



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos
de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae)
coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[*a*]pireno**

Maria Isabel Afonso da Silva

DOUTORADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Maria Isabel Afonso da Silva

Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto - SP

2015

Silva, Maria Isabel Afonso da.

Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno / Maria Isabel Afonso da Silva. -- São José do Rio Preto, 2015

115 f. : il., tabs.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia aquática. 2. Toxicologia ambiental. 3. Quelônio - Efeito da poluição da água. 4. Metais pesados - Contaminação. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Maria Isabel Afonso da Silva

**Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos
de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae)
coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno**

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar – São Carlos

Prof. Dr. Claudinei da Cruz
UNIFEB – Barretos

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP

24 de fevereiro de 2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA), do Departamento de Química e Ciências Ambientais, e no Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do fomento ao Doutorado - Processo 2011/06680-8.

*Ao meu pai, **Pedro Messias da Silva** (in memoriam), exemplo de retidão de caráter, humildade e generosidade. Foi difícil vê-lo partir, mas saiba que em meu coração e memória permanecerá imortal, despertando sempre os melhores sentimentos e lembranças. Sua vida foi uma longa sucessão de ensinamentos e fonte de sabedoria para todos aqueles que tiveram a sorte de conhecê-lo.*

*À minha mãe, **Iracema Afonso da Silva**, pelos ensinamentos de vida, pelo apoio e amor incondicional, que me encorajam a lutar por meus objetivos e sonhos.*

O trabalho e empenho de vocês para me proporcionarem uma boa educação, me ensinaram o valor do conhecimento e representam meu maior incentivo nos estudos. Jamais terei palavras suficientes para expressar a minha gratidão e meu amor por vocês, por isso digo apenas: muito obrigada por tudo. À vocês, meus grandes amores, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por iluminar todos os meus passos e me dar forças para superar os desafios de cada dia, por estar sempre me protegendo e abençoando, tenho muito que agradecer. Obrigada, por permitir minha convivência com tantas pessoas maravilhosas, às quais expresso, nesse momento, meus sinceros agradecimentos:

*À minha querida família, exemplo de amor e respeito, sempre presente em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, **Pedro Messias da Silva** (in memorian) e **Iracema Afonso da Silva**, pela formação e ensinamentos de vida, cuidado, apoio, incentivo, amor e dedicação a mim dispensados. Aos meus irmãos, **Daniel Afonso da Silva**, **Rafael Afonso da Silva** e **Raquel Afonso da Silva**, que muito me inspiraram, apoiaram e incentivaram, sempre com carinho e paciência. Tenho muito orgulho de todos vocês!*

Aos meus cunhados pelo carinho, amizade e pelos momentos de alegria e descontração.

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**, pelos seus ensinamentos, apoio, incentivo e amizade. Agradeço principalmente por me aceitar em seu laboratório, acolher como orientanda e por confiar em mim e neste trabalho. Agradeço também pelo conhecimento e valiosas informações fornecidas tão pacientemente, que certamente muito contribuíram para minha formação científica e profissional.*

*À **Profa Dra Claudia Regina Bonini Domingos**, grande colaboradora deste trabalho, afinal foi sob sua orientação que tudo começou. Obrigada pela amizade, oportunidades, confiança, paciência, ensinamentos e pela formação não só acadêmica e profissional, mas também pessoal.*

*Aos **amigos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA)**, àqueles que passaram pelo laboratório e aos de convívio frequente, pela ajuda nas análises, pelo conhecimento que cada um de vocês me transmitiram durante esse tempo de convivência, pelos bons momentos de discussão, aprendizagem, amizade, pelas risadas e diversão.*

*Aos **amigos e colaboradores do Centro de Estudos de Quelônios (CEQ)**, que ajudaram diretamente neste trabalho, na captura dos animais e coleta das amostras, sempre com paciência, apoio e dedicação. Além das boas conversas, companheirismo e amizade.*

*Ao **Prof Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez** e à **Profa. Dra. Lilian Castiglioni** pela valiosa contribuição durante o exame geral de qualificação.*

Aos Professores **Dr. Claudinei da Cruz, Dra. Marisa Narciso Fernandes, Dr. Luis Octavio Regasini e Dra. Débora A. P. C. Zuccari**, pela atenção, colaboração e contribuições como membros da comissão avaliadora da defesa desta tese.

A todos os meus **amigos** pela convivência, amizade, carinho e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida e me darem apoio e suporte quando eu precisei. Agradeço em especial aos meus **amigos de Araxá**, pela amizade de vários anos, compreensão nos períodos em que demoro a visitá-los, apoio, carinho e pelos momentos de conversa, desabafo, descontração e diversão.

Aos meus **amigos da graduação**, pelo companheirismo, amizade, incentivo e carinho mesmo nos encontrando tão pouco pessoalmente.

Agradeço também a todos os demais professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. À direção do Instituto e funcionários, que possibilitaram, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho. E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** pela concessão da bolsa de estudos.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste
em procurar novas paisagens, e sim em ter novos
olhos”.*

Marcel Proust

RESUMO

Os organismos aquáticos são frequentemente expostos a ampla gama de compostos químicos, cujos poluentes individuais podem produzir diferentes respostas dentre os organismos e/ou interagir entre si produzindo efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. Muitas dessas substâncias são potencialmente citotóxicas, genotóxicas ou carcinogênicas, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A espécie *Phrynops geoffroanus* (“Cágado-de-Barbelas”, Schweigger, 1812) apresenta ampla distribuição em áreas tropicais e temperadas da América do Sul. Esta espécie é comumente encontrada em áreas impactadas, como rios poluídos que atravessam o perímetro urbano e recebem efluentes domésticos e industriais. Nesses ambientes, os quelônios estão expostos a pressões ecológicas que ameaçam a sua conservação e podem influenciar nos hábitos de vida e condições fisiológicas do animal. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações bioquímicas em diferentes órgãos (fígado, coração, pulmão, pâncreas, cérebro, intestinos delgado e grosso) de *Phrynops geoffroanus* coletados em ambiente contaminado por atuação antrópica (efluentes urbanos e industriais) (Etapa 1) ou expostos ao benzo[a]pireno, composto modelo de HPAs, por 7 dias (Etapa 2). Para isto, foram analisadas as respostas dos sistemas relacionados com a biotransformação de xenobióticos de fase I e II, atividades das principais enzimas antioxidantes e os níveis de malondialdeído (MDA), indicativos de estresse oxidativo, como biomarcadores para o biomonitoramento de impacto de poluentes. Além disso, foram verificadas a atividade enzimática da gama glutamil transferase (GGT) e a fragmentação do DNA pelo ensaio cometa, em sangue de *Phrynops geoffroanus* expostos ao benzo[a]pireno, a fim de identificar alterações hepáticas e genotoxicidade de acordo com as doses testadas do referido composto. As análises da primeira etapa do estudo revelaram uma influência importante da contaminação por efluentes sanitários e industriais nos quelônios de vida livre, que apresentaram uma série de alterações nos biomarcadores analisados. Os mais altos níveis de MDA apresentados nas amostras de órgãos dos animais do córrego Felicidade em comparação com os do local de referência (criatório – grupo controle) indicam danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), devido à presença de contaminantes prooxidantes. Frente a este impacto ambiental na área urbana, os animais responderam com aumento na sua capacidade de detoxificação de compostos químicos, exibindo valores mais elevados de atividade de 7-etóxi-resorufina-O-deetilase (EROD), 7-benzilóxi-resorufina-O-debenzilase (BROD), 7-pentóxi-resorufina-O-depentilase (PROD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e de concentração de glutathione reduzida (GSH) em vários órgãos, como ajuste enzimático para evitar danos causados por estressores locais. Nas duas etapas do estudo, houve alterações de alguns biomarcadores em órgãos específicos, indicando diferenças de suscetibilidade entre os diferentes órgãos desta espécie. Em relação às três doses de benzo[a]pireno testadas na etapa 2, esta espécie de quelônio demonstrou ser tolerante e apresentar mecanismos eficazes de defesa à contaminação, pois não ocorreu aumento nos níveis de MDA dos órgãos. Além da EROD, a BROD e a PROD também se mostraram responsivas a exposição ao benzo[a]pireno, o que sugere a atuação dessas enzimas na metabolização do composto. Na maioria das análises, a menor dose de benzo[a]pireno (100 µg/kg), em sete dias de exposição, não apresentou efeito sobre a atividade das enzimas nos órgãos avaliados. A maioria das alterações observadas foi aumento da atividade enzimática nos grupos que receberam as duas maiores doses, 500 e 1000 µg/kg, como resposta de defesa aos estressores químicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos. As análises da GGT e ensaio cometa demonstraram aumento significativo e dose-dependente nos grupos tratados com as doses de 500 µg/kg e 1000 µg/kg, em comparação ao grupo controle, indicando associação entre exposição ao contaminante

e aumento nos danos hepáticos e no DNA de células sanguíneas. Esses dados são de grande importância para o conhecimento da fisiologia dos quelônios, contribuindo também no delineamento de melhores estratégias para a conservação do grupo.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; biomarcadores; alterações ambientais; benzo[*a*]pireno; *Phrynops geoffroanus*.

