12.001>
- [55] Franco-Belussi, L.; Sköld, H.N.; Oliveira, C. 2016 Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, 219: 1378-1383. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>
- [56] Frost, D.R. 2021. Amphibian species of the worl: an online reference. Version 6.1 (data de acesso 11/07/2022). DOI: <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>
- [57] Galli, S. J.; Wershil, B. K. 1996. The two faces of the mast cell. **Nature**, 381: 21-22. DOI: <https://doi.org/10.1038/381021a0>
- [58] Garrigues, P.; Djomo, J.E.; Ferrier, V.; Dauta, A.; Monkiedje, A.; Mvondo Ze, A.; Narbonne, J.F. 2004. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated sediment by the amphibian larvae (*Pleurodeles waltl*). **Polycyclic Aromatic Compounds**, 24: 207-219. DOI: <https://doi.org/10.1080/10406630490460692>
- [59] Godet, F.; Babut, M.; Burnel, D.; Veber, A.-M.; Vasseur, P. 1996. The genotoxicity of iron and chromium in electroplating effluents. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 370: 19-28. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90123-8](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90123-8)

- [60] Gregorio, L.S.; Franco-Belussi, L.; Gomes, F.R.; De Oliveira, C. 2016. Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical anura, *Rhinella schneideri*. **Aquatic Toxicology**, 176: 181-189. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.022>
- [61] Gregorio, L.S.; Freitas, J.S.; Franco-Belussi, L.; De Oliveira, C. 2018. LPS-induced alterations in reproductive organs and liver pigmentation in *Rhinella diptycha* (Bufonidae) toads. **Canadian Journal of Zoology**, 96. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0012>
- [62] Grinfeld, S.; Jaylet, A.; Siboulet, R.; Deparis, P.; Chouroulinkov, I. 1986. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene: dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug. **Environmental Mutagenesis**, 8: 41-51. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860080105>
- [63] Gutierrez, R.C.; Jared, C.; Antoniazzi, M.M.; Coppi, A.A.; Egami, M.I. 2018. Melanomacrophage functions in the liver of the caecilian *Siphonops annulatus*. **Journal of Anatomy**, 232: 497-508. DOI: <https://doi.org/10.1111/joa.12757>
- [64] Höhn-Bentz, J.; Kurelec, B.; Zahn, R. 1983. Fast ephemeral DNA damage upon B α P injection. **The Science of the Total Environment**, 32: 13-27. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(83\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(83)90129-8)
- [65] Hoogdujin, M.J.; Cemeli, E.; Ross, K.; Anderson, D.; Thody, A.J.; Wood, J.M. 2004. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, 294: 60-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.007>
- [66] IARC (International Agency for Research on Cancer). Bitumens and bitumen emissions and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, v. 103, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294234/>
- [67] Jaylet, A.; Deparis, P.; Ferrier, V.; Grinfeld, S.; Siboulet, R. 1986a. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. **Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 164: 245-257. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(86\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0165-1161(86)90058-0)
- [68] Jaylet, A.; Deparis, P.; Gaschignard, D. 1986b. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents. **Mutagenesis**, 1: 211-215. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/1.3.211>
- [69] Johanning, K.; Hancock, G.; Escher, B.; Adekola, A.; Bernhard, M.J.; Cowan-Ellsberry, C.; Domoradzki, J.; Dyer, S.; Eickhoff, C.; Embry, M.; Erhardt, S.; Fitzsimmons, P.; Halder, M.; Hill, J.; Holden, D.; Johnson, R.; Rutishauser, S.; Segner, H.; Schultz, I.; Nichols, J. 2012. Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) liver S9 fraction. **Current Protocols in Toxicology**, 53: 14.10.1-14.10.28. Doi: <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1410s53>

[70] Joo, D.H.; Cha, H.J.; Kim, K.; Jung, M.; Ko, J.M.; An, I.S.; Lee, S.N.; Jang, H.H.; Bae, S.; Roh, N.K.; Ahn, K.J.; An, S. 2015. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. **Molecular & Cellular Toxicology**, 11: 349-355. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13273-015-0035-1>

[71] Josende, M.E.; Tozetti, A.M.; Alalan, M.T.; Mathies Filho, V.; Ximenez, S.S.; Silva Júnior, F.M.R.; Martins, S.E. 2015. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, 49: 83-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>

[72] Juhasz, A. L.; Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 45: 57-88. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)

[73] Kaiser, P.; Rothwell, L.; Avery, S.; Balu, S. 2004. Evolution of the interleukins. **Developmental and Comparative Immunology**, 28: 375-394. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.004>

[74] Kennerley, G.A.; Parry, J.M. 1994. Analysis of benzo[a]pyrene induced mutations by the use of restriction-site mutation assays in aquatic species. **Mutation Research/Fundamental and Molecular of Mutagenesis**, 307: 223-228. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90295-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90295-X)

[75] Kranz, H. 1989. Changes in splenic melano-macrophage centers of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, 6: 167-173. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao006167>

[76] Larsson, B.S. 1993. Interaction between chemicals and melanin. **Pigment Cell Research**, 6: 127-133. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x>

[77] Lindquist, N.G.; Larsson, B.S.; Lydén-Sokolowski, A. 1987. Neuromelanin and its possible protective and destructive properties. **Pigment Cell Research**, 1: 133-136. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1987.tb00403.x>

[78] Lindquist, N.G.; Larsson, B.S.; Lydén-Sokolowski, A. 1988. Autoradiography of [¹⁴C]paraquat or [¹⁴C]diquat in frogs and mice: accumulation in neuromelanin. **Neuroscience Letters**, 93: 1-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90002-X)

[79] Mann, M.; Bidwell, J. 1999. Toxicological issues for amphibians in Australia. In: Campbell, A. (ed.). **Declines and disappearances of Australian frogs**. Environment Australia, pp. 185-201.

- [80] Mann, R.M.; Hyne, R.V.; Choung, C.B.; Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, 157: 2903-2927. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.05.015
- [81] Matos, E.L.; Lustig, E.S. 1973. Teratogenic effects of carcinogen implantation in a regenerative field in *Bufo arenarum* tadpoles. **Teratology**, 8: 167-174. DOI: <https://doi.org/10.1002/tera.1420080209>
- [82] Marquis, O.; Miaud, C.; Ficetola, G.F.; Bocher, A.; Mouchet, F.; Guittonneau, S.; Devaux, A. 2009. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. **Aquatic Toxicology**, 95: 152-161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.001>
- [83] Martini, F.; Fernández, C.; Tarazona, J.V.; Pablos, M.V. 2012. Gene expression of heat shock protein 70, interleukin-1 β and tumor necrosis factor α as tools to identify immunotoxic effects on *Xenopus laevis*: a dose-response study with benzo[a]pyrene and its degradation products. **Environmental Pollution**, 160: 28-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.016>
- [84] Marty, J.; Djomo, J.E.; Bekaert, C.; Pfohl-Leszkowicz, A. 1998. Relationships between formation of micronuclei and DNA adducts and EROD activity in newts following exposure to benzo(a)pyrene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 32: 397-405. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1998\)32:4<397::AID-EM14>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1998)32:4<397::AID-EM14>3.0.CO;2-U)
- [85] Marty, J.; Lesca, P.; Jaylet, A.; Ardourel, C.; Rivière, J.L. 1989. *In vivo* and *in vitro* metabolism of benzo(a)pyrene by the larva of the newt, *Pleurodeles waltl*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, 93: 213-219. DOI: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90223-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90223-5)
- [86] Marty, J.; Michel, X.R.; Narbonne, J.F.; Ferrier, V. 1995. *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in a lower vertebrate, the newt *Pleurodeles waltl*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 32: 51-57. DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1084>
- [87] Mcnamara, M.E.; Rossi, V.; Slater, T.S.; Rogers, C.S.; Ducrest, A.-L.; Dubey, S.; Roulin, A. 2021. Decoding the evolution of melanin in vertebrates. **Trends in Ecology & Evolution**, 36: 430-443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.012>
- [88] Morse, H.R.; Jones, N.J.; Peltonen, K.; Harvey, R.G.; Waters, R. 1996. The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo[a]pyrene in developing *Xenopus laevis* larvae. **Mutagenesis**, 11: 101-109. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/11.1.101>
- [89] Mouchet, F.; Gauthier, L.; Mailhes, C.; Ferrier, V.; Devaux, A. 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*)

using benzo[a]pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. **Environmental Toxicology**, 20: 74-84. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.20080>

[90] Netto, A.D.P.; Moreira, J.C.; Dias, A.E.X.O.; Arbilla, G.; Ferreira, L.F.V.; Oliveira, A.S.; Barek, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química Nova**, 23: 765-773. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000600010>

[91] Niuwkoop, P.D.; Faber, J. 1975. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publishing Company, Amesterdam.

[92] Noshiro, M.; Omura, T. 1984. Microsomal monooxygenase system in frog livers. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, 77: 761-767. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90310-9)

[93] Olker, J.H.; Elonen, C.M.; Pilli, A.; Anderson, A.; Kinziger, B.; Erickson, S.; Skopinski, M.; Pomplun, A.; LaLone, C.A.; Russom, C.L.; Hoff, D. 2022. The ECOTOXicology knowledgebase: a curated database of ecologically relevant toxicity test to support environmental research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 41: 1520-1539. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5324>
Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ecotox/explore.cfm>

[94] Penning, T.M. 2004. Aldo-keto reductase and formation of polycyclic aromatic hydrocarbons *o*-quinones. **Methods in Enzymology**, 378: 31-67. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)78003-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78003-9)

[95] Pérez-Iglesias, J. M.; Franco-Belussi, L.; Moreno, L.; Tripole, S.; Oliveira, C.; Natale, G. S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 23: 9852-9861. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>

[96] Pfohl-Leszkowicz, A.; Masfaraud, J.F.; Weber-Lotfi, F.; Marty, J.; Guillemaut, P.; Castegnaro, M. 1996. Comparison of animal and plant DNA-adducts after exposure to benzo(a)pyrene. **Polycyclic Aromatic Compounds**, 10: 323-331. DOI: <https://doi.org/10.1080/10406639608034713>

[97] Pinelli, C.; Santillo, A.; Baccari, G.C.; Monteforte, R.; Rastogi, R.K. 2010. Mast cells in the amphibian brain during development. **Journal of Anatomy**, 216: 397-406. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01191.x>

[98] Pollo, F.E.; Bionda, C.L.; Salinas, Z.A.; Salas, N.E.; Martino, A.L. 2015. 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**, 187: 581. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>

[99] Propst, T.L.; Fort, D.J.; Stover, E.L.; Schrock, B.; Bantle, J.A. 1997. Evaluation of the developmental toxicity of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene using *Xenopus*: modes of biotransformation. **Drug and Chemical Toxicology**, 20: 45-61. DOI: <https://doi.org/10.3109/01480549709011078>

[100] Purrello, M.; Scalia, M.; Corsaro, C.; Di Pietro, C.; Piro, S.; Sichel, G. 2001. Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in kupffer cells from *Rana esculenta*. **Pigment Cell Research**, 14: 126-131. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140208.x>

[101] Rankouhi, T.R.; Koomen, B.; Sanderson, J.T.; Bosveld, A.T.C.; Seinen, W.; Van Den Berg, M. 2005. Induction of ethoxy-resorufin-*O*-deethylase activity by halogenated aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in primary hepatocytes of the green frog (*Rana esculenta*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 24: 1428-1435. DOI: <https://doi.org/10.1897/04-367R.1>

[102] Regnault, C.; Usal, M.; Veyrenc, S.; Couturier, K.; Batandier, C.; Bulteau, A.-L.; Lejon, D.; Sapin, A.; Combourieu, B.; Chetiveaux, M.; May, C.L.; Lafond, T.; Raveton, M.; Reynaud, S. 2018. Unexpected metabolic disorders induced by endocrine disruptors in *Xenopus tropicalis* provide new lead for understanding amphibian decline. **PNAS**, 15: 4416-4425. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1721267115>

[103] Regnault, C.; Willison, J.; Veyrenc, S.; Airieau, A.; Méresse, P.; Fortier, M.; Fournier, M.; Brousseau, P.; Raveton, M.; Reynaud, S. 2016. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. **Chemosphere**, 155: p. 519-527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.047>

[104] Regnault, C.; Worms, I.A.M.; Oger-Desfeux, C.; Melodelima, C.; Veyrenc, S.; Bayle, M.-L.; Combourieu, B.; Bonin, A.; Renaud, J.; Raveton, M.; Reynaud, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. **BMG Genomics**, 15: 666. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-666>

[105] Reynaud, S.; Worms, I.A.M.; Veyrenc, S.; Portier, J.; Maitre, A.; Miaud, C.; Raveton, M. 2012. Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). **Environmental Pollution**, 161: 206-214. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.029>

[106] Riley, P.A. 1997. Melanin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 29: 1235-1239. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7)

[107] Robert, J.; Goyos, A.; Nedelkovska, H. 2009. *Xenopus*, a unique comparative model to explore the role of certain heat shock proteins and non-classical MHC class Ib gene products

in immune surveillance. **Immunologic Research**, 45: 114-122. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8094-9>

[108] Roberto, A.; Larsson, B. S.; Tjälve, H. 1996. Uptake of 7, 12-dimethylbenzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. **Pharmacology & Toxicology**, 79: 92-99. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00248.x>

[109] Sadinski, W.J.; Levay, G.; Wilson, M.C.; Hoffman, J.R.; Bodell, W.J.; Anderson, S.L. 1995. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology**, 32: 333-352. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00092-5)

[110] Saka, M. 2004. Developmental toxicity of *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23: 1065-1073. DOI: <https://doi.org/10.1897/03-272>

[111] Santos A.T.; Valverde, B.S.L.; De Oliveira, C.; Franco-Belussi, L. 2021. Genotoxic and melanin alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. **Environmental Science and Pollution Research**, 28: 20072-20081. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w>

[112] Santos, L.R.S.; Franco-Belussi, L.; Zieri, R.; Borges, R.E.; Oliveira, C. 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, 297: 864-875. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.22884>

[113] Scadding, S.R. 1977. Phylogenic distribution of limb regeneration capacity in adult *Amphibia*. **Journal of Experimental Zoology**, 202: 57-68. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402020108>

[114] Scadding, S.R. 1981. Limb regeneration in adult amphibia. **Canadian Journal of Zoology**, 59: 34-46. DOI: <https://doi.org/10.1139/z81-007>

[115] Schärer, O.D. 2003. Chemistry and biology of DNA repair. **Angewandte Chemie International Edition**, 42: 2946-2974. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200200523>

[116] Scharl, M.; Larue, L.; Goda, M.; Bosenberg, M.W.; Hashimoto, H.; Kelsh, R.N. 2016. What is a vertebrate pigment cell? **Pigment Cell & Melanoma Research**, 29: 8-14. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12409>

[117] Schwen, R.J.; Mannering, G.J. 1982. Hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems of the trout, frog and snake – II. Monooxygenase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 71: 437-443. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90406-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90406-0)

- [118] Seilern-Aspang, F.; Kratochwil, K. 1962. Induction and differentiation of an epithelial tumor in the newt (*Triturus cristatus*). **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, 10: 337-356. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.10.3.337>
- [119] Shimada, N.; Yamauchi, K. 2004. Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T₃ response. **Journal of Endocrinology**, 183: 627-637. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05893>
- [120] Siboulet, R.; Grinfeld, S.; Deparis, P.; Jaylet, A. 1984. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* Michah: induction with X-rays and chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 125: 275-281. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(84\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(84)90077-0)
- [121] Sichel, G. 1988. Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. **Pigment Cell Research**, 1: 250-258. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1988.tb00423.x>
- [122] Sichel, G.; Scalia, M.; Mondio, F.; Corsaro, C. 1997. The amphibian kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**, 10: 271-287. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1997.tb00687.x>
- [123] Sims, P.; Grover, P.L.; Swaisland, A.; Pal, K.; Hewer, A. 1974. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. **Nature**, 252: 326-328. DOI: <https://doi.org/10.1038/252326a0>
- [124] Steinel, N.C.; Bolnick, D.I. 2017. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, 8: 827 DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- [125] Strauss, E.; Mateyko, G.M. 1964. Chemical induction of neoplasms in the kidney of *Rana pipiens*. **Cancer Research**, 24: 1969-1977.
- [126] Strobel, A.; Burkhardt-Holm, P.; Schmid, P.; Segner, H. 2015. Benzo(a)pyrene metabolism and EROD and GST biotransformation activity in the liver of red- and white-blooded Antarctic fish. **Environmental Science & Technology**, 49: 8022-8032. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00176>
- [127] Trudeau, V.L.; Thomson, P.; Zhang, W.S.; Reynaud, S.; Navarro-Martin, L.; Langlois, V.S. 2020. Agrochemicals disrupt endocrine axes in amphibians. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 513: 110861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>
- [128] Tsonis, P.A.; Eguchi, G. 1982. Abnormal limb regeneration without tumor production in adult newts directed by carcinogens, 20-methylcholanthrene and benzo(α)pyrene.

Development Growth & Differentiation, 24: 183-190. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1982.00183.x>

[129] Usal, M.; Regnault, C.; Veyrenc, S.; Couturier, K.; Batandier, C.; Bulteau, A.-L.; Lejon, D.; Combourieu, B.; Lafond, T. 2019. Concomitant exposure to benzo[a]pyrene and triclosan at environmentally relevant concentrations induces metabolic syndrome with multigenerational consequences in *Silurana (Xenopus) tropicalis*. **Science of the Total Environment**, 689: 149-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.386>

[130] Usal, M.; Veyrenc, S.; Darracq-Ghitalla-Ciock, M.; Regnault, C.; Sroda, S.; Fini, J.-B.; Canlet, C.; Tremblay-Franco, M.; Raveton, M.; Reynaud, S. 2021. Transgenerational metabolic disorders and reproductions defects induced by benzo[a]pyrene in *Xenopus tropicalis*. **Environmental Pollution**, 269: 116109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116109>

[131] Usal, M.; Veyrenc, S.; Darracq-Ghitalla-Ciock, M.; Regnault, C.; Sroda, S.; Fini, J.-B.; Raveton, M.; Reynaud, S. 2022. Exposure to a mixture of benzo[a]pyrene and triclosan induces multi- and transgenerational metabolic disorders associated with decrease female investment in reproduction in *Siluriana (Xenopus) tropicalis*. **Environmental Pollution**, 292: 118418. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118418>

[132] Valverde, B.S.L.; Utsunomiya, H.S.M.; Carvalho, C.S.; Franco-Belussi, L.; De Oliveira, C. 2022. Response of hepatic biomarkers in *Physlaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes. **Ecotoxicology**, 31: 516-523. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>

[133] Van Hummelen, P.; Zoll, C.; Paulussen, J.; Kirsch-Volders, M.; Jaylet, A. 1989. The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple ‘*in vivo*’ technique for detection of mutagens in fresh water. **Mutagenesis**, 4: 12-16. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.12>

[134] Verma, N.; Pink, M.; Rettenmeier, A.W.; Schmitz-Spanke, S. 2012. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. **Proteomics**, 12: 1731-1755. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201100466>

[135] Vojinovic-Miloradov, M.; Buzarov, D.; Adamov, J.; Simic, S.; Popovic, E. 1996. Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. **Water Science and Technology**, 34: 7-8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00738-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00738-X)

[136] Waddington, C.H.; Goodhart, C.B. 1949. Location of absorbed carcinogens within the amphibian cell. **Journal of Cell Science**, 90: 209-219. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-90.10.209>

[137] Wallace, S.J.; de Solla, S.R.; Head, J.A.; Hodson, P.V.; Parrott, J.L.; Thomas, P.J.; Berthiaume, A.; Langlois, V.S. 2020. Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the

Canadian environment: exposure and effects on wildlife. **Environmental Pollution**, 265: 114863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114863>

[138] Walton, B. 1977. Letter to the editor: Indução enzimática nos microsossomas hepáticos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, 27: 123-125. Disponível em: <https://bjan-sba.org/ed/5f9d82e78e6f1adf058b4567>

[139] Williams, M.A; Salice, C.; Reddy, G. 2015. Wildlife toxicity assessment for benzo[a]pyrene. In: Williams, M.A; Reddy, G; Quinn, M.J.; Johnson, M.S. (eds.). **Wildlife toxicity assessments for chemicals of military concern**. Elsevier, p. 421-437. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800020-5.00024-7>

[140] Yamauchi, K.; Eguchi, R.; Shimada, N.; Ishihara, A. 2002. The effects of endocrine-disrupting chemicals on thyroid hormone binding to *Xenopus laevis* transthyretin and thyroid hormone receptor. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 40: 1250-1256. DOI: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.216>

[141] Zuasti, A.; Jara, J.R.; Ferrer, C.; Solano, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**, 2: 93-99. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1989.tb00168.x>

CAPÍTULO 2



Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo(a)pyrene exposure routes

Bruno Serra de Lacerda Valverde¹ · Heidi Samantha Moraes Utsunomiya² · Cleoni dos Santos Carvalho^{2,3} · Lilian Franco-Belussi⁴ · Classius de Oliveira⁵

Accepted: 2 February 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

For over 40 years, anurans have been used as a study model to assess the adverse effects of benzo(α)pyrene (BαP), which include genotoxic, hepatotoxic, and immunotoxic effects. In these studies, BαP is administered cutaneously or by injection, with no comparison between two or more routes. The purpose of this study is to assess whether the effect of BαP is influenced by its route of administration, using the response of hepatic biomarkers of *Physalaemus nattereri*. Specimens ($n = 108$) were collected and divided into three experimental treatments (cutaneous, injection, and oral) and three experimental times (one, three, and seven days). Specimens received 0.02 ml of pure mineral oil (control) or mineral oil containing 2 mg/kg of BαP. The BαP causes changes in morphological (melanin, hemosiderin, lipofuscin, and mast cells) and biochemical (superoxide dismutase and glutathione S-transferase) hepatic biomarkers. Compared to biochemical, morphological biomarkers underwent a greater number of significant changes due to the treatment with BαP. The route of exposure alters the effects of BαP, mainly seen in morphological biomarkers, especially the pigments melanin, hemosiderin, and lipofuscin. In these pigments, the effect of the exposure pathway changes according to the analyzed biomarker, and the exposure time modulates the exposure pathway effect. These results are unprecedented for anurans and contribute to the field of herpetology and ecotoxicology.