ABSTRACT

The aquatic organisms are often exposed to a wide variety of chemicals, whose individual components are likely to produce different responses within the organisms and/or interact producing additive, synergistic or antagonistic toxic effects. Most of these substances are potentially cytotoxic, genotoxic or carcinogenic, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The *Phrynops geoffroanus* species ("Geoffroy's side-necked turtle", Schweigger, 1812) is widely distributed in tropical and temperate areas of South America. This species is commonly found in impacted areas, and polluted rivers that cross the urban area and receive domestic and industrial wastewater effluents. In these environments, freshwater turtles are exposed to ecological pressures that threaten their conservation and can influence the animal life habits and physiological conditions. The objective of this study was to evaluate the biochemical changes in various organs (liver, heart, lung, pancreas, brain, small and large intestines) of *Phrynops geoffroanus* from contaminated environment by human activities (sewage and industrial wastewater effluents) (Step 1) or exposed to benzo[a]pyrene, a PAHs model compound, for 7 days (Step 2). For this we analyzed the responses of systems related to phase I and II of xenobiotics biotransformation, main antioxidant enzymes activities and malondialdehyde (MDA) levels, indicative of oxidative stress, as biomarkers for biomonitoring of pollutants impact. Furthermore, we have assessed the gamma glutamyl transferase (GGT) enzymatic activity and DNA fragmentation by comet assay, in *Phrynops geoffroanus*' blood exposed to benzo[a]pyrene, in order to identify hepatic changes and genotoxicity according to the tested doses of this compound. The first step of this study analysis revealed an important influence of contamination by domestic and industrial wastewater effluents in free-living freshwater turtles that presented a series of changes in biomarkers analyzed. We observed higher MDA levels in animal organs from Felicidade stream when compared to those from the reference site (breeding farm - control group), indicating damage caused by reactive oxygen species (ROS) due to the prooxidant contaminant presence. Due to environmental impact in the urban area, animals responded with an increase in their ability to detoxify chemicals compounds, exhibiting higher values of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), 7-benzyloxyresorufin-O-debenzylase (BROD), 7-pentoxoresorufin-O-depentylase (PROD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities and reduced glutathione (GSH) concentration in several organs, as enzymatic adjustment in order to avoid damage caused by local stressors. In both steps of this study, our results showed alterations of several biomarkers in specific organs, indicating differences in susceptibility among different organs of this species. Concerning the three doses of benzo[a]pyrene tried in the second step, this freshwater turtle species demonstrated exposure resistance and an effective defense mechanisms against contamination, since there wasn't increase in MDA levels of the organs. In addition to EROD, BROD and PROD were also responsive to benzo[a]pyrene exposure, suggesting the role of these enzymes in the metabolism of this compound. In most analyzes, the lowest dose of benzo[a]pyrene (100 µg/kg), in an exposure period of seven days, had no effect on the enzymes activities in the organs evaluated. Most of the alterations observed was increased enzyme activity in groups submitted to the two highest doses, 500 µg/kg e 1000 µg/kg, as a defense response to chemical stressors, involving detoxification of reactive intermediates. The analysis of GGT activity and comet assay demonstrated a significant and dose-dependent increase in the groups treated with benzo[a]pyrene doses of 500 µg/kg and 1000 µg/kg, compared to the control group, indicating an association between exposure to contaminant and an increase in hepatic and blood cell DNA

damages. These data are very important for the knowledge of the chelonian physiology, also contributing to the design of improved strategies for the group conservation.

Keywords: Ecotoxicology; biomarkers; environmental changes; benzo[*a*]pyrene; *Phrynops geoffroanus*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa da localização geográfica da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, na região noroeste do estado de São Paulo, e suas divisões.....33
- FIGURA 2.** Representação esquemática da cidade de São José do Rio Preto, na região noroeste do Estado de São Paulo, com indicação dos pontos de coleta.....33
- FIGURA 3.** Imagens dos dois locais de captura dos espécimes utilizados na Etapa 1. À esquerda: criatório “Reginaldo Uvo Leone” e à direita: córrego Felicidade.....34
- FIGURA 4.** **A** – Visão geral de um espécime de *Phrynops geoffroanus*. **B** – Visão dos animais em decúbito dorsal, considerando as diferenças entre machos e fêmeas. **C e D** – Destaque dos padrões morfológicos de distinção sexual utilizados neste estudo, com detalhes do dimorfismo sexual feminino (**C**) e masculino (**D**).....35
- FIGURA 5.** **A)** Armadilha do tipo “covo” utilizada para captura de espécimes de *Phrynops geoffroanus*. **B)** Medida do tamanho do animal pelo comprimento curvilíneo máximo da carapaça (CCCmáx), com auxílio de uma trena flexível, recobrando toda a curvatura da carapaça. **C)** Pesagem de um exemplar em balança (10g-10kg).....36
- FIGURA 6.** Procedimento via sonda orogástrica para administração do benzo[a]pireno nos cágados. Os animais foram contidos fisicamente, suas bocas abertas com auxílio de uma pinça hemostática, a sonda orogástrica apropriada inserida e então a solução de benzo[a]pireno, previamente diluído em óleo vegetal, administrada lentamente.....37
- FIGURA 7.** Classes do teste do cometa: classe 0 (pouco dano); classe 1 (pequeno dano); classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano) (KOBAYASHI et al., 1995).....45
- FIGURA 8.** Concentração de MDA (nmol/mg de tecido) em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....49
- FIGURA 9.** Concentração de GSH (nmol/g de tecido) em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....51
- FIGURA 10.** Atividade da EROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10).....52
- FIGURA 11.** Atividade da BROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10).....53
- FIGURA 12.** Atividade da PROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10).....54

FIGURA 13. Atividade da GST (U/mg de proteína) em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....	55
FIGURA 14. Atividade da SOD, em U/mg de proteína, das amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....	56
FIGURA 15. Atividade da catalase, em U/mg de proteína, em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....	58
FIGURA 16. Atividade da GPx, em U/mg de proteína, das amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10).....	59
FIGURA 17. Atividade da GR, em U/mg de proteína, em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle).....	61
FIGURA 18. Atividade da AChE, em U/mg de proteína, das amostras de (a) -encéfalo, (b) -fígado, (c) -coração, (d) -pulmão, (e) -pâncreas, (f) -intestino delgado e (g) -intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10).....	62
FIGURA 19. Concentração de MDA (nmol/mg de tecido) em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose, 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	64
FIGURA 20. Concentração de GSH (nmol/g de tecido) em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose, 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	66
FIGURA 21. Atividade da EROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	68
FIGURA 22. Atividade da BROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	69
FIGURA 23. Atividade da PROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	71
FIGURA 24. Atividade da GST (U/mg de proteína) em amostras de (a) -fígado, (b) -coração, (c) -pulmão, (d) -pâncreas, (e) -intestino delgado e (f) -intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose de benzo[a]pireno, 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....	72

FIGURA 25. Atividade da catalase, em U/mg de proteína, em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg de benzo[a]pireno/kg).....74

FIGURA 26. Atividade da GPx (U/mg de proteína) em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (menor dose de benzo[a]pireno, 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....76

FIGURA 27. Atividade da GR, em U/mg de proteína, em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg de benzo[a]pireno/kg).....77

FIGURA 28. Atividade da GGT (mU/mg de proteína) das amostras de plasma de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....78