Keywords Glutathione S-transferase · Liver · Melanomacrophage · Polycyclic aromatic hydrocarbons · Superoxide dismutase

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of chemical compounds, formed during the incomplete burning of organic matter (Agency for Toxic Substances and

Disease Registry ATSDR 1985) – having natural origin (e.g., volcanic emissions and forest fires) or due to anthropogenic activity (e.g., exhaustion of cars and trucks, garbage incineration, and fossil fuel burning) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR 1985; Li and Chen 2002; Madureira et al. 2014). Among the more than 100 types of PAHs, 17 compounds stand out, as they are possibly more harmful than the others (Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR 1985), including benzo(α)pyrene (BαP).

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>.

✉ Bruno Serra de Lacerda Valverde
bruno-valverde@hotmail.com

¹ Graduate Program in Biodiversity, Department of Biology, São Paulo State University (UNESP), Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

² Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM), Rodovia João Leme dos Santos, Km 11, SP-264, 18052-780 Sorocaba, São Paulo, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos, Km 11, SP-264, 18052-780 Sorocaba, São Paulo, Brazil

⁴ Institute of Biosciences, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

⁵ Department of Biology, São Paulo State University (UNESP), Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

B α P is a group 1 carcinogen—carcinogenic to humans (International Agency for Research on Cancer IARC monographs 2012), found in all environmental compartments—aquatic (e.g., dissolved in water or adhered to organic matter) (Nasr et al. 2010) and terrestrial (e.g., air, soil, plants, and termites) (Wilcke et al. 2003; Gupta et al. 2011). To bring about carcinogenesis, B α P requires metabolic activation (Sims et al. 1974; Penning 2004). This activation occurs after its absorption by the body, which can be through the skin, by ingestion, or by inhalation (Netto et al. 2000), and generates secondary metabolites (Gelboin 1980) as well as reactive oxygen species (ROS) (Penning 2004; Saunders et al. 2006).

Since the 1980s, anurans have been used as an experimental model to assess the adverse effects of B α P. Until the 2000s, these studies focused on genotoxic damage (Höhn-Bentz et al. 1983; Van Hummelen et al. 1989; Sadinski et al. 1995; Mouchet et al. 2005). From 2010 onwards, studies began to emphasize physiological and morphological changes in the digestive system, especially in the liver (Reynaud et al. 2012; Regnault et al. 2014, 2016; Fanali et al. 2017, 2018). In these studies, anurans (tadpoles or adults) were exposed by a single route: cutaneous by aqueous exposure (Van Hummelen et al. 1989; Sadinski et al. 1995; Mouchet et al. 2005; Reynaud et al. 2012; Regnault et al. 2014, 2016) or injectable (Höhn-Bentz et al. 1983; Fanali et al. 2017, 2018), with no comparisons between two or more routes which represents an information gap for this group of vertebrates.

This work aims to evaluate the effect of B α P on hepatic biomarkers of *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) and whether this effect is influenced by the exposure route, using routes that simulate a natural (cutaneous and oral) or an artificial (injectable) exposure. Because the injectable route ensures the entry of the entire dose of the compound (Pérez-Iglesias et al. 2016), we hypothesize that this route will cause larger effects than the natural exposure routes. To assess the hepatic effects of exposure pathways, we will use biomarkers of different levels, frequently used in anurans, namely: morphological (melanin, hemosiderin, lipofuscin, and mast cells) and biochemical (catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase, and peroxidation of lipids). Because the biological response occurs initially at the biochemical and molecular levels and then at the physiological and histological levels (Nascimento et al. 2006), we hypothesize that the biochemical biomarkers will be affected by short-term effects from the treatment, while morphological effects will occur after prolonged exposures.

Materials and methods

Collection and experiments

One hundred and eight adult male specimens of *P. nattereri* were collected (License #18573-1, IBAMA) from November

2018 to January 2019 in São José do Rio Preto (coordinates: 20°42'22.6"S, 49°17'25.7"W). After collection, the specimens were sent to São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences being kept in acclimatization in plastic boxes (25 × 16 × 14 cm) containing dechlorinated water. Before the beginning of the experiments, the specimens were weighed and separated into three experimental treatments (cutaneous, injection, oral) and three experimental times (one, three, and seven-day exposure). Each specimen received a single dose (volume: 0.02 ml) of pure mineral oil (control) or mineral oil containing 2 mg/kg of B α P (treatment), administered by cutaneous drip in the dorsal region, subcutaneous injection, or by drip in the oral cavity. Experimental times, as well as concentration, were based on and adapted from the works of Fanali et al. (2017, 2018). At the end of the experiments, the specimens were euthanized in an aqueous solution of benzocaine (5 g/L), weighed, and dissected. Biological liver samples were collected and preserved according to each analysis. All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use—IBILCE/UNESP-CSJRP (Protocol n° 188/2018), and animals handling followed the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

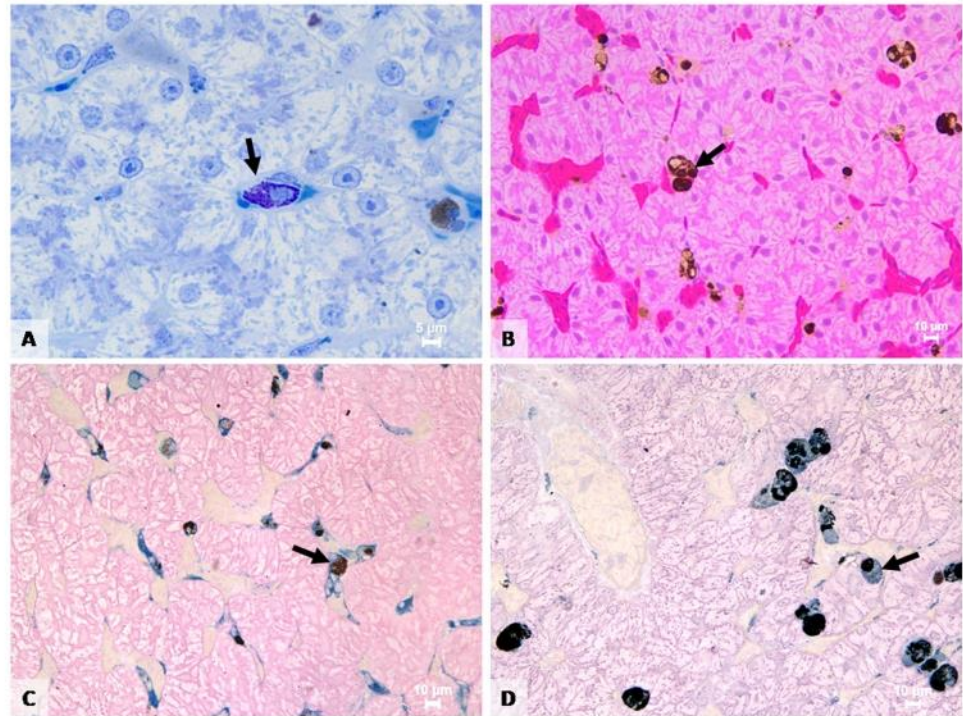
Morphological analysis

Liver fragments were fixed in Karnovsky's solution (0.1 M Sörensen phosphate buffer, pH 7.2 phosphate buffer with 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde) for 24 h at 4 °C, with subsequent dehydration in alcoholic series and inclusion in historesin (Leica-Historesin embedding kit, Leica Microsystems). Histological sections of 2 μ m were obtained in a rotating microtome (Leica RM2265) and followed the staining process according to the proposed analyses. Each analysis provides information on morphological, physiological (melanin, hemosiderin, and lipofuscin) and immunological (mast cells) changes caused by B α P.

Pigment area quantification

To quantify the area occupied by melanin, hemosiderin, and lipofuscin (Fig. 1), histological sections were stained in hematoxylin-eosin (melanin) or incubated in acidic potassium ferrocyanide solution (hemosiderin – 200 mg potassium ferrocyanide dissolved in 10 ml of hydrochloric acid 0.75 mol/L) or Schmorl's solution (lipofuscin – 38 mg of ferric chloride and 5 mg of potassium ferricyanide dissolved in 5 ml of distilled water). Twenty-five histological fields/animal were photographed under a light microscope (20x), with an image capture system (Leica DMC4500), and analyzed using the Image-Pro Plus 6.0 program (Media-Cybernetics Inc.) following the protocol by

Fig. 1 Histological sections of liver. **A** Mast cell (arrow). **B** Melanomacrophage with melanin (arrow). **C** Melanomacrophage with hemosiderin (arrow). **D** Melanomacrophage with lipofuscin (arrow). Staining: **A** – Toluidine blue with borax, **B** – Hematoxylin-Eosin, **C** – Ferrocyanide acid solution, **D** – Schmorl's solution. Scale bars: **A** – 5 μm , **B/C/D** – 10 μm



Santos et al. (2014), which determines the measurement of pigments by color intensity.

Mast cells quantification

Sections were stained in toluidine blue with borax and analyzed under a light microscope (40x), counting the mast cells (Fig. 1) present in 10 histological fields/animal. Subsequently, the analyzed fields were photographed under a stereomicroscope (Leica MZ16), with an image capture system (Leica DFC295), and analyzed using the Image-Pro Plus 6.0 program (Media-Cybernetics Inc.) to establish the mast cell density per μm^2 of liver tissue.

Total melanin quantification

Liver fragments were weighed and frozen at -4°C . To quantify total melanin, the method by Franco-Belussi et al. (2016) was used. The samples were homogenized in a 1 M sodium hydroxide (NaOH) and 10% Dimethylsulfoxide (DMSO) solution, heated at 80°C for 2 hours, centrifuged at 2500 rotations per minute (rpm) for 15 minutes, and analyzed at 475 nm in an ELISA plate reader. To determine the standard melanin curve, synthetic melanin (Sigma-Aldrich) was prepared and analyzed in the same way as the liver samples. The relationship between absorbance and melanin concentration was used to determine the amount of melanin per milligram of sample.

Biochemical analysis

As the metabolism of B α P can generate ROS, we quantified catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), and lipid peroxidation (LPO), whose responses may indicate possible oxidative stress. For this, biological liver samples were frozen in a biofreezer at -80°C . The samples were individually homogenized (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX[®]) in a saline-phosphate buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na_2HPO_4 (7H₂O), and 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.2) at 4°C and centrifuged (Hettich[®] Universal 320 R centrifuge) at 12,000 g for 20 minutes at 4°C . The supernatant was collected and used for biochemical determinations.

The protein concentration of the samples was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as a standard at 595 nm. CAT activity was determined by the method of Aebi (1984), through the degradation of hydrogen peroxide into water and oxygen. The SOD activity was determined by the method of Crouch et al. (1981), based on the ability of SOD to inhibit the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). GST activity was determined by the method of Keen et al. (1976), through the formation of thioether after the reaction of GST with the substrate 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). LPO was quantified by the FOX method (ferrous oxidation-xylenol orange) as described by Jiang et al. (1992). This method is based on the oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} by hydroperoxides in an acidic medium, in the presence of a Fe^{3+} complexing

Table 1 Biometric data of *Physalaemus nattereri*.

Group	Initial Body Mass (g)	Final Body Mass (g)	Liver (g)
CC.1d–CT.1d	8.25 ± 0.27–8.31 ± 0.36	8.30 ± 0.37–8.21 ± 0.51	0.22 ± 0.02–0.19 ± 0.01
IC.1d–IT.1d	8.11 ± 0.53–8.18 ± 0.64	7.78 ± 0.55–8.06 ± 0.66	0.21 ± 0.02–0.22 ± 0.03
OC.1d–OT.1d	8.10 ± 0.50–8.34 ± 0.34	7.61 ± 0.48–8.29 ± 0.33	0.21 ± 0.05–0.21 ± 0.01
CC.3d–CT.3d	8.02 ± 0.34–7.73 ± 0.16	7.58 ± 0.37–7.57 ± 0.20	0.20 ± 0.02–0.16 ± 0.01
IC.3d–IT.3d	8.19 ± 0.28–8.05 ± 0.39	8.21 ± 0.36–7.73 ± 0.30	0.23 ± 0.02–0.19 ± 0.02
OC.3d–OT.3d	8.46 ± 0.36–8.38 ± 0.29	7.91 ± 0.29–8.16 ± 0.28	0.23 ± 0.03–0.21 ± 0.02
CC.7d–CT.7d	8.28 ± 0.28–8.48 ± 0.14	7.60 ± 0.40–8.00 ± 0.29	0.19 ± 0.02–0.23 ± 0.01
IC.7d–IT.7d	8.34 ± 0.60–8.35 ± 0.22	7.51 ± 0.50–7.56 ± 0.29	0.19 ± 0.03–0.21 ± 0.01
OC.7d–OT.7d	8.59 ± 0.44–8.34 ± 0.31	8.21 ± 0.26–7.80 ± 0.40	0.22 ± 0.02–0.20 ± 0.02

The significant difference (control vs. treatment) is shown in bold. Values are mean ± SE of $N=6$ samples for each group. CC cutaneous control, CT cutaneous treatment, IC injection control, IT injection treatment, OC oral control, OT oral treatment; 1d: one day; 3d: three days; 7d: seven days

pigment (xylene orange), which has an absorption peak at 560 nm. The spectrophotometric readings were taken in triplicate, being carried out in a microplate reader (SOD, GST, and LPO – Synergy™ HTX Multi-Mode Reader) or in a quartz cuvette (CAT – UV/Vis spectrophotometer, LIBRA S50, BIOCHROM).

Statistic

For the present study, we performed a comparison model between time (one, three, and seven days) and experimental groups (cutaneous control/treatment, injections control/treatment, oral control/treatment) (time * group). Through this model, multiple comparisons were performed at each experimental time to visualize the effect of B α P (control vs. treatment – Tables 1–3), as well as the effect of exposure pathway (comparison between pathways at each given time – Table S7). For all data, tests of normality (Shapiro) and homogeneity of variance (Bartlett) were performed. For total melanin, CAT, and SOD an ANOVA test were performed. For melanin, hemosiderin, lipofuscin, mast cells, GST, and LPO an GLM were performed, with Gaussian (link function *log*) and binomial distribution (exclusive to mast cells). To compare the mass variation between the beginning and the end of the experiments, a t-test was performed for each experimental time. Subsequently, an ANOVA test was performed to compare the mass variation between groups. All analyzes were performed using the RStudio program (R Core Team).

Results

Biometry

The biometry data are shown in Table 1. B α P did not cause changes in body ($F=0.849$, $p>0.05$) or liver mass ($F=1.048$, $p>0.05$) of the specimens. There was no variation in

the body mass of the specimen between the beginning and the end of the experiments (1d: $t=0.69542$, 3d: $t=1.7681$, 7d: $t=3.064$; $p>0.05$).

Morphological biomarkers

The morphological data are shown in Table 2. B α P increases the area of melanin in the injectable route (1d: 60%, 3d: 21%, 7d: 41%) and decreases it in the cutaneous route (7d: 31%) and oral routes (1d: 20%, 3d: 21%) ($p<0.05$, Table S1). The area of hemosiderin has an increase in the cutaneous (3d: 94%), injectable (1d: 24%, 3d: 32%), and oral routes (3d: 27%), and a decrease in the cutaneous route (7d: 20%) ($p<0.05$, Table S2). For lipofuscin, there was an increase in the cutaneous (1d: 40%, 3d: 94%) and injectable routes (1d: 67%, 3d: 68%) and a decrease in the cutaneous (7d: 57%) and oral routes (3d: 17%) ($p<0.05$, Table S3). After exposure to B α P, the frequency of mast cells increased in the oral route (3d: 730%) and decreased in the injectable route (7d: 65%) ($p<0.05$, Table S4).

B α P did not cause changes in total melanin ($F=5.339$, $p>0.05$).

Biochemical biomarkers

The biochemical data are shown in Table 3. B α P administered orally causes an increase in SOD (1d: 73%) ($F=3.837$, $p>0.05$) and a decrease in GST (3d: 35%) ($p<0.05$, Table S5).

B α P did not cause changes in CAT ($F=3.335$, $p>0.05$) and LPO activities ($p>0.05$, Table S6).

Discussion

In the present study, we evaluated the effects of B α P on the hepatic biomarkers of *P. nattereri*, and whether these effects are influenced by its exposure pathway. After one, three and

Table 2 Morphologic biomarkers of *Physalaemus nattereri*.

Group	Total Melanin (µg/g)	Melanin (µm ²)	Hemosiderin (µm ²)	Lipofuscin (µm ²)	Mast Cells (n/mm ²)
CC.1d-CT.1d	1506.2 ± 217.1-1679.4 ± 175.9	562.3 ± 61-536.7 ± 103.9	6158.8 ± 1172.8-6566 ± 1202.4	2175.4 ± 360.6-3037.5 ± 491.6	0.3 ± 0.11-0.31 ± 0.14
IC.1d-IT.1d	2769.5 ± 711.4-3688.9 ± 563.1	439.4 ± 86.4-703.1 ± 205.5	5098.7 ± 961.7-6333.9 ± 806	1635.9 ± 315.4-2733.3 ± 691.3	0.71 ± 0.35-0.38 ± 0.1
OC.1d-OT.1d	3316.2 ± 579.9-2271.1 ± 471.3	562.9 ± 107.5-451.3 ± 93.5	5435 ± 984-5356.8 ± 739.9	2273.6 ± 452.3-1869.6 ± 303.4	0.54 ± 0.16-0.42 ± 0.24
CC.3d-CT.3d	2615.8 ± 451.4-3192.8 ± 851.1	730 ± 179.9-809.2 ± 196.3	4513.3 ± 1012.2-8759.7 ± 1154.4	2846.8 ± 574.6-5526.9 ± 1756.2	0.88 ± 0.42-0.73 ± 0.23
IC.3d-IT.3d	2015.8 ± 391.2-1810.8 ± 366.6	656 ± 141.3-795.4 ± 163.4	4652.8 ± 607.5-6123.5 ± 827.2	2158.9 ± 514.9-3631.9 ± 635	0.28 ± 0.13-0.8 ± 0.32
OC.3d-OT.3d	1463.1 ± 186.5-1033.9 ± 123.9	859.5 ± 159.5-675.2 ± 161.1	4982.8 ± 1070.2-6341.2 ± 688.5	2810.3 ± 418.3-2333.8 ± 380.2	0.2 ± 0.09-1.66 ± 0.62
CC.7d-CT.7d	914.8 ± 49.5-1177.1 ± 169.3	483.3 ± 100.9-334.1 ± 77.6	5662.9 ± 1265.6-4528 ± 928.8	1789.1 ± 343.5-754.2 ± 134.1	0.27 ± 0.13-0.43 ± 0.16
IC.7d-IT.7d	1076 ± 109-1098.4 ± 150.3	343.3 ± 75.6-484.2 ± 114.4	6158 ± 1278.3-6108.9 ± 892.7	1222.8 ± 260-1306.3 ± 396.8	1.07 ± 0.54-0.37 ± 0.08
OC.7d-OT.7d	1237.9 ± 109.7-1812.9 ± 147.8	426.9 ± 131.6-420.1 ± 89.9	5113 ± 706.8-6062.9 ± 1233.2	981.3 ± 188.7-1026.4 ± 264.1	0.45 ± 0.09-0.29 ± 0.08

The significant difference (control vs. treatment) is show in bold. Values are mean ± SE of N = 6 samples for each group. CC cutaneous control, CT cutaneous treatment, IC injection control, IT injection treatment, OC oral control, OT oral treatment, 1d: one day; 3d: three days; 7d: seven days

seven days changes were observed in the response of morphological and biochemical biomarkers, with morphological ones suffering a greater number of significant changes (see Tables 2 and 3). Through a comparative analysis (Table S7), we observed a significant difference between exposure pathways in the treatment group, demonstrating that the pathway alters the effects of BαP, an unprecedented result for anurans. We also report a difference between exposure routes in the control group (Table S7), which may indicate an effect of the mineral oil (which does not compromise our results, since both control and treatment received oil), also influenced by the exposure route.