FIGURA 29. Scores de danos do ensaio cometa em eritrócitos de *Phrynosoma geoffroanus* de quatro grupos: controle, grupo 1 (dose de 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg).....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE	Acetilcolinesterase
AhR	Receptor aril hidrocarboneto
BROD	Isoforma 7-benzilóxi-resorufina- <i>O</i> -debenzilase
CAT	Catalase
CCC_{máx}	Comprimento curvilíneo máximo da carapaça
cm	Centímetros
CYP P450	citocromo P450
CYP1A	Subfamília 1A do citocromo P450
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EROD	Isoforma 7-etóxi-resorufina- <i>O</i> -deetilase
GGT	Gama glutamil transferase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfeto
GST	Glutathione S-transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilogramas
KPi	Fosfato de potássio

M	Molar ou mol/Litro
mA	Miliamperes
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol por litro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
nm	Nanômetros
nmol/g	Nanomol por grama
n°	Número
¹O₂	Oxigênio singlete
O₂⁻	Radical ânion superóxido
·OH	Radical hidroxil
OCPs	Pesticidas organoclorados
p	Nível de significância
PCBs	Bifenilas policloradas
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PROD	Isoforma 7-pentóxi-resorufina-O-depentilase
RO[·]	Radical alcóxil
ROO[·]	Radical peróxil
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
U/mg	Unidades por miligrama
U/mL	Unidades por mililitro
UV/Vis	Ultra-violeta/ visível
V	Volts

°C	Grau Celsius
µg/kg	Micrograma por kilograma
µg/L	Micrograma por litro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODO	32
3.1. Amostras.....	32
3.2. Descarte de resíduos químicos e água contaminada.....	38
3.3. Análises Bioquímicas	38
3.3.1. Peroxidação lipídica	38
3.3.2. Análise da Glutathione reduzida (GSH).....	39
3.3.3. Ensaio Enzimáticos	40
3.3.4. Ensaio Cometa.....	43
3.4. Análise Estatística	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1. ETAPA 1	47
4.1.1. Amostras e análises bioquímicas.....	47
4.1.2. Peroxidação lipídica	47
4.1.3. Análise da Glutathione reduzida (GSH).....	50
4.1.4. Ensaio Enzimáticos	52
4.2. ETAPA 2	63
4.2.1. Amostras e ensaios bioquímicos.....	63
4.2.2. Peroxidação Lipídica	63
4.2.3. Análise da Glutathione reduzida (GSH).....	64
4.2.4. Ensaio Enzimáticos	67
4.2.5. Ensaio Cometa.....	78
4.3. Dados Gerais	81
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS	111

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A expansão e intensificação das atividades antrópicas são os principais fatores responsáveis pelo aumento de contaminantes em ambientes aquáticos (CAZENAVE et al., 2009). O impacto que estas atividades causam no ambiente tem sido cada vez mais relevante no cenário mundial, visto que as consequências dessas ações refletem diretamente na qualidade de vida dos organismos. A contaminação química do meio ambiente, incluindo os efeitos de longo prazo e exposição crônica dos organismos, associada à perda e destruição do habitat, têm resultado no declínio ou desaparecimento de muitas populações (RODRIGUES, 2005; GARBELLINI; ULIANA, 2007; POLETTA et al., 2008).

Nos últimos 60 anos, temos sido alertados sobre os potenciais efeitos adversos a longo prazo desses poluentes e seus riscos para os ecossistemas aquáticos e terrestres (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os ambientes aquáticos são o destino final de grande parte dos contaminantes de origem antrópica, e muitas dessas substâncias são potencialmente genotóxicas ou carcinogênicas, como muitos poluentes orgânicos (bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre outros). Deste modo, os organismos aquáticos são frequentemente expostos a uma ampla gama de compostos químicos potencialmente tóxicos, cujos componentes individuais podem produzir diferentes respostas dentro os organismos e/ou interagir entre si, produzindo efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (BARATA et al., 2006; BANNI et al., 2009; BOURAQUI et al., 2009).

Os HPAs são compostos orgânicos de elevada persistência no ambiente, devido a sua estabilidade química e resistência à biodegradação. Esta persistência varia em função da estrutura, sendo os de menor massa molecular degradados mais facilmente, enquanto que os de elevada massa molecular são mais persistentes (EPA, 1998; RUBIO-CLEMENTE; TORRES-PALMA; PEÑUELA, 2014). No ambiente aquático, HPAs se acumulam principalmente no sedimento e matéria orgânica, que quando ingeridos pelos organismos, os expõem a altas concentrações desses compostos (NEFF, 1985; BANNI et al., 2009). Em geral, os HPAs aparecem em concentrações mais elevadas nas áreas urbanizadas, como resultado da atividade humana ou de processos industriais (CHRISTENSEN et al., 2002; BANNI et al., 2009). Esses compostos são conhecidos por seus efeitos carcinogênicos, genotóxicos e toxicológicos

(BAUMANN, 1998; PACHECO; SANTOS, 2001; RUBIO-CLEMENTE; TORRES-PALMA; PEÑUELA, 2014).

O benzo[a]pireno é um composto modelo de HPA e está amplamente distribuído no meio ambiente. É um composto potencialmente mutagênico e carcinogênico, constituindo uma ameaça a saúde dos organismos (KOYAMA et al., 2004; BANNI et al., 2009; BOURAOUI et al., 2009). O diagnóstico de áreas contaminadas por este tipo de composto é, portanto, de extrema importância para que sejam tomadas ações de contenção e recuperação das áreas afetadas, evitando efeitos adversos irreversíveis à biota aquática.

O uso de espécies animais como bioindicadores de qualidade ambiental mostra-se importante para estabelecer a conexão entre os efeitos ecológicos e a saúde animal (COLBORN, 1994). As análises químicas de amostras ambientais não detectam facilmente todos os contaminantes, nem a ação destes no organismo. Neste contexto, espécies sentinelas são úteis ferramentas de diagnóstico para manejo ambiental integrado, pois fornecem informações importantes a respeito das interações dos contaminantes com os sistemas biológicos, que permitem avaliar a qualidade ambiental (JHA et al., 2000; PRETTI; COGNETTI-VARRIALE, 2001).

A utilização de biomarcadores é de grande importância como instrumento para análise dos efeitos biológicos resultantes da exposição a contaminantes, além de informar a resposta de estresse do organismo aos compostos químicos individuais e misturas (LA TORRE FERNANDO et al., 2005; SARKAR et al., 2006; GASTALDI et al., 2007; ADAM et al., 2009; BANNI et al., 2009; BOURAOUI et al., 2009). Um biomarcador é definido como uma variação induzida por contaminantes em componentes e processos celulares ou bioquímicos, que são mensuráveis em amostras biológicas, como fluídos corporais, células ou tecidos. Tais “variações” podem indicar a magnitude da resposta do organismo aos contaminantes e avaliar a sensibilidade intrínseca da espécie, indicando a sua vulnerabilidade aos poluentes (FOSSI, 1994; LAM; GRAY, 2003; BODIN et al., 2004).

Há uma ampla gama de biomarcadores mensurados em diferentes níveis, sendo alguns poluente-específicos e outros que sofrem alterações em resposta a estresse natural ou causado por contaminação (PFEIFER et al., 2005). Como a biotransformação de compostos químicos nos organismos pode levar ao estado de estresse oxidativo (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; ZANGAR; DAVYDOV; VERMA, 2004), as vias bioquímicas capazes de produzir espécies

reativas de oxigênio (ERO), além dos sistemas de defesa antioxidantes, são bastante utilizados como biomarcadores de contaminação.

As ERO são formadas e degradadas por organismos aeróbios, e são encontradas em concentrações fisiológicas dentro das células, para um funcionamento normal (NORDBERG; ARNER, 2001). O estado oxidativo é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, atuando em várias funções celulares, como a transdução de sinais. Já o estresse oxidativo é gerado quando a taxa de produção das ERO excede a taxa de decomposição das mesmas pelos sistemas antioxidantes, o que provoca danos a diferentes componentes celulares (ALMEIDA et al., 2005; VOITURON et al., 2006; VALDIVIA et al., 2007; ANTUNES et al., 2008; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

Dentre às inúmeras espécies reativas, as derivadas do oxigênio se destacam em processos biológicos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($\cdot OH$), alcóxil ($RO^{\cdot-}$) e peróxil ($ROO^{\cdot-}$), dentre outros (PERCÁRIO et al., 2004; NETO et al., 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Devido a sua alta reatividade, as ERO são potencialmente citotóxicas e podem reagir com lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, originando lesões oxidativas que modificam sua estrutura e/ou função e podem ocasionar a morte celular ou dano ao órgão (PERCÁRIO et al., 2004; NETO et al., 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Ácidos graxos poli-insaturados são particularmente suscetíveis aos ataques por ERO frente ao estresse oxidativo. A oxidação desses ácidos graxos poli-insaturados, ou peroxidação lipídica, é uma importante consequência do estresse oxidativo e acarreta alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, que podem resultar no seu rompimento (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ANTUNES et al., 2008). As reações geradas pela peroxidação lipídica resultam em uma série de compostos como cetonas e aldeídos, dentre os quais o malondialdeído (MDA), que tem sido amplamente utilizado como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BANNI et al., 2009).

É bem estabelecido que os HPAs, como o benzo[a]pireno, podem gerar aumento da produção de espécies reativas, bem como a diminuição significativa das defesas antioxidantes, o que acarreta estresse oxidativo nas células (BENEDETTI et al., 2007; GASTALDI et al., 2007; BANNI et al., 2009). O estudo de diferentes sistemas, relatados para monitorar estresse oxidativo nos animais aquáticos, pode fornecer informações importantes sobre seu estado fisiológico e

também sobre a saúde ambiental, pois tanto os níveis de danos oxidativos quanto os sistemas de defesa antioxidantes são fortemente afetados pelos diferentes estressores ambientais (ALMEIDA et al., 2007).

A análise de enzimas de detoxificação de fase I (isoformas do citocromo P450: 7-etóxi-resorufina-*O*-deetilase (EROD), 7-benzilóxi-resorufina-*O*-debenzilase (BROD) e 7-pentóxi-resorufina-*O*-depentilase (PROD)) e de fase II (glutathione *S*-transferase, GST), esterases, como acetilcolinesterase (AChE), e indicadores de estresse oxidativo e integridade de membrana são considerados bons biomarcadores para o biomonitoramento de impacto de poluentes (SARKAR et al., 2006). Além disso, a atividade das principais enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx), cuja ação está relacionada à glutathione redutase (GR), formam um sistema de defesa que tende a diminuir a concentração de oxirradicais, podendo ter suas atividades alteradas em função da exposição a poluentes ambientais. Há ainda a proteção não enzimática por pequenas moléculas, e dentre as mais importantes estão as vitaminas E (α -tocoferol), C (ácido L-ascórbico) e glutathione (GSH). Tais antioxidantes são importantes na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas, sendo utilizados com sucesso como biomarcadores de exposição a diferentes contaminantes (metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALDIVIA et al., 2007).

Outra enzima que pode também indicar efeitos adversos de poluentes e é a gama glutamil transferase (GGT), que catalisa a transferência do grupo gama-glutamil de variados peptídeos doadores para numerosos peptídeos e aminoácidos aceptores (MEISTER, 1973; McINTYRE; CURTHOYS, 1979). Além disso, como uma proteína de superfície celular, a GGT também atua na decomposição da GSH extracelular em aminoácidos que, posteriormente, podem ser captados pela célula (GRUNDY, 2007; FERGUSON; LOCH-CARUSO; MEEKER, 2011). Esta enzima é produzida em muitos tecidos, mas a maioria da GGT sérica é derivada do fígado e das células epiteliais biliares, sendo considerada biomarcador de lesão hepatobiliar e outras desordens hepáticas de alta sensibilidade, mas de pouca especificidade, uma vez que pode estar alterada por exposição a diferentes compostos (TSUJI; MATSUDA; KATUNUMA, 1980; GRUNDY, 2007; LEE et al., 2007). A GGT sérica também tem sido usada como biomarcador de estresse oxidativo (FERGUSON; LOCH-CARUSO; MEEKER, 2011).

Os compostos com potencial genotóxico ou carcinogênico, como os HPAs, invadem a célula e se dirigem ao núcleo, podendo interagir complexamente com o DNA e a cromatina, o que pode resultar em uma série de danos no DNA, como sua fragmentação, alterações no material genético e até aberrações cromossômicas. Em virtude de sua alta reatividade, também podem contribuir para outras reações tóxicas, além de poderem gerar o aumento das espécies reativas e ocasionar lesões oxidativas (TUCKER; PRESTON, 1996; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005). O ensaio cometa oferece a possibilidade de avaliar a integridade do DNA a nível celular, por meio da detecção de quebras na fita de DNA em vários tipos de células, mostrando ser um bom indicador de genotoxicidade (POLETTA et al., 2008; CHRISTOFOLETTI; DAVID; FONTANETTI, 2009; ÇOK et al., 2011).

A possibilidade de avaliar múltiplos tecidos e órgãos dos organismos indicadores selecionados para estudos ambientais aumenta a possibilidade de se detectar alterações bioquímicas. Esta vantagem pode ser particularmente importante no monitoramento de ambientes poluídos, onde o tamanho amostral é limitado por causa da pequena área envolvida ou do perigo de extinção de algumas espécies. Pelo aumento do número de órgãos analisados de um mesmo animal, o tamanho amostral é indiretamente aumentado, enquanto limita o impacto da amostragem na população.

A ordem Testudines corresponde a tartarugas, cágados e jabutis, e consiste em 335 espécies identificadas no mundo, segundo a última lista taxonômica do grupo (TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP, 2014). Os quelônios são animais de vida longa; no entanto, apresentam baixa taxa de reposição de indivíduos na população, pois possuem lentas taxas de crescimento e longos períodos para alcançarem a maturidade sexual. Espécies com estas características são mais suscetíveis às pressões antrópicas e risco de extinção (POUGH; JANIS; HEISER, 2005). Dentre todos os grupos de vertebrados, os quelônios são os mais ameaçados de extinção, e apresentam um *status* preocupante de conservação. Segundo a mais recente “Lista Vermelha” da *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN), o número de espécies de quelônios oficialmente consideradas em risco aumentou em 2014, sendo que dentre as 230 espécies listadas e avaliadas, 135 espécies ou 58,7% estão nas mais altas categorias de risco (criticamente ameaçadas, ameaçadas ou vulneráveis). Um estudo complementar foi realizado pela *IUCN Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group* (TFTSG), incluindo avaliações adicionais de espécies previamente não analisadas, além de reavaliações das espécies

previamente listadas, permitindo uma avaliação global dos atuais níveis de ameaça para todos os quelônios. Segundo este estudo, se ajustasse a taxa de risco para todas as 335 espécies de quelônios atualmente existentes, incluindo a taxa de risco prevista para as espécies com dados insuficientes, cerca de 58% das espécies estão ameaçadas; e se a estes dados também fossem incluídos as espécies recentemente extintas, então 60% estariam ameaçadas ou já extintas (TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP, 2014).

Os quelônios apresentam destaque no contexto ecotoxicológico mundial, com potencial para serem utilizados como bioindicadores de contaminação nos ecossistemas aquáticos em programas de monitoramento, por serem animais de vida longa, com ampla distribuição geográfica, encontrados em uma grande variedade de habitats, além de estarem posicionados intermediariamente na cadeia trófica e serem facilmente capturados. A utilização de quelônios de vida livre combina informações sobre os efeitos da poluição a longo e curto prazo nas áreas onde estes animais estão presentes naturalmente, o que permite uma avaliação mais precisa dos efeitos biológicos reais dos contaminantes (VIARENGO et al., 2007; PIÑA et al., 2009; TSANGARIS et al., 2010).

Aproximadamente 20% das espécies de quelônios do mundo ocorrem na América do Sul, com representantes de oito famílias. Dessas, a família Chelidae é a mais diversificada, contando com 23 espécies, das quais 20 ocorrem no Brasil (SOUZA, 2004; BÉRNILS, 2010). A espécie *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecida como “Cágado-de-Barbelas”, pertence à ordem Testudines, subordem Pleurodira, uma vez que retrai a cabeça e o pescoço lateralmente para dentro do casco, e à família Chelidae. A espécie foi descrita pela primeira vez por Schweigger em 1812, e apresenta ampla distribuição em áreas tropicais e temperadas da América do Sul. No Brasil, está distribuída em quase todo território, nas bacias do rio Paraná, Amazonas e São Francisco (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; GOULART, 2004; SOUZA, 2004).