Among the hepatic morphological biomarkers analyzed, two cell types were used: melanomacrophages and mast cells. Melanomacrophages represent a lineage of pigment cells derived from hematopoietic stem cells (Sichel et al. 1997), with detoxification capacity (Fenoglio et al. 2005, Pérez-Iglesias et al. 2016). Melanomacrophages have three internal pigments (Agius and Roberts 2003): (1) melanin, a biopolymer with antimicrobial (Wolke et al. 1985) and antioxidant (Sichel 1988) properties; (2) hemosiderin, a pigment derived from hemoglobin breakdown (Agius and Agbede 1984; Kranz 1989); and (3) lipofuscin, a product of the degeneration of cellular components (Agius and Agbede 1984).

Regarding melanin, BαP does not change its total amount, but it does change the area occupied by this pigment. This indicates that BαP can alter the movement of melanin granules (i.e., melanosomes) without altering their synthesis—an effect observed in rodent melanoma cells (Joo et al. 2015). *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) showed a change in actin filaments after seven days of exposure to BαP, leading to an aggregation of melanin granules and consequently a decrease in pigment area (Fanali et al. 2021). This effect may have occurred in *P. nattereri*, but further studies are needed to verify changes in the cytoskeleton and whether these changes are influenced by the route of administration—since we observed a distinct effect between the exposure pathways. The injectable route causes an increase in the area of melanin, while the cutaneous and oral causes a decrease. This variation in the biological response (increase or decrease) between the routes reinforces the influence of the exposure pathway on the effects of BαP. Regarding hemosiderin and lipofuscin, both pigments show an increase in pigment area in the cutaneous, injectable and oral (only hemosiderin) routes, and a decrease in the cutaneous and oral (only lipofuscin). These results indicate possible physiological changes since they are pigments that originated from the catabolic activity of melanomacrophages.

BαP causes an increase in the frequency of mast cells in the oral route (three days) and a decrease in the injectable

Table 3 Biochemical biomarkers of *Physalaemus nattereri*.

Group	CAT (nmol/mg ^{protein})	SOD (Units/mg ^{protein})	GST (nmol/mg ^{protein})	LPO (nmol/mg ^{protein})
CC.1d–CT.1d	1.12 ± 0.11–1.43 ± 0.07	7.45 ± 0.99–10.98 ± 0.96	0.83 ± 0.04–0.96 ± 0.04	0.24 ± 0.06–0.16 ± 0.02
IC.1d–IT.1d	1.24 ± 0.13–1.26 ± 0.16	9.26 ± 1.09–10.26 ± 0.94	1.03 ± 0.05–1.18 ± 0.07	0.19 ± 0.06–0.17 ± 0.03
OC.1d–OT.1d	1.18 ± 0.06–1.55 ± 0.13	5.75 ± 0.88–9.97 ± 1.07	0.72 ± 0.04–0.94 ± 0.06	0.28 ± 0.11–0.23 ± 0.06
CC.3d–CT.3d	1.26 ± 0.14–1.48 ± 0.11	8.09 ± 0.82–8.36 ± 1.12	0.95 ± 0.05–0.86 ± 0.05	0.2 ± 0.04–0.3 ± 0.06
IC.3d–IT.3d	1.53 ± 0.06–1.67 ± 0.08	7.66 ± 0.42–7.53 ± 0.5	0.77 ± 0.01–0.87 ± 0.06	0.24 ± 0.03–0.33 ± 0.05
OC.3d–OT.3d	1.64 ± 0.06–1.67 ± 0.09	7.78 ± 0.85–7.53 ± 0.47	1.09 ± 0.06–0.71 ± 0.06	0.39 ± 0.03–0.22 ± 0.06
CC.7d–CT.7d	1.72 ± 0.16–1.81 ± 0.09	6.54 ± 0.93–6.21 ± 0.16	1.1 ± 0.08–1.04 ± 0.11	0.31 ± 0.04–0.2 ± 0.03
IC.7d–IT.7d	1.6 ± 0.08–1.48 ± 0.17	5.68 ± 0.82– 2.8 ± 0.41	0.98 ± 0.1–0.95 ± 0.07	0.27 ± 0.07–0.26 ± 0.09
OC.7d–OT.7d	1.55 ± 0.15–1.19 ± 0.1	3.15 ± 0.3–3.96 ± 0.69	0.98 ± 0.04–1.1 ± 0.03	0.08 ± 0.07–0.11 ± 0.06

The significant difference (control vs. treatment) is show in bold. Values are mean ± SE of *N* = 6 samples for each group. CC cutaneous control, CT cutaneous treatment, IC injection control, IT injection treatment, OC oral control, OT oral treatment; 1d: one day; 3d: three days; 7d: seven days

route (seven days). Mast cells constitute immune cells used as a marker of an inflammatory response (Franco-Belussi et al. 2014, Fanali et al. 2018). In a previous study involving anurans, the proportion of these cells increases in response to BαP (Fanali et al. 2018), demonstrating the ability to have induced an inflammatory response in the liver tissue. In fish, BαP compromises immune function (Carlson et al. 2002), which explains why we observed a decrease in the proportion of mast cells in the liver. The fact that we observed a distinct effect between the oral and the injectable routes reinforces the influence of the exposure route on the effects of BαP.

Regarding biochemical biomarkers, our experimental design did not cause changes in CAT and LPO, but caused an increase in SOD activity in one day and a decrease in GST in three days, both occurring in the oral route. To our knowledge, it is the first time that these biomarkers, CAT, SOD, and LPO, have been used to assess the effects of BαP in anurans. SOD represents an immediate response biomarker (Nascimento et al. 2006), whose activity is related to transforming the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2) (Scandalios 2005). As superoxide is a by-product of BαP metabolism (Penning 2004), an increase in SOD activity demonstrates oxidative unbalance induced by BαP. In general, hydrogen peroxide produced by SOD is converted to less reactive species (H_2O) by CAT or by glutathione peroxidase (GPx) (Scandalios 2005). As we did not observe changes in CAT activity, it is possible that GPx had compensatory activity on the excess of hydrogen peroxide. GPx and GST are enzymes dependent on reduced glutathione (GSH), using it as a cofactor in their activities (Balasenthil et al. 2000, Van der Oost et al. 2003). Lower availability of GSH, conjugated by GPx, leads to a decrease in GST activity, as observed in three days. GST, a class of enzymes that acts in the biotransformation of xenobiotics by facilitating their excretion by the organism (Van der Oost et al. 2003), had already been used for the species

Pelophylax esculentus, where an increase in its activity was observed over a period of one and two days, demonstrating that BαP had been cleared by the liver (Reynaud et al. 2012). Although the liver is an important BαP metabolizing organ, other organs can perform this function (Lemaire et al. 1990, 1992). As the pathways used in our study can lead to a differentiated distribution of BαP throughout the body, the metabolism of BαP may have occurred in different organs, requiring further studies on the activity of biochemical biomarkers in other organs.

Conclusion

In the present study, we observed that BαP triggers the response of hepatic biomarkers of *P. nattereri*. This response is influenced by the route of administration, an unprecedented result for anurans, seen mainly in the area of melanin, hemosiderin, and lipofuscin. The results for these pigments demonstrate two characteristics related to the route of administration. (1) Artificial and natural pathways cause distinct effects, depending on the biomarker analyzed, mainly seen in the comparison of melanin vs. hemosiderin or melanin vs. lipofuscin. (2) The exposure time affects the exposure route, seen in the cutaneous route for hemosiderin and lipofuscin, wherein short exposure times (one and three days) causes an increase in the pigmented area, while in prolonged periods (seven days) causes a decrease. Our experimental design demonstrated that morphological biomarkers were more sensitive to BαP, which reinforces their use as effect biomarkers to assess changes induced by chemical compounds and other xenobiotics.

Data availability

Not applicable.

Code availability

Not applicable.

Acknowledgements The authors are thankful to the members of Laboratório de Anatomia Comparada (UNESP/IBILCE) and Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (UFSCAR). This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (CO: 2018/01078-7, CSC: 2017/23781-9). BSLV received a doctoral fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CO has been supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (304552/2019-4). There was no conflict of interest.

Author contributions BSLV: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing original draft; HSMU: methodology, investigation, writing review and editing; CSC: conceptualization, methodology, resources, supervision, writing review and editing; LFB: formal analysis, writing review and editing; CO: conceptualization, methodology, resources, supervision, writing review and editing.

Funding This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (CO: 2018/01078-7, CSC: 2017/23781-9). BSLV received a doctoral fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CO has been supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (304552/2019-4).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Ethical approval Approval was obtained from the Ethics Committee on Animal Use (IBILCE/UNESP – CSJRP nº188/2018). Animals collection permission (#18573-1, RAN/IBAMA/MMA).

Consent to participate Mr. Bruno Serra de Lacerda Valverde submitted this manuscript via online submission system, and on behalf of all co-authors that have been listed as a member of this submission, I confirm their consent to participate in this study and their consent to be listed as co-authors.

Consent for publication On behalf of all co-authors listed in this submission, I confirm their consent to publish this original research article.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1985. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Agius C, Agbede SA (1984) An electron microscopical study on the Genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J Fish Dis* 24:471–488. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>
- Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26:499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- Balasenthil S, Saroja M, Ramachandran CR, Nagini S (2000) Of human and hamsters: comparative analysis of lipid peroxidation, glutathione, and glutathione-dependent enzymes during oral carcinogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:267–270. <https://doi.org/10.1054/bjom.1999.0445>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT (2002) Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat Toxicol* 56:289–301. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00223-5)
- Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMP, Buse AM (1981) The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30:235–241. <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>
- Fanali LZ, De Oliveira C, Sturve J (2021) Enzymatic, morphological, and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Pollut Res* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14583-1>
- Fanali LZ, Franco-Belussi L, Bonini-Domingos CR, De Oliveira C (2018) Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Pollut* 237:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>
- Fanali LZ, Valverde BSL, Franco-Belussi L, Provete DB, Oliveira C (2017) Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. *Amphib-reptil* 38:175–185. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003101>
- Fenoglio C, Boncompagni E, Fasola M, Gandini C, Comizzoli S, Milanesi G, Bami S (2005) Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:259–268. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>
- Franco-Belussi L, Leite GB, Freitas JS, Oliveira C (2014) Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anim Biol* 64:261–275. <https://doi.org/10.1163/15707563-00002445>
- Franco-Belussi L, Skold HN, Oliveira C (2016) Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J Exp Biol* 219:1378–1383. <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>
- Gelboin HV (1980) Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60:1107–1166. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.4.1107>
- Gupta S, Kumar K, Srivastava A, Srivastava A, Jain VK (2011) Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle samples from the atmospheric environment of Delhi, India. *Sci Total Environ* 409:4674–4680. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.008>
- Höhn-Bentz J, Kurelec B, Zahn RK (1983) Fast ephemeral DNA damage upon B[a]P injection. *Sci Total Environ* 32:13–27. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(83\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(83)90129-8)
- International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs. 2012. Chemical agents and related occupations, volume 100 F, a review of human carcinogens. Lyon, France: World Health Organization.
- Jiang Z-Y, Hunt JV, Wolff SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 202:384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)

- Joo DH, Cha HJ, Kim K, Jung M, Ko JM, An IS, Lee SN, Jang HH, Bae S, Roh NK, Ahn KJ, An S (2015) Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol Cell Toxicol* 11:349–355. <https://doi.org/10.1007/s13273-015-0035-1>
- Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for the several activities of the Glutathione S-Transferase. *J Biol Chem* 251:6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- Kranz H (1989) Changes in splenic melano-macrophage centers of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis Aquat Org* 6:167–173. <https://doi.org/10.3354/dao006167>
- Lemaire P, Lemaire-Gony S, Berhaut J, Lafaurie M (1992) The uptake, metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene administered by force-feeding in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Ecotoxicol Environ Saf* 23:244–251. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(92\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(92)90062-8)
- Lemaire P, Mathieu A, Carriere S, Dral P, Giudicelli J, Lafaurie M (1990) The uptake metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicol Environ Saf* 20:223–233. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(90\)90001-L](https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90001-L)
- Li J-L, Chen B-H (2002) Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chem Eng Sci* 57:2825–2835. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00169-0)
- Madureira DJ, Weiss FT, Midwoud PV, Helbling DE, Sturla SJ, Schirmer K (2014) Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo(a)pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chem Res Toxicol* 27:443–453. <https://doi.org/10.1021/tx400446q>
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A (2005) Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol* 20:74–84. <https://doi.org/10.1002/tox.20080>
- Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBNL (2006) Biomarcadores como instrumento preventivos de poluição. In: Zagatto PA, Bertolotti E (eds) *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. RIMA, São Paulo, pp 413–432.
- Nasr IN, Arief MH, Abdel-Aleem AH, Malhat FM (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. *J Appl Sci Res* 6:13–21
- Netto ADP, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS, Berek J (2000) Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Quím Nova* 23:765–773. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000600010>
- Penning TM (2004) Aldo-keto reductases and formation of polycyclic aromatic hydrocarbons o-quinones. *Method Enzymol* 378:31–67. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)78003-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78003-9)
- Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, Oliveira C, Natale GS (2016) Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melnamacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ Sci Pollut Res* 23:9852–9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>
- Regnault C, Willison J, Veyrenc S, Airieau A, Méresse P, Fortier M, Fournier M, Brosseau P, Raveton M, Reynaud S (2016) Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[α]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* 155:519–527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.047>
- Regnault C, Worms IAM, Oger-Desfeux C, MelodeLima C, Veyrenc S, Bayle M-L, Combourieu B, Bonin A, Renaud J, Raveton M, Reynaud S (2014) Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genomics* 15:666–681. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-666>
- Reynaud S, Worms IAM, Veyrenc S, Portier J, Maitre A, Miaud C, Raveton M (2012) Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). *Environ Pollut* 161:206–214. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.029>
- Sadinski WJ, Levay G, Wilson MC, Hoffman JR, Bodell WJ, Anderson SL (1995) Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 32:333–352. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00092-5)
- Santos LRS, Franco-Belussi L, Zieri R, Borges RE, Oliveira C (2014) Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat Rec* 297:864–875. <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S (2006) Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol* 26:427–438. <https://doi.org/10.1002/jat.1157>
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 3:995–1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>
- Sichel G (1988) Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. *Pigment Cell Res* 1:250–258. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1988.tb00423.x>
- Sichel G, Scalia M, Mondio F, Corsaro C (1997) The amphibian kupffer cells build and demolish melanosomes: na ultrastructural point of view. *Pigment Cell Res* 10:271–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1997.tb00687.x>
- Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A (1974) Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252:326–328. <https://doi.org/10.1038/252326a0>
- Steindachner F (1863) Über einige neue Batrachier aus den Sammlungen des Wiener Museums. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe 48:186–192
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Hummelen P, Zoll C, Paulussen J, Kirsch-Volders M, Jaylet A (1989) The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple 'in vivo' technique for detection of mutagens in fresh water. *Mutagenesis* 4:12–16. <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.12>
- Wilcke W, Amelung W, Krauss M, Martius C, Bandeira A, Garcia M (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. *Org Geochem* 34:1405–1417. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(03\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(03)00137-2)
- Wolke RE, George CJ, Blazer VS (1985) Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: Hargis WJ (ed) *Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean*. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, pp 93–98.

Table S1 – GLM comparison (time*group) of melanin.

<i>Predictors</i>	(melanin)		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	3.09	3.04 – 3.14	<0.001
tempo [3d]	0.15	0.08 – 0.22	<0.001
tempo [7d]	-0.07	-0.14 – -0.00	0.047
grupo [CT]	-0.01	-0.08 – 0.06	0.841
grupo [IC]	-0.12	-0.19 – -0.05	0.001
grupo [IT]	0.10	0.03 – 0.18	0.004
grupo [OC]	0.02	-0.05 – 0.10	0.504
grupo [OT]	-0.11	-0.18 – -0.04	0.003
tempo [3d] * grupo [CT]	0.07	-0.04 – 0.17	0.203
tempo [7d] * grupo [CT]	-0.21	-0.31 – -0.11	<0.001
tempo [3d] * grupo [IC]	0.07	-0.03 – 0.17	0.174
tempo [7d] * grupo [IC]	-0.07	-0.17 – 0.03	0.170
tempo [3d] * grupo [IT]	-0.04	-0.14 – 0.06	0.464
tempo [7d] * grupo [IT]	-0.12	-0.22 – -0.02	0.017
tempo [3d] * grupo [OC]	0.09	-0.01 – 0.19	0.086
tempo [7d] * grupo [OC]	-0.14	-0.24 – -0.04	0.008
tempo [3d] * grupo [OT]	0.05	-0.05 – 0.15	0.351
tempo [7d] * grupo [OT]	0.02	-0.08 – 0.12	0.660
Observations	2700		

Table S2 – GLM comparison (time*group) of hemosiderin.

<i>Predictors</i>	(hemosiderin)		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	80.26	77.55 – 82.97	<0.001
tempo [3d]	-12.46	-16.29 – -8.63	<0.001
tempo [7d]	-4.37	-8.20 – -0.54	0.025
grupo [CT]	2.22	-1.61 – 6.05	0.257
grupo [IC]	-8.20	-12.03 – -4.37	<0.001
grupo [IT]	1.95	-1.88 – 5.78	0.318
grupo [OC]	-5.23	-9.06 – -1.40	0.007
grupo [OT]	-4.92	-8.75 – -1.08	0.012
tempo [3d] * grupo [CT]	26.75	21.33 – 32.17	<0.001
tempo [7d] * grupo [CT]	-10.41	-15.83 – -4.99	<0.001
tempo [3d] * grupo [IC]	10.69	5.27 – 16.10	<0.001
tempo [7d] * grupo [IC]	11.59	6.17 – 17.01	<0.001
tempo [3d] * grupo [IT]	10.91	5.49 – 16.33	<0.001
tempo [7d] * grupo [IT]	2.58	-2.83 – 8.00	0.350
tempo [3d] * grupo [OC]	8.19	2.77 – 13.60	0.003
tempo [7d] * grupo [OC]	2.99	-2.43 – 8.40	0.280
tempo [3d] * grupo [OT]	19.60	14.18 – 25.01	<0.001
tempo [7d] * grupo [OT]	7.85	2.44 – 13.27	0.004
Observations	2700		

Table S3 – GLM comparison (time*group) of lipofuscin.

<i>Predictors</i>	(lipofuscin)		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	2.15	2.14 – 2.17	<0.001
tempo [3d]	0.06	0.03 – 0.08	<0.001
tempo [7d]	-0.04	-0.07 – -0.02	0.001
grupo [CT]	0.07	0.05 – 0.10	<0.001
grupo [IC]	-0.07	-0.09 – -0.04	<0.001
grupo [IT]	0.03	0.00 – 0.05	0.037
grupo [OC]	0.00	-0.02 – 0.03	0.829
grupo [OT]	-0.03	-0.05 – -0.00	0.033
tempo [3d] * grupo [CT]	0.05	0.01 – 0.08	0.014
tempo [7d] * grupo [CT]	-0.25	-0.29 – -0.21	<0.001
tempo [3d] * grupo [IC]	-0.00	-0.04 – 0.03	0.817
tempo [7d] * grupo [IC]	-0.02	-0.06 – 0.02	0.335
tempo [3d] * grupo [IT]	0.03	-0.01 – 0.07	0.113
tempo [7d] * grupo [IT]	-0.12	-0.16 – -0.08	<0.001
tempo [3d] * grupo [OC]	0.00	-0.03 – 0.04	0.870
tempo [7d] * grupo [OC]	-0.13	-0.17 – -0.09	<0.001
tempo [3d] * grupo [OT]	-0.01	-0.05 – 0.03	0.663
tempo [7d] * grupo [OT]	-0.11	-0.15 – -0.07	<0.001
Observations	2700		

Table S4 – GLM comparison (time*group) of mast cells.

<i>Predictors</i>	(mast cells)		
	<i>Odds Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	0.05	0.02 – 0.08	<0.001
tempo [3d]	2.83	1.31 – 6.64	0.011
tempo [7d]	0.88	0.34 – 2.31	0.797
grupo [CT]	1.03	0.41 – 2.64	0.951
grupo [IC]	1.57	0.74 – 3.65	0.262
grupo [IT]	0.98	0.42 – 2.40	0.965
grupo [OC]	1.44	0.69 – 3.30	0.355
grupo [OT]	1.89	0.79 – 4.69	0.155
tempo [3d] * grupo [CT]	0.62	0.20 – 1.89	0.402
tempo [7d] * grupo [CT]	0.89	0.26 – 3.17	0.858
tempo [3d] * grupo [IC]	0.22	0.07 – 0.61	0.005
tempo [7d] * grupo [IC]	2.50	0.79 – 7.89	0.116
tempo [3d] * grupo [IT]	0.69	0.24 – 1.91	0.474
tempo [7d] * grupo [IT]	0.85	0.25 – 2.86	0.792
tempo [3d] * grupo [OC]	0.21	0.06 – 0.64	0.009
tempo [7d] * grupo [OC]	0.65	0.21 – 2.03	0.455
tempo [3d] * grupo [OT]	0.70	0.25 – 1.93	0.493
tempo [7d] * grupo [OT]	0.48	0.13 – 1.73	0.262
Observations	5466		

Table S5 – GLM comparison (time*group) of GST.

<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	(GST)	
		<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	0.83	0.71 – 0.95	<0.001
tempo [3d]	0.12	-0.05 – 0.29	0.171
tempo [7d]	0.27	0.10 – 0.44	0.002
grupo [CT]	0.13	-0.04 – 0.30	0.128
grupo [IC]	0.20	0.03 – 0.37	0.023
grupo [IT]	0.35	0.18 – 0.52	<0.001
grupo [OC]	-0.11	-0.28 – 0.06	0.211
grupo [OT]	0.11	-0.06 – 0.28	0.197
tempo [3d] * grupo [CT]	-0.22	-0.46 – 0.02	0.074
tempo [7d] * grupo [CT]	-0.19	-0.43 – 0.05	0.114
tempo [3d] * grupo [IC]	-0.37	-0.61 – -0.14	0.002
tempo [7d] * grupo [IC]	-0.31	-0.55 – -0.08	0.010
tempo [3d] * grupo [IT]	-0.43	-0.67 – -0.19	<0.001
tempo [7d] * grupo [IT]	-0.49	-0.73 – -0.26	<0.001
tempo [3d] * grupo [OC]	0.25	0.01 – 0.49	0.044
tempo [7d] * grupo [OC]	-0.01	-0.25 – 0.22	0.902
tempo [3d] * grupo [OT]	-0.35	-0.59 – -0.11	0.004
tempo [7d] * grupo [OT]	-0.11	-0.35 – 0.13	0.383
Observations	108		
R ²	0.474		

Table S6 – GLM comparison (time*group) of LPO.

<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	(LPO)	
		<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	0.24	0.13 – 0.36	<0.001
tempo [3d]	-0.04	-0.21 – 0.12	0.596
tempo [7d]	0.07	-0.10 – 0.23	0.410
grupo [CT]	-0.08	-0.25 – 0.08	0.316
grupo [IC]	-0.05	-0.22 – 0.11	0.546
grupo [IT]	-0.07	-0.24 – 0.09	0.385
grupo [OC]	0.04	-0.12 – 0.21	0.628
grupo [OT]	-0.01	-0.17 – 0.16	0.909
tempo [3d] * grupo [CT]	0.18	-0.05 – 0.42	0.121
tempo [7d] * grupo [CT]	-0.02	-0.26 – 0.21	0.839
tempo [3d] * grupo [IC]	0.09	-0.14 – 0.33	0.434
tempo [7d] * grupo [IC]	0.01	-0.22 – 0.24	0.932
tempo [3d] * grupo [IT]	0.21	-0.02 – 0.44	0.078
tempo [7d] * grupo [IT]	0.02	-0.21 – 0.25	0.873
tempo [3d] * grupo [OC]	0.15	-0.09 – 0.38	0.214
tempo [7d] * grupo [OC]	-0.27	-0.50 – -0.04	0.024
tempo [3d] * grupo [OT]	0.03	-0.20 – 0.27	0.769
tempo [7d] * grupo [OT]	-0.19	-0.43 – 0.04	0.104
Observations	108		
R ²	0.240		

Table S7 – Statistical comparison between different routes of administration at the same exposure time. Groups with statistical difference are indicated with “ $p < 0.05$ ”. CC: cutaneous control; CT: cutaneous treatment; IC: injection control; IT: injection treatment; OC: oral control; OT: oral treatment; 1d: one day; 3d: three days; 7d: seven days.

Comparison	<i>Morphologic</i>					<i>Biochemical</i>			
	Total Melanin	Melanin	Hemosiderin	Lipfuscin	Mast Cells	CAT	SOD	GST	LPO
1d: CC - IC	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–
1d: CC - OC	$p < 0.05$	–	–	–	–	–	–	–	–
1d: IC - OC	–	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	–	–	–	$p < 0.05$	–
1d: CT - IT	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
1d: CT - OT	–	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
1d: IT - OT	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–
3d: CC - IC	–	–	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
3d: CC - OC	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–	–	–
3d: IC - OC	–	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	–	–	–	$p < 0.05$	–
3d: CT - IT	–	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
3d: CT - OT	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
3d: IT - OT	–	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
7d: CC - IC	–	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–
7d: CC - OC	–	$p < 0.05$	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–
7d: IC - OC	–	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	–	–
7d: CT - IT	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	$p < 0.05$	–	–
7d: CT - OT	–	$p < 0.05$	$p < 0.05$	–	–	$p < 0.05$	–	–	–
7d: IT - OT	–	–	–	$p < 0.05$	–	–	–	–	–

CAPÍTULO 3

Effects of benzo(a)pyrene on *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) skin

Bruno Serra de Lacerda Valverde^{1*}, Classius de Oliveira²

¹Graduate Program in Biodiversity, Department of Biological Sciences, São Paulo State University (UNESP), Cristóvão Colombo 2265 – Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0001-9039-9817

²Department of Biological Sciences, São Paulo State University (UNESP), Cristóvão Colombo 2265 – Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0002-2029-7900

*Corresponding author:

Bruno Serra de Lacerda Valverde,

Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Rua: Cristóvão Colombo 2265 – Jardim Nazareth, 15054-000. São José do Rio Preto, São Paulo – SP. Tel.: +55 17 3221-2387. Telefax: +5517 3221-2390. Email: bruno-valverde@hotmail.com

Highlights

- Benzo(α)pyrene changes the area of melanin in the skin.
- Benzo(α)pireno decreases the frequency of mast cells in the skin.
- These effects are influenced by the exposure route of the compound.

Abstract

The skin of anurans is a complex structure, related to homeostasis and the protection of the organism. Despite being an absorption pathway for benzo(α)pyrene (BaP), there are no studies that have analyzed the effects of this compound on its structure. We aim to evaluate the effects of BaP on the skin of *Physalaemus nattereri* and whether these effects are influenced by its route of administration. For this, 108 specimens received pure mineral oil or mineral oil containing BaP (treatment), administered cutaneously, by injection, or orally. After one, three, and seven days of exposure, there were no changes in the dorsal coloration of the specimens, but histological changes were observed in the area of melanin and the frequency of mast cells. These results demonstrate that BaP causes morphological and immunological changes in the skin of anurans, and these effects are influenced by its administration route, which represents a novelty for herpetology.

Keywords: Anurans; mast cells; melanin; polycyclic aromatic hydrocarbon.

1. Introduction

Anurans are biological models in ecotoxicological studies involving: agrochemicals (Van Meter et al. 2015; Pérez-Iglesias et al., 2016), endocrine disruptors (Scaia et al., 2019), hydrocarbons (Regnault et al., 2016; Fanali et al., 2018), and metals (Fernandes et al., 2021). In these studies, different exposure methodologies are used, whether natural or by injection.

The injectable route is an administration method that is widely used in experimental biology. Although this method does not represent a natural exposure (Karami et al., 2011), it allows for a rapid onset of toxicity (Shi et al., 2015) and tissue distribution of the compound (Black, 2000), in addition to ensuring the entry of the entire dose of the compound into the body (Pérez-Iglesias et al., 2016). When this method is used in conjunction with routes that simulate natural exposure, which is important in ecological research (Black, 2000), it is possible to establish the toxicity of the compound, as well as its actual adverse effects. In addition, establishing a comparison between natural and unnatural pathways can facilitate future ecotoxicological work, since some natural exposure methods can be difficult to implement in laboratories (Karami et al., 2011).

The skin of anurans is a complex structure that acts on thermoregulation, respiration, reproduction, excretion, camouflage, and water regulation (Clarke, 1997), in addition to being a line of defense against pathogens and predators through the secretion of antimicrobial peptides (Rollins-Smith, 2009) and harmful/toxic substances (Toledo and Jared, 1995). Since it is a permeable structure (Verdade et al., 2010), the skin can absorb chemical compounds (Van Meter et al., 2015), including benzo(α)pyrene (BaP) (Reynaud et al., 2012), being susceptible to its adverse effects.

BaP is a widely known and studied polycyclic aromatic hydrocarbon (Caruso and Alaburda, 2008) present in aquatic (Nasr et al., 2010) and terrestrial (Wilcke et al., 2003) ecosystems. In anurans, BaP is responsible for causing: changes in melanin area,

genotoxicity, hepatotoxicity, inflammatory response, and metabolic disorders (Regnault et al., 2016; Fanali et al., 2018; Valverde et al., 2022). These studies have a major focus on the liver, and there are no studies that have analyzed the effects of BaP on the skin of anurans.

As anuran skin has melanin in its structure, and BaP alters the melanin area, our first objective is to assess possible histological changes in melanin and whether these might reflect changes in external coloration (dorsal darkening). To assess possible inflammatory responses induced by BaP, we will also quantify the number of mast cells present in the tissue. The second objective is to compare these effects between natural (cutaneous and oral) and unnatural (injectable subcutaneous) pathways, methods already used in laboratory studies.

2. Materials and methods

Specimens collection were authorized by IBAMA (License #18573-1), all procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee – IBILCE/UNESP-CSJRP (n° 188/2018), and animals handling followed the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.1. Experimental design

One hundred and eight male specimens of *P. nattereri* were collected in three different periods (11/05/2018, 11/10/2018, and 01/11/2019), in São José do Rio Preto (20°42'22.6"S, 49°17'25.7"W). After collection, the specimens were sent to the São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), being kept in acclimation for nine days in plastic boxes containing dechlorinated water. During acclimation, the specimens were weighed and separated into three experimental times (1, 3, and 7 days), each consisting of six groups ($n=6$ /group): cutaneous control/treatment (CC/CT), injectable control/treatment (IC/IT), oral control/treatment (OC/OT). At the beginning of the experiments (day zero), each specimen received a single dose (volume: 0.02mL) of pure mineral oil (control) or mineral oil containing 2mg/Kg of BaP (treatment), administered by

cutaneous application in the dorsal region, subcutaneous injection, or by application in the oral cavity. At the end of the experiments, the specimens were euthanized in an aqueous solution of benzocaine (5g/L) and photographed dorsally (two photos/animal using Canon EOS Rebel t5i, 18-55mm). Skin samples were fixed in Karnovsky's solution (5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M Sörensen phosphate buffer, pH 7.2) for 24h at 4°C and embedded in historesin (Leica-Historesin embedding kit, Leica Microsystems).

2.2. Morphological analysis

Images of the whole animal were analyzed using the Adobe Photoshop CC 2014 program, following the protocol by Svensson et al. (2005) adapted for anurans by Franco-Belussi et al. (2016). Initially, the images were converted to “Colors L.a.b.” where “L” represents the brightness of the image. To quantify the dorsal darkening, a 1cm² square was created and positioned in the middle of the animal, below the insertion of forelimbs (Figure 1A). From the average luminosity value, provided by the histogram tool, the dorsal dimming was calculated as the complement of luminosity and the result was presented as a percentage of dimming (black = 100%).

To quantify the area occupied by melanin, histological sections of 2µm, obtained on a microtome (Leica RM2265), were stained with hematoxylin-eosin. Twenty-five histological fields/animal were photographed under a light microscope (20x) with an image capture system (Leica DMC4500) and analyzed using the Image-Pro Plus 6.0 software (Media-Cybernetics Inc.), following the protocol by Santos et al. (2014), adapted to the relative area of the analyzed skin. For the quantification of mast cells, histological sections were stained in toluidine blue with borax and analyzed under a light microscope (40x), counting the mast cells present in 10 histological fields/animal. Subsequently, the analyzed fields were photographed in a stereomicroscope (Leica MZ16) with an image capture system (Leica

DFC295) and analyzed using the Image-Pro Plus 6.0 program to establish the mast cell/tissue area ratio.

2.3. Statistical analysis

For all data, we performed a comparison model between time (1, 3, and 7 days) and experimental groups (CC/CT, IC/IT, and OC/OT) (time*group). For the darkening, the ANOVA test was performed; for the relative area of melanin and the frequency of mast cells, a generalized linear model with quasibinomial distribution was performed. All analyses were performed using the RStudio program (R Core Team), with $P < 0.05$.

3. Results

After exposure to BaP, no changes were observed in the dorsal coloration of *P. nattereri* ($P > 0.05$, Table 1). In histology, BaP causes a decrease in the area of melanin (Figure 1B, Table 1) when administered cutaneously (3d: 33.9%) and orally (1d: 24%), while an increase occurs in the injectable route (3d: 19.3%). Concerning mast cells (Figure 1C, Table 1), BaP causes a decrease in its frequency in the injectable route (3d: 53.1%). Through a comparative analysis (Table 1), we observed a difference ($P < 0.05$, Table 1) between exposure pathways, demonstrating that the pathway alters the effects in the area of melanin and mast cells.

4. Discussion

Changes in the dorsal coloration pattern are related to the dispersion and aggregation of melanin granules (i.e., melanosomes), causing a darkening and lightening of the dorsum, respectively (Aspengren et al., 2009). Anurans exposed to endocrine disruptors (Scaia et al., 2019) and herbicides (Pérez-Iglesias et al., 2019) show skin darkening, while a decrease in darkness is observed after exposure to insecticides (Santos et al., 2021). After exposure to BaP, no changes were observed in the dorsal coloration of *P. nattereri*, which may be related

to a different mechanism of action from the other compounds. Furthermore, as only larval stages were exposed to chemical compounds (Pérez-Iglesias et al., 2019; Scaia et al., 2019; Santos et al., 2021), it is necessary to verify whether the stage may influence the effects of these compounds.

Histologically, B α P causes a decrease in the area of melanin when administered cutaneously and orally, while an increase occurs in the injectable route (3d: 19.3%). The decrease in the area of cutaneous melanin may be related to two possibilities: alteration in the amount of melanin present in the tissue and/or alteration in the dispersion of melanin granules in melanophores. According to Joo et al. (2015), B α P can decrease melanin synthesis in rodent melanoma cells, leading to a decrease in its content. In *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout), B α P alters the actin cytoskeleton, leading to an aggregation of melanin granules and consequently a decrease in the pigmented area of the liver (Fanali et al., 2021). Although cutaneous melanin is related to photoprotection, signaling, and thermoregulation functions (reviewed in McNamara et al., 2021), the increase observed via the injectable route may be related to protection against oxidative stress, a function performed by melanin (Dubey and Roulin, 2014). During the metabolism of B α P by the body, reactive oxygen species (ROS) can be generated (Penning, 2004). Thus, the increase in the melanin area may be a physiological adaptation of the cell/tissue to ROS. The results observed for histological melanin demonstrate that the route of administration alters the effects of B α P. While an immediate effect is observed for the oral route, the cutaneous and injectable routes present a delayed response after three days. This result is different from the expected one, where an immediate effect would be related to the cutaneous and/or injectable route, whose application method directly involves the skin. As this is the first time that the melanin area of the skin is used as a tool to assess the effects of B α P, additional studies are included to understand its effects.

Concerning mast cells, B α P causes a decrease in its frequency in the injectable route. *Oryzias latipes* (Japanese medaka) exposed to B α P, by intraperitoneal injection, show a compromised immune system, increasing the susceptibility to disease (Carlson et al., 2002). In *P. nattereri*, we believe that the decrease in mast cells is related to an immunotoxic effect.

5. Conclusions

The skin of anurans is an organ related to multiple homeostatic and protective functions of the organism. Despite this, few studies assess the morphological changes in this tissue after exposure to chemical compounds. For the first time, we observed histological changes in melanin and mast cells after exposure to B α P, which demonstrates that the skin is a potential biomarker for its effects. Our results also demonstrate that the route of administration alters the effects of B α P, seen mainly in the area of melanin, which presents a decrease in natural routes and an increase in the injectable route. This findings serves as the basis for future ecotoxicological studies involving B α P in anurans.

Acknowledgements

The authors are thankful to Arleto T.S., Ariane N.Q., Erick A.B., Gabriel C.C., Jorge Lucas O.P.A., Lara S.G., Maysa S.D., Lilian F.B. and Wadson R.R. for helping with experiments and methods. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2018/01078-7). Valverde, B.S.L. received a doctoral fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), De Oliveira, C. has been supported by CNPq (304552/2019-4).

REFERENCES

- Aspengren, S., Hedberg, D., Sköld, H.N., Wallin, M., 2009. New Insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 272, 245-302. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01606-7](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01606-7).
- Black, M.C., 2000. Routes of administration for chemical agents. In: Ostrander, G.K., (Ed.), *The Laboratory fish*. Academic Press, pp. 529-542. <https://doi.org/10.1016/B978-012529650-2/50040-8>.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56, 289-301. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00223-5).
- Caruso, M.S.F., Alaburda, J., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons – benzo(a)pyrene: a review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 67, 1-27. <https://doi.org/10.53393/rial.2008.v67.32785>
- Clarke, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 72, 365-379. <http://dx.doi.org/10.1017/s0006323197005045>
- Dubey, S., Roulin, A., 2014. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 327-338. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12231>
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R., De Oliveira, C., 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ. Pollut.* 237, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>
- Fanali, L.Z., De Oliveira, C., Sturve, J., 2021. Enzymatic, morphological, and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 53926-53935. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14583-1>
- Fernandes, I.F., Utsunomiya, H.S.M., Valverde, B.S.L., Ferraz, J.V.C., Fujiwara, G.H., Gutierrez, D.M., Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fernandes, M.N., Carvalho, C.S., 2021. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere.* 275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>
- Franco-Belussi, L., Sköld, H.N., Oliveira, C., 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J. Exp. Biol.* 219, 1378-1383. <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>
- Joo, D.H., Cha, H.J., Kim, K., Jung, M., Ko, J.M., An, I.S., Lee, S.N., Jang, H.H., Bae, S., Roh, N.K., Ahn, K.J., An, S., 2015. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol. Cell. Toxicol.* 11, 349-355. <https://doi.org/10.1007/s13273-015-0035-1>

- Karami, A., Christianus, A., Ishak, Z., Syed, M.A., Courtenay, S.C., 2011. The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1558-1566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.05.012>
- McNamara, M.E., Rossi, V., Slater, T.S., Rogers, C.S., Ducrest, A.-L., Dubey, S., Roulin, A., 2021. Decoding the evolution of melanin in vertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 36, 430-443. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.012>
- Nasr, I.N., Arief, M.H., Abdel-Aleem, A.H., Malhat, F.M., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. *J. Appl. Sci. Res.* 6, 13-21.
- Penning, T.M., 2004. Aldo-keto reductase and formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons *o*-Quinones. *Methods Enzymol.* 378, 31-67. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)78003-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78003-9)
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., Oliveira, C., Natale, G.S., 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9852-9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C., 2019. Biomarkers at different levels of organization after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) neotropical tadpoles. *Environ. Pollut.* 244, 733-746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., Méresse, P., Fortier, M., Fournier, M., Brosseau, P., Raveton, M., Reynaud, S., 2016. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere.* 155, 519-527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.047>
- Reynaud, S., Worms, I.A.M., Veyrenc, S., Portier, J., Maitre, A., Miaud, C., Raveton, M., 2012. Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). *Environ. Pollut.* 161, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.029>
- Rollins-Smith, L.A., 2009. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 1593-1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>
- Santos, A.T., Valverde, B.S.L., De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., 2021. Genotoxic and melanic alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 20072-20081. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w>

- Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C., 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat. Rec.* 297, 864-875. <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- Scaia, M.F., Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., Succi-Domingues, M., Oliveira, C., 2019. Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 22209-22219. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05403-8>
- Shi, Y., Jiang, J., Shan, Z., Bu, Y., Deng, Z., Cheng, Y., 2015. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology.* 24, 511-519. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1399-z>
- Svensson, P.A., Forsgren, E., Amundsen, T., Sköld, H.N., 2005. Chromatic interaction between egg pigmentation and skin chromatophores in the nuptial coloration of female two-spotted gobies. *J. Exp. Biol.* 2008, 4391-4397. <https://doi.org/10.1242/jeb.01925>
- Toledo, R.C., Jared, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 111, 1-29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)
- Van Meter, R.J., Glinski, D.A., Henderson, W.M., Garrison, A.W., Cyterski, M., Purucker, S.T., 2015. Pesticide uptake across the amphibian dermis through soil and overspray exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 545-556. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0183-2>
- Valverde, B.S.L.; Utsunomiya, H.S.M.; Carvalho, C.S.; Franco-Belussi, L.; De Oliveira, C. 2022. Response of hepatic biomarkers in *Physlaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes. *Ecotoxicology.* 31, 516-523. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>
- Verdade, V.K., Dixo, M., Curcio, F.F., 2010. Risks of extinction of frogs and toads as a result of environmental changes. *Estud. Av.* 24, 161-172.
- Wilcke, W., Amelung, W., Krauss, M., Martius, C., Bandeira, A., Garcia, M., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. *Org. Geochem.* 34, 1405-1417. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(03\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(03)00137-2)

FIGURE CAPTION

Figure 1 – A: Dorsal view of *Physalaemus nattereri* demonstrating de 1cm² square used to measure the dorsal darkening. B-C: Histological structure of the skin. Ep: epidermis, Er: erythrophore, GG: granular gland, I: iridophore, M: melanophore, MC: mast cell, MG: mucous gland. B – HE, 10µm. C – Toluidine blue with borax, 5 µm.