Phrynops geoffroanus podem ser encontrados em rios poluídos que atravessam o perímetro urbano e recebem efluentes urbanos e industriais, como observado durante o percurso do Rio Preto, em São José do Rio Preto-SP (20°49'12"S; 49°22'44"O; elevação 489 metros). A cidade está na área de drenagem de vários rios e córregos, dentre estes, o córrego Felicidade se destaca como um dos locais mais impactados, pelo lançamento de esgotos sanitários *in natura* e outras fontes difusas, apresentando-se eutrofizado e sem capacidade de suporte para manutenção

da vida aquática, frente aos valores impróprios apresentados para oxigênio dissolvido e amônia (CAMPANHA et al., 2010).

Nesses ambientes, os quelônios sobrevivem alimentando-se da matéria orgânica proveniente de efluentes sanitários e outras fontes. Estão expostos a pressões ecológicas, devido às atividades multissetoriais intensas que ameaçam a sua conservação. Essas condições podem influenciar nos hábitos de vida e condições fisiológicas do animal. Compostos químicos presentes no ambiente aquático podem ocasionar aumento na frequência de micronúcleos, indução de aberrações cromossômicas, demonstrada pela análise de fragmentação do DNA no ensaio cometa, e outros danos oxidativos, confirmando o potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico dos poluentes sobre a espécie, conforme demonstrado em estudos anteriores realizados no córrego Felicidade, afluente do Rio Preto (Bacia do Turvo-Grande, SP) (SILVA, 2009).

Há poucos relatos na literatura sobre a utilização desta espécie de quelônio endêmica da América do Sul em estudos ecotoxicológicos, sendo este o primeiro trabalho com a espécie que se propôs a analisar uma ampla gama de biomarcadores de contaminação ambiental e a avaliar o estresse induzido por concentrações controladas de benzo[a]pireno. Além disso, nenhum outro estudo com quelônios explorou a resposta de vários órgãos de um mesmo organismo.

Os estudos em relação a diferentes condições ambientais (habitats contaminados ou não) contribuirão para o conhecimento dos hábitos de vida, ajustes ao ambiente e influência deste sobre a fisiologia dos quelônios, possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos biológicos do grupo. Baseando-se no fato de que a espécie *Phrynops geoffroanus* ocorre com frequência em áreas impactadas, avaliar a ação desses contaminantes em nível bioquímico e fisiológico mostra-se de grande importância para uma melhor compreensão de como estes animais respondem à exposição aos poluentes ambientais, contribuindo também no delineamento de melhores estratégias para a conservação desta espécie e dos quelônios em geral.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as alterações bioquímicas em diferentes órgãos (fígado, pâncreas, coração, pulmão, cérebro, intestino delgado e intestino grosso) de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado por atuação antrópica (efluentes sanitários e industriais) (Etapa 1) ou expostos ao benzo[a]pireno (Etapa 2). Ainda, analisar as alterações hepáticas e genotoxicidade em sangue de *Phrynops geoffroanus* (Etapa 2), de acordo com as concentrações testadas do benzo[a]pireno.

2.2. Objetivos Específicos

ETAPA 1

Em amostras de fígado, pâncreas, coração, pulmão, cérebro, intestino delgado e intestino grosso de espécimes de *Phrynops geoffroanus* provenientes de ambiente contaminado por atuação antrópica e de criatório (grupo controle):

- Analisar os níveis de MDA, como indicadores de peroxidação lipídica, em *Phrynops geoffroanus* de ambiente poluído em comparação ao controle;
- Avaliar as respostas dos sistemas relacionados com a biotransformação de xenobióticos de fase I (atividades da EROD, BROD e PROD) e fase II (atividade da GST), atividade da AChE e as respostas das principais defesas antioxidantes (atividades das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e níveis de GSH) como biomarcadores de contaminação urbana e industrial difusa, em comparação ao grupo controle (animais de criatório);
- Com análise de EROD, BROD, PROD, GST, AChE, SOD, CAT, GPx, GR, GSH e MDA nesta primeira Etapa, determinar o nível basal desses biomarcadores nos órgãos de *Phrynops geoffroanus*.

ETAPA 2

Em órgãos de espécimes de *Phrynops geoffroanus* expostos ao benzo[a]pireno e de espécimes sem contato com este composto (grupo controle):

- Analisar o estresse oxidativo gerado pela exposição controlada ao benzo[a]pireno e as respostas dos biomarcadores: atividades das enzimas EROD, BROD, PROD, GST, CAT, GPx e GR; e os níveis de GSH e MDA em cada órgão de acordo com as concentrações testadas do referido composto;
- Determinar quais os biomarcadores e os órgãos mais sensíveis à exposição ao benzo[a]pireno para a espécie em estudo;
- Investigar quais os órgãos (fígado, pâncreas, coração, pulmão, cérebro, intestino delgado e intestino grosso) que apresentam maior nível ou atividade para cada biomarcador;
- Avaliar a atividade enzimática da gama glutamil transferase em plasma de *Phrynops geoffroanus* expostos a diferentes concentrações de benzo[a]pireno, a fim de identificar alterações hepáticas de acordo com as concentrações testadas do referido composto;
- Analisar a fragmentação do DNA pelo ensaio cometa, a fim de identificar a genotoxicidade das diferentes concentrações de benzo[a]pireno em células sanguíneas de *Phrynops geoffroanus*.

Material e Método



3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Amostras

Este estudo consiste de duas etapas, nas quais foram analisados os seguintes órgãos de cada animal: fígado, pâncreas, coração, pulmão, cérebro, intestino delgado e intestino grosso. Na primeira etapa, utilizou-se amostras de vinte espécimes adultos de *Phrynops geoffroanus*, sendo dez provenientes do córrego Felicidade, afluente do rio Preto (Bacia do Turvo-Grande, SP), em São José do Rio Preto-SP; e dez do criatório “Reginaldo Uvo Leone”, em Tabapuã-SP, correspondentes ao grupo controle. Essas amostras foram coletadas em estudos anteriores e depositadas no Banco de Órgãos do Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), armazenadas em freezer a -80°C, conforme autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1 e nº16488-2) e aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo nº 5517/2008), comprovados nos Anexos A, B e C.

O córrego Felicidade localiza-se no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto-SP. A cidade é dividida fisicamente pelo rio Preto e seus tributários, sendo o córrego Felicidade um deles. O rio Preto possui aproximadamente 120 km de extensão, e é tributário do rio Turvo, que deságua no rio Grande (Bacia Turvo-Grande) (Figura 1 e 2). (Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande 2010).



Figura 1. Mapa da localização geográfica da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, na região noroeste do estado de São Paulo, e suas divisões. A seta indica o rio Preto. (Mapa adaptado de Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande 2010).