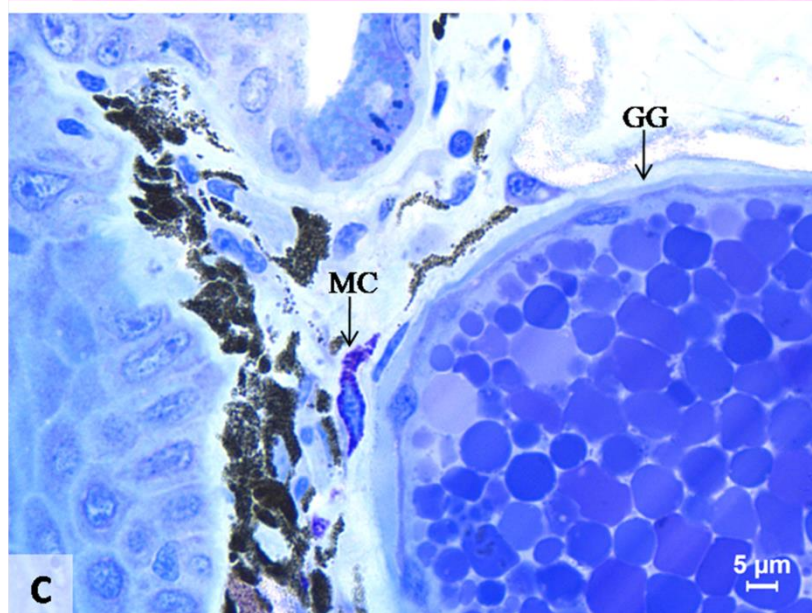
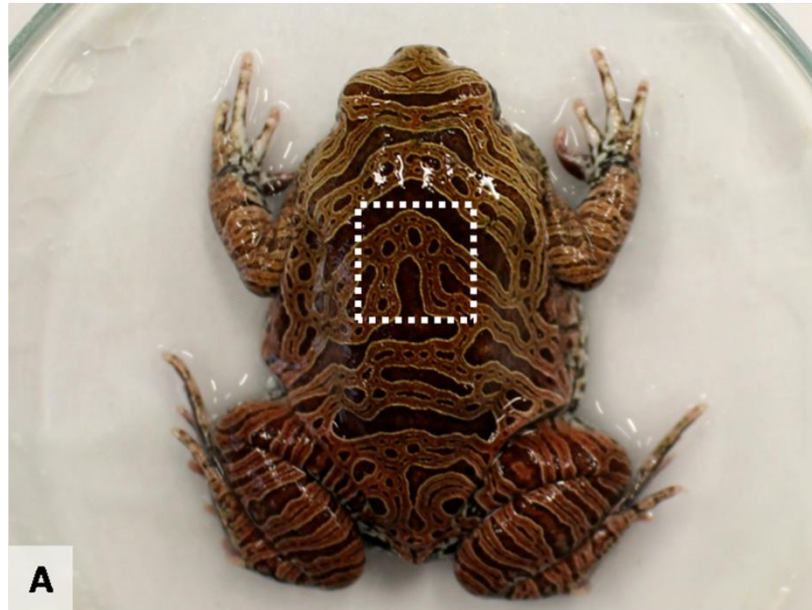


Table 1 – Data (mean $\pm$ SE) of the analysis of dorsal darkening, melanin area and mast cell frequency. The significant difference (control vs. treatment) is show in bold. Groups that share the same letter indicate differences between routes of administration at the same exposure time.

Time	Group	Darkening (%)	Melanin ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	Mast cells (n/mm ²)
1d	CC	89.7 $\pm$ 2.6	2.58 $\pm$ 0.48 ^A	7.31 $\pm$ 0.66
	CT	85.7 $\pm$ 1.6	2.54 $\pm$ 0.53 ^B	5.87 $\pm$ 0.81
	IC	86.1 $\pm$ 1.5	2.7 $\pm$ 0.46 ^C	8.66 $\pm$ 1.2
	IT	89.7 $\pm$ 1.6	3.06 $\pm$ 0.61 ^B	7.52 $\pm$ 2.44
	OC	86.3 $\pm$ 0.5	3.54 $\pm$ 0.71^{AC}	5.53 $\pm$ 1.14
	OT	88.2 $\pm$ 1.3	2.69 $\pm$ 0.44	6.37 $\pm$ 0.98
3d	CC	88.2 $\pm$ 2	3.78 $\pm$ 0.71^{AB}	9.76 $\pm$ 2.19
	CT	86.6 $\pm$ 1.3	2.5 $\pm$ 0.48	8.18 $\pm$ 1.44 ^A
	IC	84.5 $\pm$ 2.8	2.23 $\pm$ 0.44^A	7.01 $\pm$ 0.66
	IT	86.9 $\pm$ 2.5	2.66 $\pm$ 0.46	3.29 $\pm$ 0.55^{AB}
	OC	85.4 $\pm$ 1.9	2.62 $\pm$ 0.56 ^B	7.86 $\pm$ 1.38
	OT	86.8 $\pm$ 1.8	2.65 $\pm$ 0.46	8.78 $\pm$ 1.22 ^B
7d	CC	85.2 $\pm$ 2.3	2.66 $\pm$ 0.4	5.57 $\pm$ 1.43
	CT	86.2 $\pm$ 1.3	2.67 $\pm$ 0.47	5.43 $\pm$ 1.23
	IC	86.3 $\pm$ 1.9	2.81 $\pm$ 0.42	5.84 $\pm$ 0.87
	IT	82.3 $\pm$ 0.6	3.03 $\pm$ 1.63 ^A	7.04 $\pm$ 1.36
	OC	87.3 $\pm$ 1.4	2.65 $\pm$ 0.44	5.36 $\pm$ 1.12
	OT	86.6 $\pm$ 2.4	2.38 $\pm$ 0.53 ^A	5.05 $\pm$ 0.8

CAPÍTULO 4

Como os biomarcadores celulares (melanócitos, mastócitos e eritrócitos) de *Physalaemus nattereri* (Anura) respondem ao benzo(α)pireno e às distintas vias de exposição?

Bruno Serra de Lacerda Valverde^a, Cleoni dos Santos Carvalho^b, Classius de Oliveira^c

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), campus São José do Rio Preto.

^b Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM).

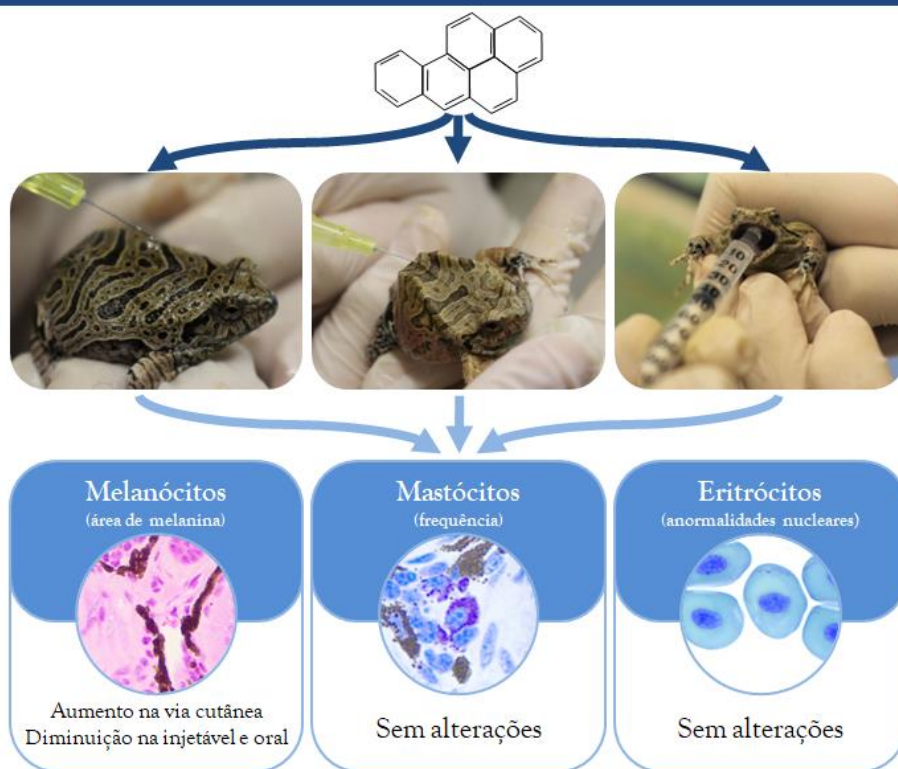
^c Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), campus São José do Rio Preto.

HIGHLIGHTS

- O benzo(α)pireno foi administrado por diferentes vias – cutânea, injetável e oral.
- O benzo(α)pireno provoca uma alteração histológica no testículo de anuros.
- A alteração consiste em mudanças na área de melanina nos melanócitos.
- Esse efeito é influenciado pela via de administração do composto.

GRAPHICAL ABSTRACT

Como os biomarcadores celulares respondem ao benzo(α)pireno e às distintas vias de exposição?



RESUMO

A poluição ambiental é um dos fatores responsáveis pelo declínio das espécies de anfíbios. Dentre os contaminantes encontrados em seus espécimes e nos ecossistemas em que residem destacamos o benzo(α)pireno (BaP), um hidrocarboneto carcinogênico que pode ser absorvido naturalmente por diferentes vias. Para avaliar os efeitos desses contaminantes, pesquisadores têm utilizado biomarcadores presentes em diferentes órgãos (e.g. testículo – melanócitos e mastócitos) e tecidos (e.g. sangue – anormalidades nucleares em eritrócitos). O objetivo desse projeto é avaliar alterações desencadeadas pelo BaP, em um curto espaço de exposição, e se essas alterações são influenciadas por sua via de administração. Para isso, espécimes de *Physalaemus nattereri* ($n = 108$) foram divididos em dois grupos (controle e tratado), cada um composto por três vias de administração (cutânea, injetável e oral) e três tempos de exposição (um, três e sete dias). Os espécimes receberam uma única administração de óleo mineral puro (controle) ou de óleo mineral contendo BaP [2mg/Kg]. Ao fim dos experimentos, não foram observadas alterações na frequência de anormalidades nucleares ou de mastócitos, mas houve um aumento na via cutânea, e uma diminuição, na via injetável e oral da área de melanina nos melanócitos. Apesar de não terem sido observados resultados significativos nos eritrócitos e mastócitos, as alterações na melanina fornecem um resultado inédito, onde o efeito do BaP é influenciado por sua via de administração, visto por meio da comparação da resposta biológica (aumento ou diminuição) entre as vias cutânea, injetável e oral.

Palavras-chave: Anfíbios; Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; Melanina; Sangue; Testículo.

1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios representam a classe de vertebrados com o maior número de espécies ameaçadas (IUCN, 2021), sendo as ações antrópicas, que inclui a poluição ambiental, uma das causas para esse declínio (Blaustein and Wake, 1995; Blaustein and Kiesecker, 2002; Blaustein et al., 2003). Desde o estabelecimento da poluição como fator relacionado ao declínio dos anfíbios, pesquisadores têm avaliado os efeitos de compostos químicos sobre diferentes órgãos e tecidos (Colombo et al., 2003; Saka et al., 2004; Çakici, 2014; Lajmanovich et al., 2014), dentre eles as gônadas (e.g. testículos) (Çakici, 2013; Gregorio et al., 2016) e o sangue (Gregorio et al., 2019; Santos et al., 2021).

Os testículos dos anuros são órgãos pareados, de formato esférico ou ovóide, localizados na porção ventral dos rins (Duellman and Trueb, 1994). São constituídos por lóculos, onde ocorre o processo de espermatogênese, e por um tecido intersticial de natureza conjuntiva, onde podem ser encontrados melanócitos e mastócitos (Duellman and Trueb, 1994; Oliveira and Vicentini, 1998; Franco-Belussi et al., 2013; De Oliveira et al., 2017). Os melanócitos são células pigmentares que sintetizam melanina (Schartl et al., 2016), um pigmento de coloração marrom-preto (Bagnara and Matsumoto, 2006) capaz de absorver e neutralizar radicais livres e substâncias tóxicas (Sichel, 1988; Zuasti et al., 1989). Os mastócitos, por sua vez, são células imunológicas (Pinelli et al., 2010) que atuam na resposta inflamatória induzida por patógenos ou por compostos químicos (Franco-Belussi et al., 2014; Fanali et al., 2018).

O sangue dos anuros consiste em um plasma, onde se encontram três tipos celulares: eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Duellman and Trueb, 1994). Similar aos peixes, répteis e aves os eritrócitos nos anuros são nucleados (Claver and Quaglia, 2009), o que possibilita avaliar: alterações genotóxicas (e.g. células binucleadas, *bud*

nuclear e micronúcleo) induzidas por compostos carcinogênicos (Fenech, 2007; Gregorio et al., 2019; Pérez-Iglesias et al., 2019), ou adaptações fisiológicas (e.g. células anucleadas) em resposta a ambientes poluídos (Barni et al., 2007).

O benzo(α)pireno (BaP) é um contaminante ambiental, com propriedades carcinogênicas, mutagênicas e tóxicas (Gelboin, 1980), que pode ser absorvido naturalmente pela alimentação, respiração ou por via cutânea (Netto et al., 2000). O BaP já foi identificado em anuros nativos (Vojinovic-Miloradov et al., 1996), além de ser encontrado em cupins – um componente da dieta de anuros (Araújo et al., 2009) – na água, ar e no solo (Wilcke et al., 2003; Nasr et al., 2010; Gupta et al., 2011).

Com base nessas informações, é interessante estabelecer a variação dos efeitos do BaP quando administrado por diferentes vias. Dessa forma, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos do BaP sobre o sangue e testículos de anuros, e se esses efeitos são modificados dependendo da via de exposição. Especificamente iremos avaliar a resposta dos eritrócitos, melanócitos e mastócitos, biomarcadores bem estabelecidos na literatura para anuros (Franco-Belussi et al., 2014, 2016; De Oliveira et al., 2017; Gregorio et al., 2019). Também iremos utilizar três vias de exposição (injetável, oral e cutânea) já utilizadas em estudos de laboratório (Regnault et al., 2014; Van Meter et al., 2015; Fanali et al., 2017; Awaad, 2020), mas que raramente são avaliadas em conjunto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental

Espécimes de *Physalaemus nattereri* foram coletados (#18573-1, RAN/IBAMA/MMA) (05/10/2018, 10/11/2018 e 11/01/2019) em São José do Rio Preto (20°42'22.6"S, 49°17'25.7"O). Após a coleta os exemplares foram encaminhados ao Laboratório de Anatomia Comparada da Universidade Estadual Paulista "Julio de

Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE), onde foram mantidos em aclimação, por nove dias. Durante a aclimação os espécimes foram pesados e separados em 18 grupos experimentais ($n=6$) compostos por três tempos (um, três e sete dias), três vias (cutânea, injetável e oral) e duas concentrações (0,00 e 2mg/Kg). No início dos experimentos, cada espécime recebeu uma única dose (volume de 0,02mL) de óleo mineral puro [0,00 – controle] ou óleo mineral contendo 2mg/Kg de B α P, administrados por aplicação cutânea dorsal, injeção subcutânea ou gotejamento na cavidade oral. Ao término dos tempos experimentais, os espécimes foram eutanasiados em solução aquosa de benzocaína [5g/L]. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP-CSJRP (nº 188/2018).

2.2. Análises histológicas

Os testículos foram removidos, fixados em solução de Karnovsky (0,1M de tampão fosfato Sörense pH 7,2% com 5% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) a 4°C por 24h e incluídos em historesina (Leica-Historesin embedding kit). Para quantificar a área de melanina (Figura 1A), secções histológicas de 2 μ m (Leica RM2265) foram coradas em hematoxilina-eosina. Vinte e cinco campos histológicos/animal foram fotografados (20x) e analisados no programa Image-Pro Plus (Media-Cybernetics Inc.) seguindo o protocolo de Santos et al. (2014). Para a quantificação de mastócitos, secções histológicas foram coradas em azul de toluidina com bórax e analisadas em microscópio de luz (40x), sendo contabilizados os mastócitos (Figura 1B) presentes em 10 campos histológicos/animal. Posteriormente os campos analisados foram fotografados em estereomicroscópio (Leica MZ16) e analisados no programa Image-Pro Plus para determinar a frequência de mastócitos/área de tecido.

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, após a dissecação, sendo fixadas em metanol a 4°C por 20 minutos. Lâminas foram coradas em Giemsa 7.5% e analisadas em microscópio de luz (100x – Leica DM4B), sendo contabilizadas as anormalidades nucleares (anucleada, binucleada, *bud* e micronúcleo – Figura 2) presentes em 2000 eritrócitos/animal.

2.3. Análise estatística

Foi realizado um Modelo Linear Generalizado (comparação tempo*grupo) com distribuição *binomial* (anormalidades nucleares), *quasibinomial* (frequência de mastócitos) e *gaussian* (área de melanina). As análises foram realizadas no programa RStudio (R Core Team).

3. RESULTADOS & DISCUSSÃO

3.1. Melanócitos

O BαP leva ao aumento da área de melanina testicular quando administrado pela via cutânea (três dias: 48,4%) e a diminuição quando administrado pela via injetável (um dia: 15,8%, sete dias: 12,9%) e oral (sete dias: 17,5%) ($p < 0,05$) (Tabela 1). Esse resultado demonstra que o efeito do BαP é influenciado pela via de exposição (Tabela 1). Diminuição na área de melanina testicular já foi relatada anteriormente para *P. nattereri* e *Physalaemus cuvieri* após três e sete dias, respectivamente, de exposição ao BαP por via injetável (De Oliveira et al., 2017). Apesar de não observamos alterações significativas, para a via injetável no tempo de três dias, é evidente que esta via leva à diminuição da pigmentação testicular (Tabela 1) e este padrão de resposta se mantém para diferentes espécies de anuros.

Roberto et al. (1996), utilizando um isótopo radioativo (^{14}C -BαP), observaram que tecidos contendo melanina podem absorver e reter o BαP, onde ele pode ser metabolizado em compostos carcinogênicos capazes de reagir com o DNA (Sims et al.,

1974; Agarwal et al., 1991). O B α P também pode regular o processo de melanogênese e inibir a síntese de melanina (Joo et al., 2015), o que justifica a diminuição observada na via injetável e oral. Outra possibilidade é a alteração da distribuição dos grânulos de melanina nos melanócitos. Espécimes de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), expostos ao B α P, apresentam uma diminuição da área ocupada pelos filamentos de actina, o que leva à agregação dos grânulos de melanina e uma diminuição da área pigmentar (Fanali et al., 2021a). Em relação à via de administração cutânea, nossos dados evidenciaram aumento da área de melanina testicular, que pode estar relacionado com as propriedades do próprio pigmento, que atua na neutralização de radicais livres (Sichel, 1988; Zuasti et al., 1989). Durante a metabolização do B α P são gerados radicais livres (e.g. ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil) (Penning, 2004; Saunders et al., 2006), que podem ter desencadeado uma resposta fisiológica da célula/pigmento, levando ao aumento da área de melanina.

3.2. Mastócitos

O B α P não provocou alterações na frequência de mastócitos, assim como não houve efeito da via de exposição ($p > 0,05$) (Tabela 1). Segundo Redegeld et al. (2018), a ativação do receptor de hidrocarboneto aril (AhR) – um receptor nuclear que regula a expressão de genes para o metabolismo de xenobióticos, incluindo o B α P (Ma and Lu, 2003; Madureira et al., 2004) – induz a produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode desencadear processos inflamatórios. Esses processos já foram relatados para *P. cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*, onde foi observado aumento na frequência de mastócitos no tecido hepático após um/sete/treze dias de exposição ao B α P. O fato de não observarmos essa alteração no testículo pode ser um indicativo que não houve processo inflamatório, mensurável pela frequência de mastócitos.

3.3. Eritrócitos

Após exposição ao BaP não foram observadas alterações na frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos de *P. nattereri*, assim como não houve influência da via de exposição sobre os efeitos do BaP ($p > 0,05$) (Tabela 2). Girinos de *Xenopus laevis* expostos ao BaP apresentam efeitos genotóxicos em eritrócitos após um dia de exposição, com uma redução dos danos após dois/quatro/oito/doze dias de exposição – o que foi associado a um mecanismo de reparo do DNA (Mouchet et al., 2005). Nesse trabalho, os autores também observaram que doses elevadas do BaP [1 e 10mg/L] apresentam uma tendência de redução dos danos no DNA, enquanto a menor dose [0,125mg/L] foi responsável por causar genotoxicidade – indicando que doses elevadas podem induzir o reparo do DNA. O fato de não observarmos alterações genotóxicas – mensuráveis pela contagem de anormalidades nucleares – em *P. nattereri* pode estar relacionado a esse mecanismo de reparo.

No entanto, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodacylus fuscus* expostos ao BaP [2mg/Kg] apresentaram aumento na frequência de micronúcleo após sete dias de exposição. Essa diferença de resultado pode estar relacionada às características da espécie (Fanali et al., 2018, 2021b), onde *P. nattereri* pode ter maior tolerância aos danos genéticos induzidos pelo BaP. Ou ainda, essa diferença de resultados pode estar relacionada aos diferentes protocolos experimentais. Em nosso trabalho, o BaP foi administrado uma única vez, enquanto no trabalho de Fanali et al. (2018) o BaP foi administração a cada dois dias, o que pode levar ao aumento na concentração de BaP em sete dias e consequentemente um maior número de alterações genotóxicas.

4. CONCLUSÃO

O BaP provoca alterações histológicas no testículo de *P. nattereri*. Comparativamente, as vias de exposição desencadeiam efeitos distintos, sendo a via cutânea responsável por um aumento da área de melanina, enquanto as vias injetável e

oral causam diminuição. Apesar do mecanismo, pelo qual o BαP altera a área pigmentar, não ter sido estabelecido, o resultado desse estudo fornece novas informações para os efeitos do BαP nos anuros e em seus órgãos reprodutivos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Ariane N.Q., Arleto T.S., Erick A.B., Gabriel C.C., Jorge Lucas O.P.A., Lara S.G., Lilian F.B., Maysa S.-D. e Wadson R.R. pelos auxílios nos experimentos e na metodologia.

Financiamento

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: 001 - Bruno S.L.V.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 304552/2019-4 – Classius O.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2018/01078-7 – Classius O.).

FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografias ilustrando melanócito/melanina (A) e mastócito (B) no testículo de *Physalaemus nattereri*. A: Hematoxilina-Eosina, 10µm. B: Azul de Toluidina, 5µm.

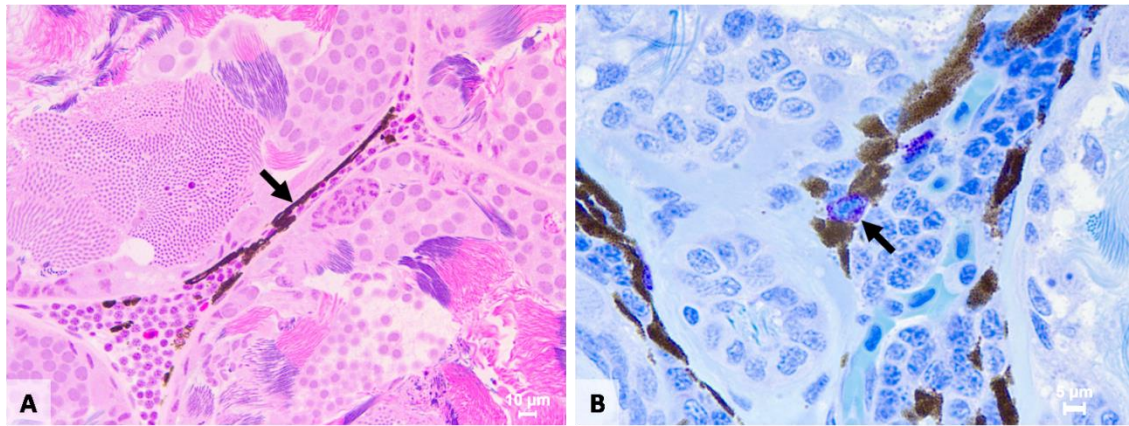
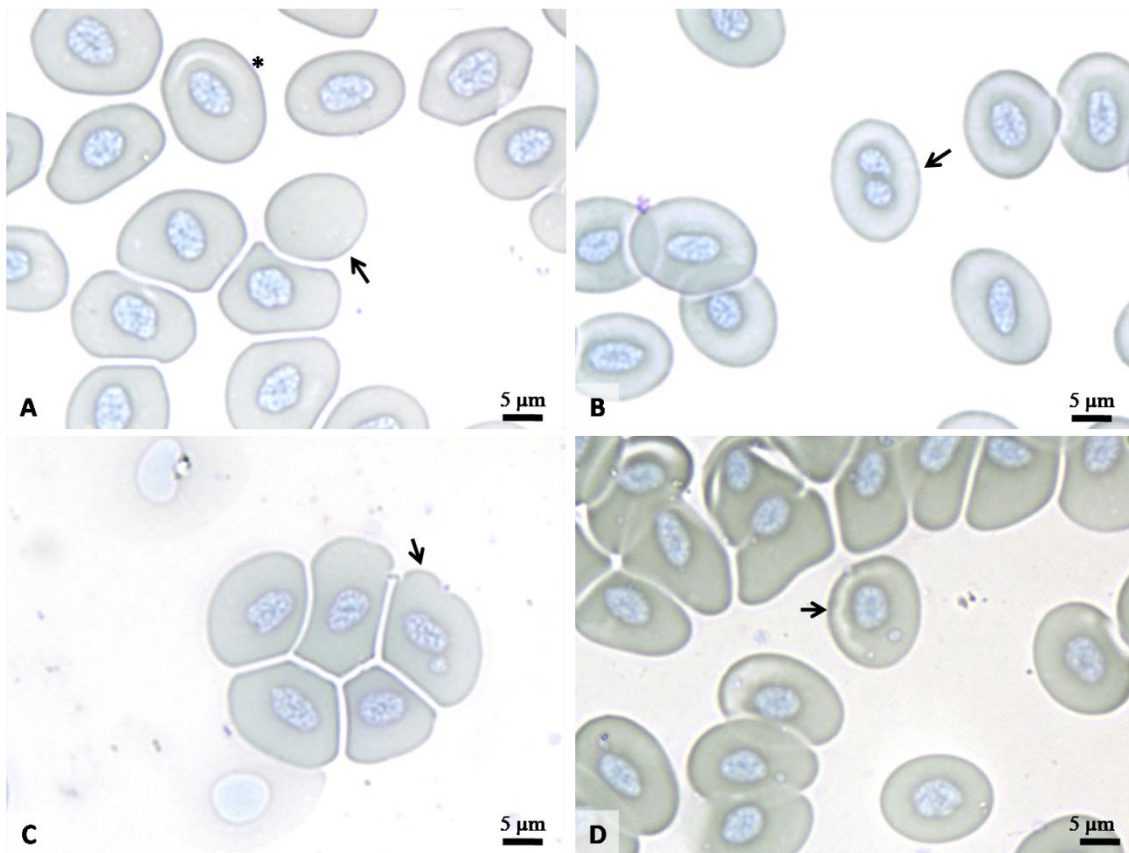


Figura 2 – Fotomicrografias ilustrando as anormalidades nucleares em eritrócitos de *Physalaemus nattereri*. (A) eritrócito normal (*) e anucleado (seta); (B) binucleado; (C) bud, (D) micronúcleo. Giemsa, 5µm.



TABELA

Tabela 1 – Frequência de mastócitos e área de melanina no testículo. Números em negrito indicam diferença ($p < 0.05$) entre controle e tratamento dentro do mesmo tempo e via de exposição. Números que compartilham a mesma letra indicam diferença entre vias de exposição dentro do mesmo tempo de exposição.

Time	Group	Mast Cells	Melanin
1d	CC	0.27 ± 0.21	532.1 ± 119.7
	CT	0.43 ± 0.18	748.1 ± 278.7^A
	IC	0.47 ± 0.19	513.3 ± 160.7
	IT	0.45 ± 0.21	432.4 ± 198.3^{AB}
	OC	0.25 ± 0.09	533.6 ± 184.3
	OT	0.44 ± 0.17	855.9 ± 346.9^B
3d	CC	0.17 ± 0.08	335.1 ± 143.9^A
	CT	0.52 ± 0.16	497.3 ± 191
	IC	0.50 ± 0.18	396.9 ± 153.3
	IT	0.13 ± 0.04	281.4 ± 101.6
	OC	1.05 ± 0.79	1052.7 ± 747.4^A
	OT	0.67 ± 0.23	487.5 ± 262.6
7d	CC	0.35 ± 0.14	388.5 ± 130.9^A
	CT	0.40 ± 0.16	607.9 ± 226.3^C
	IC	0.31 ± 0.22	691 ± 219^{AB}
	IT	0.28 ± 0.12	602.2 ± 468.1^C
	OC	0.38 ± 0.12	282.3 ± 112.5^B
	OT	0.34 ± 0.13	232.5 ± 108.7^C

1d: um dia; 3d: três dias; 7d: sete dias; CC/CT: cutânea controle/tratamento; IC/IT: injetável controle/tratamento; OC/OT: oral controle/tratamento.

Tabela 2 – Frequência de anormalidades nucleares presentes em 2000 eritrócitos por animal ($n=6$).

Time	Group	Anucleate	Binucleate	Bud	Micronucleus
1d	CC	0 ± 0	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0 ± 0
	CT	0.33 ± 0.33	0.17 ± 0.17	0.33 ± 0.21	0 ± 0
	IC	0.67 ± 0.67	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.17
	IT	0 ± 0	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0.33 ± 0.33
	OC	0 ± 0	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0 ± 0
	OT	0.17 ± 0.17	0 ± 0	0.67 ± 0.33	0.67 ± 0.33
3d	CC	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.17	0 ± 0	0 ± 0
	CT	0.17 ± 0.17	0 ± 0	0.17 ± 0.21	0.17 ± 0.17
	IC	0.33 ± 0.21	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.17
	IT	0.33 ± 0.21	0 ± 0	0 ± 0	0.33 ± 0.21
	OC	0.17 ± 0.17	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	OT	0.33 ± 0.33	0 ± 0	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.17
7d	CC	0.33 ± 0.33	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	CT	0.33 ± 0.33	0 ± 0	0.33 ± 0.21	0 ± 0
	IC	0 ± 0	0 ± 0	$0.17 - 0.17$	0 ± 0
	IT	0.67 ± 0.33	0.17 ± 0.17	0.33 ± 0.21	0.5 ± 0.34
	OC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	OT	0.67 ± 0.21	0 ± 0	0 ± 0	$0.17 - 0.17$

1d: um dia; 3d: três dias; 7d: sete dias; CC/CT: cutânea controle/tratamento; IC/IT: injetável controle/tratamento; OC/OT: oral controle/tratamento.

REFERÊNCIAS

- Agarwal, R., Medrano, E.E., Khan, I.U., Nordlund, J.J., Mukhtar, H., 1991. Metabolism of benzo[*a*]pyrene by human melanocytes in culture. *Carcinogenesis* 12, 1963-1966.
- Araújo, M.S., Bolnick, D.I., Martinelli, L.A., Giaretta, A.A., Dos Reis, S.F., 2009. Individual-level diet variation in four species of Brazilian frogs. *J. Anim. Ecol.* 78, 848-856.
- Awaad, A., 2020. The biodistribution of melanomacrophages and reactivity of PEG or amine-functionalized iron oxide nanoclusters in the liver and spleen of Egyptian toad after intraperitoneal or oral injections: histochemical study. *Acta Histochem* 122.
- Bagnara, J.T., Matsumoto, J., 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues, In: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Oetting, W.S., Ortonne, J.-P. (Eds.), *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*. 2 ed. Blackwell Publishing Ltd, pp. 11-59.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., Fenoglio, C., 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81, 45-54.
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* 5, 597-608.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M., Hatch, A.C., 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers. Distrib.* 9, 123-140.
- Blaustein, A.R.; Wake, D.B., 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Am.* 272, 52-57.
- Çakici, Ö., 2013. Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 96-101.
- Çakici, Ö., 2014. Carbaryl-induced histopathologic alterations in the digestive tract of the levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Toxicol. Pathol.* 42, 1032-1040.
- Claver, J.A., Quaglia, A.I.E., 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *J. Exot. Pet Med.* 18, 87-97.
- Colombo, A., Bonfanti, P., Orsi, F., Camatini, M., 2003. Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hydrocarbon receptor agonists and thyroid hormone in *Xenopus laevis* liver and intestine. *Aquat. Toxicol.* 63, 173-186.

- De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fanali, L.Z., Santos, L.R.S., 2017. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans, In: Larramendy, M.L. (Ed.), *Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models*. The Royal Society of Chemistry, pp. 123-142.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R., Oliveira, C., 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ. Pollut.* 237, 93-102.
- Fanali, L.Z., De Oliveira, C., Sturve, J., 2021a. Enzymatic, morphological, and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 53926-53935.
- Fanali, L.Z., Sturve, J., Oliveira, C., 2021b. Exposure of *Physalaemus cuvieri* (Anura) to benzo[a]pyrene and α -naphthoflavone: morphofunctional effects on hepatic melanomacrophages and erythrocytes abnormalities. *Environ. Pollut.* 285.
- Fanali, L.Z., Valverde, B.S.L., Franco-Belussi, L., Provete, D.B., Oliveira, C., 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. *Amphib.-Reptil.* 38, 175-185.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084-1104.
- Franco-Belussi, L., Leite, G.B., Freitas, J.S., Oliveira, C., 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anim. Biol.* 64, 261-275.
- Franco-Belussi, L., Castrucci, A.M.L., Oliveira, C., 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^4 , $D-Phe^7$ - α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zool.* 116, 316-324.
- Franco-Belussi, L., Sköld, H.N., Oliveira, C., 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J. Exp. Biol.* 219, 1378-1383.
- Gelboin, H.V., 1980. Benzo[α]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulations of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107-1166.
- Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., De Oliveira, C., 2019. Genotoxic effects of 4-nonylphenol and cyproterone acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. *Environ. Pollut.* 251, 879-884.

- Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., Gomes, F.R., De Oliveira, C., 2016. Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical anura, *Rhinella schneideri*. *Aquat. Toxicol.* 176, 181-189.
- Gupta, S., Kumar, K., Srivastava, A., Srivastava, A., Jain, V.K., 2011. Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle sample from the atmospheric environment of Delhi, India. *Sci.Total Environ.* 409, 4674-4680.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature), 2021. Summary Statistics. The IUCN Red List of Threatned Species. <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>.
- Joo, D.H., Cha, H.J., Kim, K., Jung, M., Ko, J.M., An, I.S., Lee, S.N., Jang, H.H., Bae, S., Roh, N.K., Ahn, K.J., An, S., 2015. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol. Cell. Toxicol.* 11, 349-355.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat. Res.* 729, 7-12.
- Ma, Q., Lu, A.Y.H., 2003. Origins of individual variability in P4501A induction. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 249-260.
- Madureira, D.J., Weiss, F.T., Midwoud, P.V., Helbling, D.E., Sturla, S.J., Schirmer, K., 2014. Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo(a)pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 443-453.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ. Toxicol.* 20, 74-84.
- Nasr, I.N., Arief, M.H., Abdel-Aleem, A.H., Malhat, F.M., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. *J. Appl. Sci. Res.* 6, 13-21.
- Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Quim. Nova* 23, 765-773.
- Oliveira, C., Vicentini, C.A., 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura Hylidae). *Biociencias* 6, 79-88.

Penning, T.M., 2004. Aldo-keto reductase and formation of polycyclic aromatic hydrocarbons *o*-quinones. *Meth. Enzymol.* 378, 31-67.

Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C., 2019. Biomarkers at different levels of organization after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schineideri* (Anura: Bufonidae) neotropical tadpoles. *Environ. Pollut.* 244, 733-746.

Pinelli, C., Santillo, A., Baccari, G.C., Monteforte, R., Rastogi, R.K., 2010. Mast cells in the amphibian brain during development. *J. Anat.* 216, 397-406.

Redegeld, F.A., Yu, Y., Kumari, S., Charles, N., Blank, U., 2018. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol. Rev.* 282, 87-113.

Regnault, C., Worms, I.A.M., Oger-Desfeux, C., Melodelima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.-L., Combourieu, B., Bonin, A., Renaud, J., Raveton, M., Reynaud, S., 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMG Genomics* 15.

Roberto, A., Larsson, B.S., Tjälve, H., 1996. Uptake of 7, 12-dimethylbenzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 92-99.

Saka, M., 2004. Developmental toxicity of *p, p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1065-1073.

Santos A.T., Valverde, B.S.L., De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., 2021. Genotoxic and melanin alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 20072-20081.

Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C., 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat. Rec.* 297, 864-875.

Saunders, C.R., Das, S.K., Ramesh, A., Shockley, D.C., Mukherjee, S., 2006. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J. Appl. Toxicol.* 26, 427-438.

Schartl, M., Larue, L., Goda, M., Bosenberg, M.W., Hashimoto, H., Kelsh, R.N., 2016. What is a vertebrate pigment cell? *Pigment Cell Melanoma Res.* 29, 8-14.

Sichel, G., 1988. Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. *Pigment Cell Res.* 1, 250-258.

Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A., 1974. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252, 326-328.

Van Meter, R.J., Glinski, D.A., Henderson, W.M., Garrison, A.W., Cyterski, M., Purucker, S.T., 2015. Pesticide uptake across the amphibian dermis through soil and overspray exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 545-556.

Vojinovic-Miloradov, M., Buzarov, D., Adamov, J., Simic, S., Popovic, E., 1996. Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. Water Sci. Technol. 34, 153-156.

Wilcke, W., Amelung, W., Krauss, M., Martius, C., Bandeira, A., Garcia, M., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. Org. Geochem. 34, 1405-1417.

Zuasti, A., Jara, J.R., Ferrer, C., Solano, F., 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. Pigment Cell Res. 2, 93-99.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O BαP provoca alterações na atividade das enzimas antioxidantes, na área pigmentar e na frequência de mastócitos. Esse efeito é influenciado pela via de exposição do composto, podendo ser observado na área de melanina do fígado, onde as vias naturais (cutânea e oral) causam uma diminuição da área, enquanto na injetável ocorre um aumento.

- O efeito da via de exposição é variável para cada órgão, sendo observado quando comparamos os resultados pigmentares da pele e do testículo. Na pele, assim como no fígado, as vias naturais causam uma diminuição da área de melanina, e a via injetável um aumento. No testículo, as vias orais e injetáveis diminuem a melanina, enquanto a cutânea provoca um aumento. Isso demonstra que o mesmo tipo celular (melanócito) responde de maneira distinta ao BαP dependendo do órgão analisado.