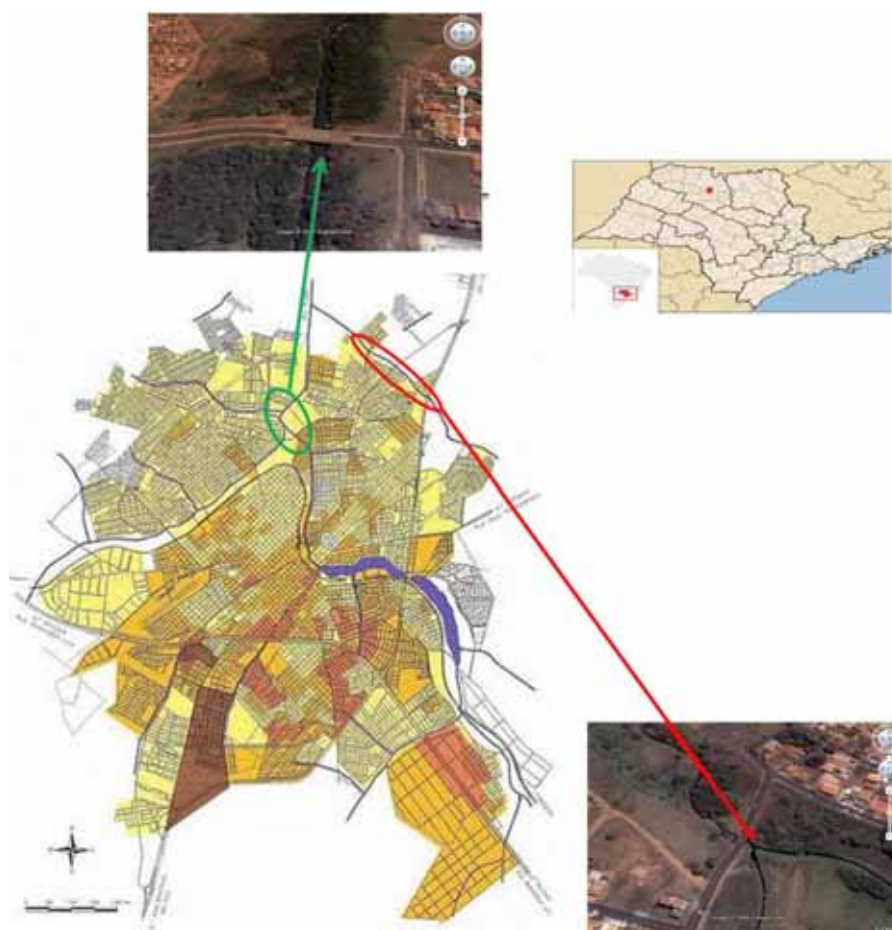


Figura 2. Representação esquemática da cidade de São José do Rio Preto, na região noroeste do Estado de São Paulo, com indicação dos pontos de coleta. Em vermelho, destaca-se o córrego Felicidade, local de captura dos animais da Etapa 1, com um dos pontos de coleta indicado à direita (seta vermelha). Em verde, destaca-se o local de captura dos espécimes da Etapa 2, com um dos pontos de coleta ilustrado acima (seta verde). (Mapa da cidade adaptado de Whitacker, 2007).

Com cerca de 450 mil habitantes, a cidade é fonte constante de poluição aquática derivada de resíduos agrícolas gerados pela cultura da cana-de-açúcar e curtumes nos nove córregos que atravessam a cidade (ZAGO et al., 2010).

No período em que os animais da Etapa 1 foram capturados, observou-se que o córrego Felicidade ($20^{\circ} 46' 20,6''\text{S}$, $49^{\circ} 21' 18,0''\text{O}$, elevação 475m, posição atual NE 1m) recebia esgoto sanitário sem tratamento, despejo clandestino de lixo e apresentava-se poluído e degradado, sem preservação de sua mata ciliar e com decorrente assoreamento. Já o criatório ($20^{\circ} 59' 47,4''\text{S}$, $49^{\circ} 07' 16,6''\text{O}$), por ser um local livre de exploração agrícola e atividade urbana, foi escolhido para coleta do grupo controle, para desta forma, garantir que os exemplares não tinham sido expostos a qualquer contaminante (Figura 3).



Figura 3. Imagens dos dois locais de captura dos espécimes utilizados na Etapa 1. À esquerda: criatório “Reginaldo Uvo Leone” e à direita: córrego Felicidade. O círculo destaca um ponto de despejo de efluentes.

Para a segunda etapa, foram capturados vinte machos adultos de *Phrynops geoffroanus* no afluente do Rio Preto (Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande - SP, $20^{\circ} 47' 49,9''\text{S}$; $49^{\circ} 23' 58,98''\text{O}$), em São José do Rio Preto, SP em um mesmo período (Figura 2).

A coleta de animais de um mesmo sexo exclui variáveis relacionadas ao metabolismo hormonal das alterações bioquímicas investigadas. Nas coletas anteriores, o número de fêmeas encontradas no local era superior ao de machos, porém, no período de captura dos animais desta Etapa 2, os machos foram encontrados em maior proporção que as fêmeas, o que justifica a escolha de espécimes deste sexo. A distinção sexual foi realizada segundo os padrões

morfológicos de avaliação do tamanho da cauda, abertura da placa anal e concavidade do plastrão (Figura 4) (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; MOLINA, 1989).

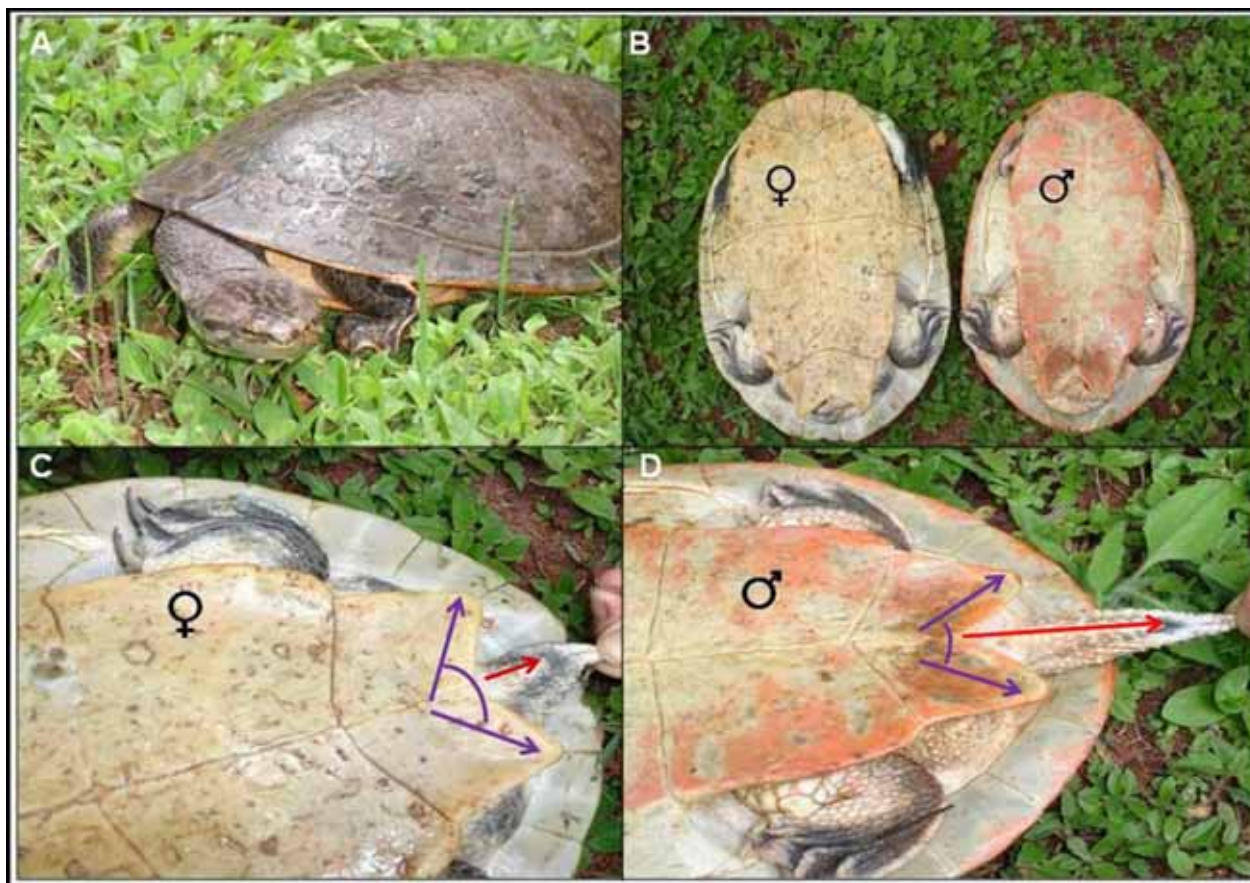


Figura 4. A – Visão geral de um espécime de *Phrynops geoffroanus*. B – Visão dos animais em decúbito dorsal, considerando as diferenças entre machos e fêmeas. C e D – Destaque dos padrões morfológicos de distinção sexual utilizados neste estudo, com detalhes do dimorfismo sexual feminino (C) e masculino (D). As setas vermelhas indicam o tamanho das caudas (medidas do final do plastrão até a abertura da cloaca), sempre mais compridas nos machos. As setas roxas indicam a forma da abertura da placa anal, sendo a dos machos mais estreitas que a das fêmeas. O exemplar do sexo masculino também apresenta concavidade do plastrão, outra característica dos machos. ♀ - Fêmea. ♂ - Macho.

Para as atividades de coleta dos espécimes e do material biológico foram obtidas autorização do IBAMA/ICMBio (código de autenticação: 14727648/nº 28549-1), e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP - CSJRP (Protocolo nº. 045/2011 CEUA), comprovados nos Anexos D e E. Os animais foram capturados com a utilização de armadilhas cilíndricas tipo “covo”, construídas artesanalmente com tela moeda de inox, contendo iscas para evitar a utilização de anzóis (Figura 5 A).