- A alteração na área de melanina do fígado não está relacionada com a quantidade total de melanina presente no órgão, o que indica uma mudança ligada à dispersão/agregação dos grânulos de melanina nos melanomacrófagos. No testículo, as mudanças pigmentares, em especial na via oral e injetável, seguem o mesmo padrão para outros trabalhos na literatura, demonstrando uma resposta fixa do órgão frente ao BαP.

- As alterações sobre os biomarcadores bioquímicos são indicativos de estresse oxidativo ou desbalanço oxidativo induzido pelo BαP. Entretanto, as alterações significativas foram poucas, o que pode estar relacionado com o tempo de resposta desses biomarcadores, que pode ocorrer em tempos inferiores às 24h – o que implica em encurtar o tempo de exposição para avaliar um efeito imediato inferior à 24h.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

AGARWAL R.; MEDRANO, E. E.; KHAN, I. U.; NORDLUND, J. J.; MUKHTAR, H. Metabolism of benzo[a]pyrene by human melanocytes in culture. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1963-1966, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/12.10.1963>

AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical study on the Genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, v. 24, p. 471-488, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 499-509, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

ALLENDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 463-480, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.006>

ANDERSON, R. S.; DÖÖS, J. E.; ROSE, F. L. Differential ability of *Ambystoma tigrinum* hepatic microsomes to produce mutagenic metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines. **Cancer Letters**, v. 16, p. 33-41, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(82\)90088-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(82)90088-X)

ARAÚJO, M. S.; BOLNICK, D. I.; MARTINELLI, L. A.; GIARETTA, A. A.; DOS REIS, S. F. Individual-level diet variation in four species of Brazilian frogs. **Journal of Animal Ecology**, v. 78, p. 848-856, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01546.x>

ARFFMANN, E. Studies on the newt test for carcinogenicity: 2. tributyrin and propylene glycol as solvents. **Acta Pathologica Microbiologica**, v. 55, p. 281-288, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1962.tb04127.x>

ARFFMANN, E. Studies on the newt test for carcinogenicity: 3. non-carcinogenic and weak carcinogenic hydrocarbons. **Acta Pathologica Microbiologica**, v. 57, p. 375-394, 1963. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1963.tb05106.x>

ARFFMANN, E.; CHRISTENSEN, B. C. Studies on the newt test for carcinogenicity: 1. benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and 3-methylcholanthrene. **Acta Pathologica Microbiologica**, v. 52, p. 330-342, 1961. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1961.tb03201.x>

ASPENGREN, S.; HEDBERG, D.; SKÖLD, H. N.; WALLIN, M. New Insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 272, p. 245-302, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01606-7](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01606-7)

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: US Department of Health & Human Services, 1995. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>

AWAAD, A. The biodistribution of melanomacrophages and reactivity of PEG or amine-functionalized iron oxide nanoclusters in the liver and spleen of Egyptian toad after intraperitoneal or oral injections: histochemical study. **Acta Histochemica**, v. 122, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151629>

BACCARI, G. C.; PINELLI, C.; SANTILLO, A.; MINUCCI, S.; RASTOGI, R. K. Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 290, p. 1-53, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386037-8.00006-5>

BACHMANN, K. 2009. Drug Metabolism. In: HACKER, M.; MESSER, W.; BACHMANN, K. (eds.). **Pharmacology: principles and practice**. Academic Press, 2009. p. 131-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00008-7>

BAGNARA, J. T.; MATSUMOTO, J. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. In: NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. E.; HEARING, V. J.; KING, R. A.; OETTING, W. S.; ORTONNE, J.-P. (ed.). **The pigmentary system: physiology and pathophysiology**. 2 ed. Blackwell Publishing Ltd, 2006. p. 11-59. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470987100.ch2>

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, p. 106-114, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.20095>

BALASENTHIL S.; SAROJA, M.; RAMACHANDRAN, C. R.; NAGINI, S. Of human and hamsters: comparative analysis of lipid peroxidation, glutathione, and glutathione-dependent enzymes during oral carcinogenesis. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 38, p. 267-270, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1054/bjom.1999.0445>

BALLS, M. Benzpyrene-Induced tumours in the clawed toad, *Xenopus laevis*. **Experientia**, v. 20, p. 143-145, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02150702>

BALLS, M.; RUBEN, L. N. A review of the chemical induction of neoplasms in amphibian. **Experientia**, v. 20, p. 241-296, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02151781>

BANTLE, J. A. 1995. FETAX – a developmental toxicity assay using frog embryos. In: RAND, G. M. (ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Second Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1995. p. 207-230. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003075363-9>

- BARNES, J. L.; ZUBAIR, M.; JOHN, K.; POIRIER, M. C.; MARTIN, F. L. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, p. 1213-1224, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic toxicology**, v. 81, p. 45-54, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 1, p. 113-123, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>
- BARTSCH, H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. **Mutation Research**, v. 340, p. 67-79, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90040-8](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90040-8)
- BLACK, M. C. Routes of administration for chemical agents. In: OSTRANDER, G. K. (ed.). **The Laboratory fish**. Academic Press, 2000. pp. 529-542. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012529650-2/50040-8>
- BLAUSTEIN, A. R.; BANCROFT, B. A. 2007. Amphibian population declines: evolutionary considerations. **BioScience**, v. 57, p. 437-444, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1641/B570517>
- BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, p. 597-608, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>
- BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; KIESECKER, J. M.; HATCH, A. C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 123-140, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00015.x>
- BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**, v. 272, p. 52-57, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0495-52>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BREEDIS, C. Induction of accessory limbs and of sarcoma in the newt (*Triturus viridescens*) with carcinogenic substances. **Cancer Research**, v. 12, p. 861-866, 1952.
- BRINKMANN, J.; STOLPMANN, K.; TRAPPE, S.; OTTER, T.; GENKINGER, D.; BOCK, U.; LIEBSCH, M.; HENKLER, F.; HUTZLER, C.; LUCH, A. Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene.

Toxicological Sciences, v. 131, p. 351-359, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs316>

BRODEUR, J. C.; VERA-CANDIOTTI, J. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the pampa region of Argentina. In: LARRAMENDY, M. L. (ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models**. The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 163-194. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00163>

BUKOWSKA, B.; MOKRA, K.; MICHALOWICZ, J. Benzo[a]pyrene – environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116348>

BURLIBAŞA, L.; GAVRILĂ, L. 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 9, p. 1-15, 2011. DOI: https://doi.org/10.15666/aeer/0901_001015

BUSBEE, D. L.; GUYDEN, J.; KINGSTON, T.; ROSE, F. L.; CANTRELL, E. T. Metabolism of benzo(a)pyrene in animals with high aryl hydrocarbon hydroxylase levels and high rates of spontaneous cancer. **Cancer letters**, v. 4, p. 61-67, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(78\)93467-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(78)93467-5)

ÇAKICI, Ö. Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 91, p. 96-101, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1010-y>

ÇAKICI, Ö. Carbaryl-induced histopathologic alterations in the digestive tract of the levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). **Toxicologic Pathology**, v. 42, p. 1032-1040, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623313503517>

CAMATINI, M.; BONFANTI, P.; COLOMBO, A.; URANI, C.; CRIPPA, S. Cellular and molecular targets of benzo[a]pyrene and metal toxicity in *Xenopus laevis* embryos and in Hep G2 cells. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, p. 325-337, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1177/026119299902700321>

CARLSON, E. A.; LI, Y.; ZELIKOFF, J. T. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. **Aquatic Toxicology**, v. 56, p. 289-301, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00223-5)

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, p. 1-27, 2008. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2008.v67.32785>

CARVALHO, C. S.; BERNUSSO, V. A.; FERNANDES, M. N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 220-227, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.003>

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, v. 538, p. 81-91, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00091-3)

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Decisão de diretoria nº 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016. Dispõe sobre a aprovação dos “valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo – 2016” e dá outras providências. **Diário Oficial Estado de São Paulo: Caderno Executivo I (Poder Executivo, seção 1)** n. 126, p. 55-56, 24 nov. 2016. Disponível em: <https://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016-Intranet.pdf>.

CHEH, A. M.; HOOPER, A. B.; SKOCHDOPOLE, J.; HENKE, C. A.; MCKINNELL, R. G. A comparasion of the ability of frog and rat S-9 to activate promutagens in the Ames test. **Environmental Mutagenesis**, v. 2, p. 487-508, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860020407>

CHIU, H.; LAGUNOFF, D. Histochemical comparison of vertebrate mast cells. **Histochemical Journal**, v. 4, p. 135-144, 1972. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01004972>

CLARK, H. F.; DIAMOND, L. Comparative studies in the interaction of benzpyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. II. Effect of temperature on benzpyrene metabolism and cell multiplication. **Journal of Cellular Physiology**, v. 77, p. 385-392, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.1040770313>

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, p. 365-379, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0006323197005045>

CLAVER, J. A.; QUAGLIA, A. I. E. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, p. 87-97, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>

COLLINS, A.R. The Comet Assay. In: DIDENKO, V. V. (ed.). **In situ detection of DNA damage: Methods and protocols**, v. 203. Humana Press, 2002. p. 163-177. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163>

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distribution**, v. 9, p. 89-98, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x>

COLOMBO, A.; BONFANTI, P.; CICCOTELLI, M.; DOLDI, M.; DELL'ORTO, N.; CAMATINI, M. Induction of cytochrome P4501A isoform in *Xenopus laevis* is a valid

tool for monitoring the exposure to benzo[a]pyrene. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, v. 5, p. 207-211, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00124108>

COLOMBO, A.; BONFANTI, P.; ORSI, F.; CAMATINI, M. Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hydrocarbon receptor agonists and thyroid hormone in *Xenopus laevis* liver and intestine. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 173-186, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00178-9](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00178-9)

COLOMBO, S.; BERLIN, I.; DELMAS, V.; LARUE, L. Classical and nonclassical melanocytes in vertebrates. In: BOROVSANSKY, J.; RILEY, P. A. (ed.). **Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions**. 1 ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. p. 21-61. DOI: <https://doi.org/10.1002/9783527636150.ch2>

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009 [Alterada pela Resolução CONAMA nº 460/2013 (altera o prazo do art. 8º, e acrescenta novo parágrafo)]. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**: n. 249, p. 81-84, 30 dez. 2009. Disponível em: http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=601

CRIVELLATO, E.; TRAVAN, L.; RIBATTI, D. The phylogenetic profile of mast cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 1220, p. 11-27, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_2

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M.; BUSE, A. M. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>

DAS, M.; MAHAPATRA, P. K. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/701746>

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; SANTOS, L. R. S. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. In: LARRAMENDY, M. L. (ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models**. The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 123-142. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00123>

DI MATTEO, L.; VITIELLO, I. I.; MINUCCI, S. Effects of sex steroid hormones and their antagonists on mast cell number in the testis of the frog, *Rana esculenta*. **Zygote**, v. 8, p. 225-234, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199400001027>

DIAMOND, L.; CLARK, H. F. Comparative studies on the interaction of benzo[a]pyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I.

- Metabolism of benzo[a]pyrene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 45, p. 1005-1012, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/45.5.1005>
- DJOMO, J. E.; FERRIER, V.; GAUTHIER, L.; ZOLL-MONTREUX, C.; MARTY, J. Amphibian micronucleus test *in vivo*: evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. **Mutagenesis**, v. 10, p. 223-226, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/10.3.223>
- DUBEY, S.; ROULIN, A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, p. 327-338, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12231>
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibian**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994. ISBN 0-8018-4780-X
- DURAN-REYNALS, F. 1939. A note on the action of some carcinogenic hydrocarbons on amphibian. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 11, p. 613-617, 1939.
- FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>
- FANALI, L. Z.; DE OLIVEIRA, C.; STURVE, J. Enzymatic, morphological, and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 53926-53935, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14583-1>
- FANALI, L. Z.; STURVE, J.; OLIVEIRA, C. Exposure of *Physalaemus cuvieri* (Anura) to benzo[a]pyrene and α -naphthoflavone: morphofunctional effects on hepatic melanomacrophages and erythrocytes abnormalities. **Environmental Pollution**, v. 285, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117526>
- FANALI, L. Z.; VALVERDE, B. S. L.; FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D. B.; OLIVEIRA, C. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. **Amphibia-Reptilia**, v. 38, p. 175-185, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-00003101>
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-132, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>

- FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 259-268, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>
- FERNANDEZ, M.; GAUTHIER, L.; JAYLET, A. Use of newt larvae for *in vivo* genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by the micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 4, p. 17-26, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.17>
- FERNANDEZ, M.; JAYLET, A. 1987. An antioxidant protects against the clastogenic effects of benzo[a]pyrene in the newt *in vivo*. **Mutagenesis**, v. 2, p. 293-297, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/2.4.293>
- FERNANDEZ, M.; L'HARIDON, J. Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 24, p. 124-136, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2850240208>
- FERNANDEZ, M.; L'HARIDON, J.; GAUTHIER, L.; ZOLL-MONTREUX, C. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating *in vivo* genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 292, p. 83-99, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(93\)90010-W](https://doi.org/10.1016/0165-1161(93)90010-W)
- FERNANDES, I. F.; UTSUNOMIYA, H. S. M.; VALVERDE, B. S. L.; FERRAZ, J. V. C.; FUJIWARA, G. H.; GUTIERRES, D. M.; OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FERNANDES, M. N.; CARVALHO, C. S. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Chemosphere**, v. 275, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>
- FERRIER, V.; GAUTHIER, L.; ZOLL-MONTREUX, C.; L'HARIDON, J. Genotoxicity tests in amphibians – a review. In: WELLS, P. G.; LEE, K.; BLAISE, C.; GAUTHIER, J (eds.). **Microscale testing in aquatic toxicology**. CRC Press, 1998. p. 507-519. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780203747193-35>
- FORT, D. J.; DAWSON, D. A.; BANTLE, J. A. Development of a Metabolic Activation System for the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX). **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 8, p. 251-263, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/tcm.1770080502>
- FORT, D. J.; JAMES, B. L.; BANTLE, J. A. Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX) and a metabolic activation system. **Journal of Applied Toxicology**, v. 9, p. 377-388, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2550090603>
- FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A. M. L.; OLIVEIRA, C. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to

Nle⁴, D-Phe⁷- α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. **Zoology**, v. 116, p. 316-324, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.06.003>

FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; DE OLIVEIRA, C. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 180, p. 109-117, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>

FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G. B.; FREITAS, J. S.; OLIVEIRA, C. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Animal Biology**, v. 64, p. 261-275, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1163/15707563-00002445>

FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L. R. S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): occurrence and comparasion. **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p. 102-110, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2010.12.001>

FRANCO-BELUSSI, L.; SKÖLD, H.N.; OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 1378-1383, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>

FROST, D. R. Amphibian Species of the world: an online reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, USA. DOI: <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>

Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acesso em: 11 de julho de 2022

GALLI, S. J.; WERSHIL, B. K. The two faces of the mast cell. **Nature**, v. 381, p. 21-22, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1038/381021a0>

GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CICERO, R. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. a new melanogenic system? **Pigment Cell Research**, v. 15, p. 32-40, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00052.x>

GARRIGUES, P.; DJOMO, J. E.; FERRIER, V.; DAUTA, A.; MONKIEDJE, A.; MVONDO ZE, A.; NARBONNE, J. F. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated sediment by the amphibian larvae (*Pleurodeles waltl*). **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 24, p. 207-219, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1080/10406630490460692>

GELBOIN, H. V. Benzo[α]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulations of mixed-function oxidases and related enzymes. **Physiological reviews**, v. 60, p. 1107-1166, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.4.1107>

GODET, F.; BABUT, M.; BURNEL, D.; VEBER, A.-M.; VASSEUR, P. The genotoxicity of iron and chromium in electroplating effluents. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 370, p. 19-28, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90123-8](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90123-8)

- GRAY, J. E. 1825. A synopsis of the genera of reptiles and Amphibia, with a description of some new species. *In: Annals of Philosophy*. London, v. 10, p. 193–217, 1825. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/218438>
- GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Genotoxic effects of 4-nonylphenol and cyproterone acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 879-884, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.076>
- GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; GOMES, F. R.; DE OLIVEIRA, C. Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical anura, *Rhinella schneideri*. **Aquatic Toxicology**, v. 176, p. 181-189, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.022>
- GREGORIO, L. S.; FREITAS, J. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. LPS-induced alterations in reproductive organs and liver pigmentation in *Rhinella diptycha* (Bufonidae) toads. **Canadian Journal of Zoology**, v. 96, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0012>
- GRINFELD, S.; JAYLET, A.; SIBOULET, R.; DEPARIS, P.; CHOUROULINKOV, I. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene: dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug. **Environmental Mutagenesis**, v. 8, p. 41-51, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860080105>
- GUPTA, S.; KUMAR, K.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, A.; JAIN, V. K. Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle sample from the atmospheric environment of Delhi, India. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4674-4680, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.008>
- GUTIERRE, R. C.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; COPPI, A. A.; EGAMI, M. I. Melanomacrophage functions in the liver of the caecilian *Siphonius annulatus*. **Journal of Anatomy**, v. 232, p. 497-508, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/joa.12757>
- HANKINSON, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 307-340, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.001515>
- HÖHN-BENTZ, J.; KURELEC, B.; ZAHN, R. K. Fast ephemeral DNA damage upon BaP injection. **The Science of the Total Environment**, v. 32, p. 13-27, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(83\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(83)90129-8)
- HOOGLUJIN, M.J.; CEMELI, E.; ROSS, K.; ANDERSON, D.; THODY, A.J.; WOOD, J.M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, v. 294, p. 60-67, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.007>
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Bitumens and bitumen emissions and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IARC monographs

on the evaluation of carcinogenic risk to humans, v. 103, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294234/>

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental Health criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. World Health Organization, 1998. Disponível em: <https://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>

IUCN (International Union for Conservation of Nature). Summary Statistics. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>. Acesso em: 14 mar. 2022.

JAYLET, A.; DEPARIS, P.; FERRIER, V.; GRINFELD, S.; SIBOULET, R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. **Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 164, p. 245-257, 1986a. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(86\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0165-1161(86)90058-0)

JAYLET, A.; DEPARIS, P.; GASCHIGNARD, D. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents. **Mutagenesis**, v. 1, p. 211-215, 1986b. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/1.3.211>

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-n](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-n).