Para todos os espécimes coletados foram determinadas a massa corporal e a medida do tamanho do animal, pelo comprimento curvilíneo máximo da carapaça (CCCmáx), que recobre toda a curvatura da carapaça, do ponto anterior do escudo nugal até a extremidade posterior dos escudos supracaudais (Figura 5 B e C) (WYNEKEN, 2001). Espécimes de *Phrynops geoffroanus* são considerados adultos quando o CCCmáx é superior a 21 cm (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). Baseando-se nesta medida, somente os machos considerados adultos foram coletados.

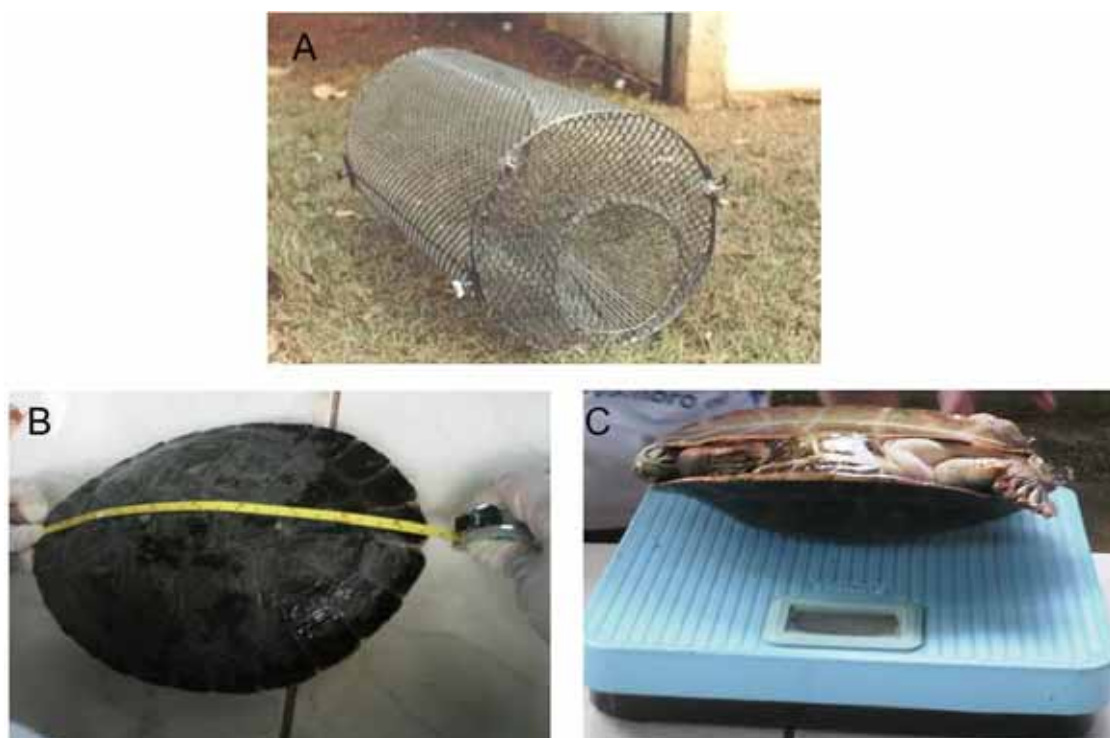


Figura 5. **A)** Armadilha do tipo “covo” utilizada para captura de espécimes de *Phrynops geoffroanus*. **B)** Medida do tamanho do animal pelo comprimento curvilíneo máximo da carapaça (CCCmáx), com auxílio de uma trena flexível, recobrindo toda a curvatura da carapaça. **C)** Pesagem de um exemplar em balança (10 g-10 kg).

Os animais foram transportados para o Instituto (UNESP/IBILCE) e colocados em tanques de fibra de vidro contendo água de poço artesiano, sem cloro, e termo-estabilizada a 28°C, com acesso ao fundo do tanque e à captura irrestrita de oxigênio atmosférico, onde permaneceram por 45 dias. Durante este período, os animais foram alimentados com ração comercial específica (Reptolife®), carnes bovina e de peixe, sendo a água trocada e os tanques limpos a cada dois dias. Após esse processo de aclimação, os cágados foram distribuídos entre quatro grupos de cinco animais cada, de modo mais homogêneo possível em termos de dados biométricos (Tabela1), formando um grupo controle e três grupos experimentais.

Tabela 1. Dados biométricos, em média $\pm$ desvio-padrão, dos cágados machos adultos da espécie *Phrynops geoffroanus* utilizados no experimento da Etapa 2.

Grupo	Peso (kg)	Tamanho (cm)
Controle	2,07 $\pm$ 0,34	31,66 $\pm$ 1,65
Grupo 1	2,042 $\pm$ 0,43	30,18 $\pm$ 2,60
Grupo 2	2,042 $\pm$ 0,19	31,18 $\pm$ 1,33
Grupo 3	2,056 $\pm$ 0,52	30,48 $\pm$ 2,38

Assim, foram formados quatro grupos com cinco animais cada: Grupo controle, cujos espécimes não foram expostos ao benzo[*a*]pireno, recebendo apenas o veículo (óleo vegetal de soja); e três grupos experimentais, Grupo 1: sendo submetido a dose menor (100 μ g de benzo[*a*]pireno por kg corporal do animal); Grupo 2: exposto a dose intermediária do contaminante (500 μ g/ kg) e Grupo 3: recebeu a dose maior (1000 μ g/kg). Para ser administrado nos quinze dos vinte animais, o benzo[*a*]pireno foi previamente diluído em óleo vegetal de soja, e introduzido em dose única nos animais por meio de sonda orogástrica (Figura 6) (BRITO, 2007; SANTOS et al., 2010). O volume administrado de veículo, foi de 1 mL por animal, inclusive no controle.



Figura 6. Procedimento via sonda orogástrica para administração do benzo[*a*]pireno nos cágados. Os animais foram contidos fisicamente, suas bocas abertas com auxílio de uma pinça hemostática, a sonda orogástrica apropriada inserida e então a solução de benzo[*a*]pireno, previamente diluído em óleo vegetal, administrada lentamente.

Sete dias após a aplicação do benzo[*a*]pireno, os vinte animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), utilizando super dosagem do anestésico Thiopental[®] (60 a 100mg/kg) e posterior aplicação de KCl (1 a 2 mmol/kg) na veia jugular externa (ANDERSEN et al., 2004), seguida de decaptação e retirada do plastrão com serra circular para remoção dos órgãos. Os órgãos como fígado, pâncreas, coração, pulmão, intestino delgado e intestino grosso foram coletados e armazenados em freezer a -80° C até o momento das análises bioquímicas.

Coletou-se também as amostras sanguíneas da veia jugular externa destes vinte animais, após o experimento da etapa 2, e imediatamente antes da aplicação do anestésico, uma vez que este pode interferir nas análises. Estas amostras foram utilizadas para análise da atividade enzimática da gama glutamil transferase (no plasma) e da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa.

3.2. Descarte de resíduos químicos e água contaminada

Ao final deste experimento, a água dos animais expostos ao benzo[*a*]pireno foi tratada por meio de filtros de carvão ativado que retêm os resíduos tóxicos evitando, portanto, o descarte inadequado no ambiente. Além disso, os restos dos animais foram coletados por uma empresa especializada em tratamento de resíduos biológicos, e todos os resíduos químicos produzidos durante as análises foram devidamente armazenados em recipientes apropriados para posterior recolhimento, tratamento ou destruição pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos do IBILCE/UNESP.

3.3. Análises Bioquímicas

3.3.1. Peroxidação lipídica

Para análise dos níveis de MDA, 100 mg de cada amostra tecidual foram homogeneizados em 300 µL de tampão Tris HCl 0,1M, pH 8,0. Em seguida, acrescentou-se 300 µL da solução de

TBA 0,4% diluído em HCl 0,2 M, sendo esta mistura incubada por 40 minutos a 90 °C. Passado esse período, as amostras foram colocadas no gelo para resfriar e então se adicionou 1 mL de álcool n-butílico. Posteriormente, centrifugou-se a 3.500 rpm por 3 minutos, sendo coletados 700 µL do sobrenadante para análise.

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nas amostras, analisou-se a presença do produto formado entre o malondialdeído (MDA, produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) acoplada ao detector de UV/Vis em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003, 2004), utilizando a coluna LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). A fase móvel consistiu em solução de fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% de metanol, bombeada isocraticamente (1 mL/min). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão, injetando-se previamente no HPLC, concentrações conhecidas de padrões autênticos de MDA derivatizados com o TBA. O monitoramento do cromatograma e a identificação e quantificação do pico foram realizados utilizando o software EZ Chrom Elite (Agilent Technologies).