JOHANNING, K.; HANCOCK, G.; ESCHER, B.; ADEKOLA, A.; BERNHARD, M. J.; COWAN-ELLSBERRY, C.; DOMORADZKI, J.; DYER, S.; EICKHOFF, C.; EMBRY, M.; ERHARDT, S.; FITZSIMMONS, P.; HALDER, M.; HILL, J.; HOLDEN, D.; JOHNSON, R.; RUTISHAUSER, S.; SEGNER, H.; SCHULTZ, I.; NICHOLS, J. Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction. **Current Protocols in Toxicology**, v. 53, p. 14.10.1-14.10.28, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1410s53>

JOO, D. H.; CHA, H. J.; KIM, K.; JUNG, M.; KO, J. M.; AN, I. S.; LEE, S. N.; JANG, H. H.; BAE, S.; ROH, N. K.; AHN, K. J.; AN, S. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 11, p. 349-355, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13273-015-0035-1>

JOSENDE, M. E.; TOZETTI, A. M.; ALALAN, M. T.; MATHIES FILHO, V.; XIMENEZ, S. S.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; MARTINS, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, p. 57-88, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)

- KAISER, P.; ROTHWELL, L.; AVERY, S.; BALU, S. Evolution of the interleukins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 375-394, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.004>
- KARAMI, A.; CHRISTIANUS, A.; ISHAK, Z.; SYED, M. A.; COURTENAY, S. C. The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1558-1566, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.05.012>
- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the Glutathione S-Transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- KENNERLEY, G.A.; PARRY, J.M. Analysis of benzo[a]pyrene induced mutations by the use of restriction-site mutation assays in aquatic species. **Mutation Research/Fundamental and Molecular of Mutagenesis**, v. 307, p. 223-228, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90295-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90295-X)
- KRANZ, H. Changes in splenic melano-macrophage centers of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 167-173, 1989. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao006167>
- LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; ATTADAMO, A. M.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research**, v. 729, p. 7-12, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>
- LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182-186, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6)
- LARSSON, B. S. Interaction between chemicals and melanin. **Pigment Cell Research**, v. 6, p. 127-133, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x>
- LEMAIRE, P.; LEMAIRES-GONY, S.; BERHAUT, J.; LAFAURIE, M. The uptake, metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene administered by force-feeding in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 23, p. 244-251, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(92\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(92)90062-8)
- LEMAIRE, P.; MATHIEU, A.; CARRIERE, S.; DRAL, P.; GIUDICELLI, J.; LAFAURIE, M. The uptake metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 20, p. 223-233, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(90\)90001-L](https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90001-L)
- LI, J. L.; CHEN, B.-H. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 2825-2835, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00169-0)

- LINDQUIST, N. G.; LARSSON, B. S.; LYDÉN-SOKOLOWSKI, A. Neuromelanin and its possible protective and destructive properties. **Pigment Cell Research**, v. 1, p. 133-136, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1987.tb00403.x>
- LINDQUIST, N.G.; LARSSON, B.S.; LYDÉN-SOKOLOWSKI, A. Autoradiography of [^{14}C]paraquat or [^{14}C]diquat in frogs and mice: accumulation in neuromelanin. **Neuroscience Letters**, v. 93, p. 1-6, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90002-X)
- MA, Q.; LU, A. Y. H. Origins of individual variability in P4501A induction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, p. 249-260, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx0200919>
- MANN, M.; BIDWELL, J. Toxicological issues for amphibians in Australia. In: CAMPBELL, A. (ed.). **Declines and disappearances of Australian frogs**. Environment Australia, 1999. p. 185-201.
- MANN, R. M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2903-2927, 2009. DOI: [10.1016/j.envpol.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015)
- MADUREIRA, D. J.; WEISS, F. T.; MIDWOUT, P. V.; HELBLING, D. E.; STURLA, S. J.; SCHIRMER, K. Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo(a)pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 443-453, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx400446q>
- MARQUIS, O.; MIAUD, C.; FICETOLA, G. F.; BOCHER, A.; MOUCHET, F.; GUITTONNEAU, S.; DEVAUX, A. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 152-161, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.001>
- MARTINI, F.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. V.; PABLOS, M. V. Gene expression of heat shock protein 70, interleukin-1 β and tumor necrosis factor α as tools to indentify immunotoxic effects on *Xenopus laevis*: a dose-response study with benzo[a]pyrene and its degradation products. **Environmental Pollution**, v. 160, p. 28-33, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.016>
- MARTY, J.; DJOMO, J. E.; BEKAERT, C.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Relationships between formation of micronuclei and DNA adducts and EROD activity in newts following exposure to benzo(a)pyrene. **Environmental and Molecular Mautagenesis**, v. 32, p. 397-405, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1998\)32:4<397::AID-EM14>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1998)32:4<397::AID-EM14>3.0.CO;2-U)
- MARTY, J.; LESCA, P.; JAYLET, A.; ARDOUREL, C.; RIVIÈRE, J. L. *In vivo* and *in vitro* metabolism of benzo(a)pyrene by the larva of the newt, *Pleurodeles waltl*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 93, p. 213-219, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90223-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90223-5)

- MARTY, J.; MICHEL, X. R.; NARBONNE, J. F.; FERRIER, V. *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in a lower vertebrate, the newt *Pleurodeles walt*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, p. 51-57, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1084>
- MATOS, E. L.; LUSTIG, E. S. Teratogenic effects of carcinogen implantation in a regenerative field in *Bufo arenarum* tadpoles. **Teratology**, v. 8, p. 167-174, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1002/tera.1420080209>
- MCNAMARA, M. E.; ROSSI, V.; SLATER, T. S.; ROGERS, C. S.; DUCREST, A.-L.; DUBEY, S.; ROULIN, A. Decoding the evolution of melanin in vertebrates. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 36, p. 430-443, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.012>
- MILLER, K. P.; RAMOS, K. S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews**, v. 33, p. 1-35, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1081/dmr-100000138>
- MITCHELMORE, C. L.; BIRMELIN, C.; CHIPMAN, J. K.; LIVINGSTONE, D. R. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. **Aquatic Toxicology**, v. 41, p. 193-212, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00083-0)
- MOREAU, M.; BOUCHARD, M. Comparison of the kinetics of various biomarkers of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 781-790, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.3070>
- MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, p. 1-8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2994/057.004.0101>
- MORSE, H. R.; JONES, N. J.; PELTONEN, K.; HARVEY, R. G.; WATERS, R. The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo[a]pyrene in developing *Xenopus laevis* larvae. **Mutagenesis**, v. 11, p. 101-109, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/11.1.101>
- MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; FERRIER, V.; DEVAUX, A. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. **Environmental Toxicology**, v. 20, p. 74-84, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.20080>
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Editora RIMA, 2006. p. 413-432.

- NASR, I. N.; ARIEF, M. H.; ABDEL-ALEEM, A. H.; MALHAT, F. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. **Journal of Applied Sciences Researchn**, v. 6, p. 13-21, 2010.
- NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, p. 765-773, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000600010>
- NIUWKOOP, P. D.; FABER, J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publishing Company, Amesterdam, 1975.
- NOSHIRO, M.; OMURA, T. Microsomal monooxygenase system in frog livers. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 77, p. 761-767, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90310-9)
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura Hylidae). **Biociencias**, v. 6, p. 79-88, 1998.
- OLKER, J. H.; ELONEN, C. M.; PILLI, A.; ANDERSON, A.; KINZIGER, B.; ERICKSON, S.; SKOPINSKI, M.; POMPLUN, A.; LALONE, C. A.; RUSSOM, C. L.; HOFF, D. The ECOTOXicology knowledgebase: a curated database of ecologically relevant toxicity test to support environmental research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, p. 1520-1539, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5324>
Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ecotox/explore.cfm>
- OLSEN, T.; ELLERBECK, L.; FISHER, T.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1725-1732, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620200815>
- PALANIKUMAR, L.; KUMARAGURU, A. K.; RAMAKRITINAN, C. M.; ANAND, M. Genotoxic assessment of anthracene and benzo[a]pyrene to milkfish *Chanos chanos*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, p. 350-363, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.642657>
- PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1): Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 157-160, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00117080>
- PEAKALL, D. B.; WALKER, C. H. The role of biomarkers in environmental assessment (3): Vertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 173-179, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00117082>
- PENNING, T. M. Aldo-keto reductase and formation of polycyclic aromatic hydrocarbons o-quinones. **Methods in Enzymology**, v. 378, p. 31-67, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)78003-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78003-9)

- PENNING, T. M.; OHNISHI, S. T.; OHNISHI, T.; HARVEY, R. G. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 84-92, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx950055s>
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G. S. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 9852-9861, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; FRANCO-BELUSSI, L.; NATALE, G. S.; OLIVEIRA, C. Biomarkers at different levels of organization after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) neotropical tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 244, p. 733-746, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MASFARAUD, J. F.; WEBER-LOTFI, F.; MARTY, J.; GUILLEMAUT, P.; CASTEGNARO, M. Comparison of animal and plant DNA-adducts after exposure to benzo(a)pyrene. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 10, p. 323-331, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/10406639608034713>
- PHILLIPS, D. H.; GROVER, P. L. Polycyclic hydrocarbon activation: bay regions and beyond. **Drug Metabolism Reviews**, v. 26, p. 443-467, 1994. DOI: <https://doi.org/10.3109/03602539409029808>
- PINELLI, C.; SANTILLO, A.; BACCARI, G. C.; MONTEFORTE, R.; RASTOGI, R. K. Mast cells in the amphibian brain during development. **Journal of Anatomy**, v. 216, p. 397-406, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01191.x>
- POLLO, F. E.; BIONDA, C. L.; SALINAS, Z. A.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. 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, p. 581, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>
- PROPST, T. L.; FORT, D. J.; STOVER, E. L.; SCHROCK, B.; BANTLE, J. A. Evaluation of the developmental toxicity of benzo[α]pyrene and 2-acetylaminofluorene using *Xenopus*: modes of biotransformation. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 20, p. 45-61, 1997. DOI: <https://doi.org/10.3109/01480549709011078>
- PURRELLO, M.; SCALIA, M.; CORSARO, C.; DI PIETRO, C.; PIRO, S.; SICHEL, G. Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in kupffer cells from *Rana esculenta*. **Pigment Cell Research**, v. 14, p. 126-131, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140208.x>
- RAMESH, A.; WALKER, S. A.; HOOD, D. B.; GUILLÉN, M. D.; SCHNEIDER, K.; WEYAND, E. H. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic

aromatic hydrocarbons. **International Journal of Toxicology**, v. 23, p. 301-333, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1080/10915810490517063>

RANKOUHI, T. R.; KOOMEN, B.; SANDERSON, J. T.; BOSVELD, A. T. C.; SEINEN, W.; VAN DEN BERG, M. Induction of ethoxy-resorufin-O-deethylase activity by halogenated aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in primary hepatocytes of the green frog (*Rana esculenta*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 1428-1435, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1897/04-367R.1>

RATCLIFFE, N. A.; MILLAR, D. A. Comparative aspects and possible phylogenetic affinities of vertebrate and invertebrate blood cells. In: ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. (ed.). **Vertebrate blood cells**. Cambridge University Press, 1998. pp. 1-18.

REDEGELD, F. A.; YU, Y.; KUMARI, S. CHARLES, N.; BLANK, U. Non-IgE mediated mast cell activation. **Immunological Reviews**, v. 282, p. 87-113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12629>

REGNAULT, C.; USAL, M.; VEYRENC, S.; COUTURIER, K.; BATANDIER, C.; BULTEAU, A.-L.; LEJON, D.; SAPIN, A.; COMBOURIEU, B.; CHETIVEAUX, M.; LE MAY, C.; LAFOND, T.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Unexpected metabolic disorders induced by endocrine disruptors in *Xenopus tropicalis* provide new lead for understanding amphibian decline. **PNAS**, v. 115, p. 4416-4425, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1721267115>

REGNAULT, C.; WILLISON, J.; VEYRENC, S.; AIRIEAU, A.; MÉRESSE, P.; FORTIER, M.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. **Chemosphere**, v. 155, p. 519-527, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.047>

REGNAULT, C.; WORMS, I. A. M.; OGER-DESFEUX, C.; MELODELIMA, C.; VEYRENC, S.; BAYLE, M.-L.; COMBOURIEU, B.; BONIN, A.; RENAUD, J.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. **BMG Genomics**, v. 15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-666>

REYNAUD, S.; WORMS, I. A. M.; VEYRENC, S.; PORTIER, J.; MAITRE, A.; MIAUD, C.; RAVETON, M. Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). **Environmental Pollution**, v. 161, p. 206-214, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.029>

RILEY, P. A. Melanin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 1235-1239, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7)

ROBERT, J.; GOYOS, A.; NEDELKOVSKA, H. *Xenopus*, a unique comparative model to explore the role of certain heat shock proteins and non-classical MHC class Ib gene products in immune surveillance. **Immunologic Research**, v. 45, p. 114-122, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8094-9>

- ROBERTO, A.; LARSSON, B. S.; TJÄLVE, H. Uptake of 7, 12-dimethylbenzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, p. 92-99, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00248.x>
- ROLLINS-SMITH, L. A. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1593-1599, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>
- SADINSKI, W. J.; LEVAY, G.; WILSON, M. C.; HOFFMAN, J. R.; BODELL, W. J.; ANDERSON, S. L. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology**, v. 32, p. 333-352, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00092-5)
- SAKA, M. Developmental toxicity of *p, p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1065-1073, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1897/03-272>
- SANTOS A. T.; VALVERDE, B. S. L.; DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. Genotoxic and melanic alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 20072-20081, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w>
- SANTOS, L. R. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R. E.; OLIVEIRA, C. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, v. 297, p. 864-875, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- SAUNDERS, C. R.; DAS, S. K.; RAMESH, A.; SHOCKLEY, D. C.; MUKHERJEE, S. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, p. 427-438, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.1157>
- SCADDING, S. R. Phylogenic distribution of limb regeneration capacity in adult *Amphibia*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 202, p. 57-68, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402020108>
- SCADDING, S. R. Limb regeneration in adult amphibia. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, p. 34-46, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1139/z81-007>
- SCAIA, M. F.; GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; SUCCI-DOMINGUES, M.; OLIVEIRA, C. Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 22209-22219, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05403-8>
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological**

Research, v. 38, p. 995-1014, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>

SCHÄRER, O. D. Chemistry and biology of DNA repair. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p. 2946-2974, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200200523>

SCHARTL, M.; LARUE, L.; GODA, M.; BOSENBERG, M. W.; HASHIMOTO, H.; KELSH, R. N. What is a vertebrate pigment cell? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, p. 8-14, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12409>

SCHWEN, R. J.; MANNERING, G. J. Hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems of the trout, frog and snake – II. Monooxygenase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 71, p. 437-443, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90406-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90406-0)

SEILERN-ASPANG, F.; KRATOCHWIL, K. Induction and differentiation of an epithelial tumor in the newt (*Triturus cristatus*). **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 10, p. 337-356, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.10.3.337>

SHI, Y.; JIANG, J.; SHAN, Z.; BU, Y.; DENG, Z.; CHENG, Y. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 511-519, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1399-z>

SHIMADA, N.; YAMAUCHI, K. Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T₃ response. **Journal of Endocrinology**, v. 183, p. 627-637, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05893>

SHIMIZU, Y.; NAKATSURU, Y.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; KUME, H.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; ISHIKAWA, T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **PNAS**, v. 97, p. 779-782, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.779>

SIBOULET, R.; GRINFELD, S.; DEPARIS, P.; JAYLET, A. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* Michah: induction with X-rays and chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 125, p. 275-281, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(84\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(84)90077-0)

SICHEL, G. Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. **Pigment Cell Research**, v. 1, p. 250-258, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1988.tb00423.x>

SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO, C. The amphibian kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**, v. 10, p. 271-287, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1997.tb00687.x>

- SIMS, P.; GROVER, P. L.; SWAISLAND, A.; PAL, K.; HEWER, A. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. **Nature**, v. 252, p. 326-328, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1038/252326a0>
- STEINDACHNER, F. Über einige neue Batrachier aus den Sammlungen des Wiener Museums. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe, v. 48, p. 186-192, 1863.
- STEINEL, N. C.; BOLNICK, D. I. 2017. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.
- STRAUSS, E.; MATEYKO, G. M. Chemical induction of neoplasms in the kidney of *Rana pipiens*. **Cancer Research**, v. 24, p. 1969-1977, 1964.
- STROBEL, A.; BURKHARDT-HOLM, P.; SCHMID, P.; SEGNER, H. Benzo(a)pyrene metabolism and EROD and GST biotransformation activity in the liver of red- and white-blooded Antarctic fish. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 8022-8032, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00176>
- SVENSSON, P. A.; FORSGREN, E.; AMUNDSEN, T.; SKÖLD, H. N. Chromatic interaction between egg pigmentation and skin chromatophores in the nuptial coloration of female two-spotted gobies. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 4391-4397, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.01925>
- TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 111, p. 1-29, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)
- TRUDEAU, V. L.; THOMSON, P.; ZHANG, W. S.; REYNAUD, S.; NAVARRO-MARTIN, L.; LANGLOIS, V. S. Agrochemicals disrupt endocrine axes in amphibians. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 513, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>
- TSONIS, P. A.; EGUCHI, G. Abnormal limb regeneration without tumor production in adult newts directed by carcinogens, 20-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene. **Development Growth & Differentiation**, v. 24, p. 183-190, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1982.00183.x>
- TSUJI, G.; TAKAHARA, M.; UCHI, H.; TAKEUCHI, S.; MITOMA, C.; MOROI, Y.; FURUE, M. Na environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 62, p. 42-49, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.10.017>
- USAL, M.; REGNAULT, C.; VEYRENC, S.; COUTURIER, K.; BATANDIER, C.; BULTEAU, A.-L.; LEJON, D.; COMBOURIEU, B.; LAFOND, T. Concomitant

exposure to benzo[a]pyrene and triclosan at environmentally relevant concentrations induces metabolic syndrome with multigenerational consequences in *Silurana (Xenopus) tropicalis*. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 149-159, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.386>

USAL, M.; VEYRENC, S.; DARRACQ-GHITALLA-CIOCK, M.; REGNAULT, C.; SRODA, S.; FINI, J.-B.; CANLET, C.; TREMBLAY-FRANCO, M.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Transgenerational metabolic disorders and reproductions defects induced by benzo[a]pyrene in *Xenopus tropicalis*. **Environmental Pollution**, v. 269, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116109>

USAL, M.; VEYRENC, S.; DARRACQ-GHITALLA-CIOCK, M.; REGNAULT, C.; SRODA, S.; FINI, J.-B.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. Exposure to a mixture of benzo[a]pyrene and triclosan induces multi- and transgenerational metabolic disorders associated with decrease female investment in reproduction in *Siluriana (Xenopus) tropicalis*. **Environmental Pollution**, v. 292, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118418>

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89>

VALVERDE, Bruno Serra de Lacerda. **Efeitos sistêmicos viscerais e somáticos do Benzo-[alfa]-pireno em *Physalaemus nattereri* mediante as vias de exposição oral e injetável**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2018.

VALVERDE, B. S. L.; UTSUNOMIYA, H. S. M.; CARVALHO, C. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes. **Ecotoxicology**, v. 31, p. 516-523, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)

VAN HUMMELEN, P.; ZOLL, C.; PAULUSSEN, J.; KIRSCH-VOLDERS, M.; JAYLET, A. The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple ‘*in vivo*’ technique for detection of mutagens in fresh water. **Mutagenesis**, v. 4, p. 12-16, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.12>

VAN METER, R. J.; GLINSKI, D. A.; HENDERSON, W. M.; GARRISON, A. W.; CYTERSKI, M.; PURUCKER, S. T. Pesticide uptake across the amphibian dermis through soil and overspray exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, p. 545-556, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0183-2>

- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
- VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Risk of extinction of frogs and toads as a result of environmental changes. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 161-172, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ea/a/Hdyz9RrHQQJH6F3gpKJHSkb/?format=pdf&lang=en>
- VERMA, N.; PINK, M.; RETTENMEIER, A. W.; SCHMITZ-SPANKE, S. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. **Proteomics**, v. 12, p. 1731-1755, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201100466>
- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 4. ed. Academic Press, 2014. ISBN: 978-0-12-386919-7
- VOJINOVIC-MILORADOV, M.; BUZAROV, D.; ADAMOV, J.; SIMIC, S.; POPOVIC, E. Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 153-156, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00738-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00738-X)
- WADDINGTON, C. H.; GOODHART, C. B. Location of absorbed carcinogens within the amphibian cell. **Journal of Cell Science**, v. 90, p. 209-219, 1949. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-90.10.209>
- WALLACE, S. J.; DE SOLLA, S. R.; HEAD, J. A.; HODSON, P. V.; PARROTT, J. L.; THOMAS, P. J.; BERTHIAUME, A.; LANGLOIS, V. S. Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: exposure and effects on wildlife. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114863>
- WALTON, B. Letter to the editor: Indução enzimática nos microssomas hepáticos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 27, p. 123-125, 1977. Disponível em: <https://bjan-sba.org/ed/5f9d82e78e6f1adf058b4567>
- WILCKE, W.; AMELUNG, W.; KRAUSS, M.; MARTIUS, C.; BANDEIRA, A.; GARCIA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1405-1417, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(03\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(03)00137-2)
- WILLIAMS, M. A; SALICE, C.; REDDY, G. Wildlife toxicity assessment for benzo[a]pyrene. In: WILLIAMS, M. A; REDDY, G; QUINN, M. J.; JOHNSON, M. S. (eds.). **Wildlife toxicity assessments for chemicals of military concern**. Elsevier, 2015. p. 421-437. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800020-5.00024-7>
- WOLKE, R. E.; GEORGE, C. J.; BLAZER, V. S. Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: HARGIS, Jr., W. G. (ed.). **Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean**.

NOAA Technical Report NMFS 25, U.S. Department of Commerce, 1985. p. 93-97. Disponível em: <https://spo.nmfs.noaa.gov/content/tr-25-parasitology-and-pathology-marine-organisms-world-ocean>

YAMAUCHI, K.; EGUCHI, R.; SHIMADA, N.; ISHIHARA, A. The effects of endocrine-disrupting chemicals on thyroid hormone binding to *Xenopus laevis* transthyretin and thyroid hormone receptor. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 1250-1256, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.216>

YONG, L. C. J. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 49, p. 409-424, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80129-7](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80129-7)

ZUASTI, A.; JARA, J. R.; FERRER, C.; SOLANO, F. Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**, v. 2, p. 93-99, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1989.tb00168.x>