3.3.2. Análise da Glutathiona reduzida (GSH)

Para análise da glutathiona, primeiramente foram homogeneizados 50 mg de cada amostra em 500 µL de ácido perclórico 0,5 M e centrifugados a 3100 x g por 10 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e posteriormente, neutralizada e diluída em solução de fosfato de potássio (KPi) 0,1M pH 7,0 (50 µL do sobrenadante em 450 µL de solução de KPi). Em seguida, centrifugou-se novamente a 15,000 x g por 2min a 4°C para a análise.

A glutathiona foi analisada segundo o método de Tietze (1969), adaptado por Akerboom e Sies (1981), utilizando um meio de reação contendo KPi 0,25M pH 7,0, NADPH 100mM, DTNB 5 mM e GR 5U/mL. A técnica consiste no ensaio espectrofotométrico, no qual a GSH presente na amostra ao interagir com DTNB gerou GSSG e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A GSSG formada foi, então, reduzida a GSH pela GR (por meio da oxidação do NADPH), com formação contínua do ácido 2-nitro-5-tiobenzóico, proporcional ao conteúdo de GSH. A reação foi acompanhada por dois minutos a 412 nm a 30 °C.

A quantificação da glutatona formada nos ensaios foi feita com base em uma curva padrão, com concentrações conhecidas de GSH (apesar de usarmos GSSG no ensaio, o valor da curva a ser utilizado foi de GSH, duas vezes maior, pois cada GSSG equivale a duas moléculas de GSH), fornecendo de forma indireta, a concentração de glutatona da amostra.

3.3.3. Ensaios Enzimáticos

- **Preparo das amostras para análise das enzimas EROD, BROD, PROD, GST, SOD, CAT, GPx e GR**

Para os ensaios enzimáticos da EROD, BROD, PROD, GST, SOD, CAT, GPx e GR, os tecidos foram pesados e, então, homogeneizados (1:4, massa: volume) em tampão Tris 50 mM, pH 7,4, contendo sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, inibidor de serina protease, e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 3° C. A porção sobrenadante foi coletada e novamente centrifugada a 50.000 x g por uma hora a 3° C, a fim de se obter as frações citosólica e microssomal. A porção sobrenadante, ou fração citosólica, foi novamente coletada para análise das atividades enzimáticas da GST, SOD, CAT, GPx e GR. Para obtenção das frações microssomais, nas quais foram avaliadas as atividades da EROD, BROD e PROD, como indicativos da atividade do citocromo P450, os pellets resultantes da última centrifugação foram homogeneizados em 100 µL de tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, KCl 100 mM e 20% de glicerol.

- **Análise da EROD, BROD e PROD**

As atividades da EROD, BROD e PROD foram medidas na fração microssomal dos extratos protéicos dos tecidos, pelo método fluorimétrico descrito por Burke e Mayer (1974; 1985), com algumas modificações. Nos ensaios de EROD, BROD e PROD foram utilizados os substratos 7-etóxi-resorufina, 7-benzilóxi-resorufina e 7-pentóxi-resorufina, respectivamente, na presença de NADPH 20 mM.

O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente (λ_{excit} = 537 nm, λ_{emiss} =583 nm), catalisada pela enzima. Adicionou-se à cubeta 1950 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de 20 µL de solução de 7-etóxi-resorufina (EROD) 332 µM, 7-

benzilóxi-resorufina (BROD) 330 μ M ou 7-pentóxi-resorufina (PROD) 350 μ M, 20 μ L de NADPH 20 mM e 10 μ L de extrato microsomal. O ensaio foi registrado por 3 min, a 30°C.

A quantificação da resorufina formada nos ensaios das isoformas foi feita com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas de resorufina.

- **Avaliação da Glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976), utilizando a fração citosólica. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 6,5, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM, como substrato, e glutathione reduzida (GSH) 100 mM, sendo o aumento da absorbância acompanhado a 340 nm.

- **Análise da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969). Tal método baseia-se em um sistema de geração de radical ânion superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento da absorbância em 550 nm a 28° C. A adição da amostra contendo a SOD promove inibição na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo c pelo superóxido.

- **Análise da Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, por meio do decréscimo da absorbância em 240 nm a 30° C. Para isso, a amostra foi adicionada a um meio de reação composto por tampão Tris 1,0 M, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM e peróxido de hidrogênio 10 mM.

- **Avaliação da Glutathione peroxidase (GPx)**

A análise da GPx foi feita pela técnica de Sies e colaboradores (1979). Este método baseia-se na medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). Esta redução é catalisada pela glutathione redutase (GR) na presença de NADPH a 30° C. No ensaio, a amostra e o peróxido de terc-butila 0,5 mM foram adicionados

a um meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 0,1 mM, pH 7,0, contendo EDTA 5 mM, 0,172 mg de NADPH/mL, GR 0,1 U/mL e 0,32 mg de GSH/mL.

- **Avaliação da Glutathione Redutase (GR)**

A atividade da GR foi mensurada pelo método de Carlberg e Mannervik (1985), no qual o consumo de NADPH é estimado por meio da variação de absorbância e acompanhado por dois minutos a 340 nm e 30 °C, na presença do substrato GSSG. A técnica consiste na redução da GSSG a GSH pela GR por meio da oxidação do NADPH. Para isto, 10 µL de amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 20 µL de glutathione oxidada (GSSG), 20 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) e 950 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5, EDTA 1 mM.

- **Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

Cerca de 80 mg de cada amostra tecidual foi homogeneizada em 4 volumes de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 e centrifugada por 30 minutos a 10.000 x g a 4°C. A fração sobrenadante foi então coletada e armazenada a -80° C até o momento das análises. A atividade da AChE foi medida segundo a metodologia descrita por Ellman e colaboradores (1961), que se caracteriza por ensaio espectrofotométrico a 25° C, $\lambda=412$ nm, $\xi m M=13,6$ mM⁻¹, seguindo a reação de DTNB com tiocolina. Utilizou-se a acetiltiocolina (Sigma-Aldrich®) como substrato para atividade da AChE.

- **Análise da atividade enzimática da Gama Glutamil Transferase (GGT)**

Para esta análise, as amostras sanguíneas coletadas foram acondicionadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e centrifugadas a 5000 rpm, para obtenção do plasma utilizado nas dosagens. Armazenou-se o plasma em freezer -80 °C até o momento das análises, não ultrapassando o período de 2 meses.

A GGT catalisa a reação de transferência do grupamento glutamyl do glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilina para a glicilglicina, originando L-glutamylglicilglicina e 5-amido-2-nitrobenzoato. A quantidade de 5-amino-2-nitrobenzoate formado é proporcional à atividade da GGT e pode ser medido cineticamente (adaptado de ROSALKI; TARLOW, 1974).

A análise foi realizada a partir de kit analítico da empresa Biotécnica, composto por dois reagentes de trabalho (R1: Tampão Tris 100 mmol/L, pH 8,6; gliciglicina 100 mmol/L; azida sódica 0,09% e R2: L-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilina 4 mmol/L; azida sódica 0,09%). Para o meio de reação, estes foram misturados na proporção de 4 partes de R1 para 1 parte de R2 e pré-aquecidos em banho-maria durante 3 minutos a 37 °C. Após a incubação, pipetou-se 400 µL dessa mistura e 110 µL de amostra, e a reação foi acompanhada em espectrofotometria a 405 nm por 4 minutos.

- **Determinação da concentração de proteínas**

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) e utilizada apenas para calcular a atividade específica das enzimas avaliadas em U/mg. Para isso, o valor de absorbância foi determinado por espectrofotometria em 595 nm e os resultados foram então comparados a uma curva de calibração, com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA; 0,1–1mg/mL), utilizada como padrão para obtenção da concentração da proteína em estudo. Posteriormente, a taxa de variação da absorbância analisada nos ensaios de cada enzima foi relacionada com a quantificação protéica, resultando no valor da atividade enzimática. A quantificação de proteínas foi realizada em espectrofotômetro de cubetas ou em leitor de microplacas.

3.3.4. Ensaio Cometa

Esta técnica é o resultado de estudos realizados por Ostling e Johanson em 1984, que desenvolveram uma metodologia para a visualização de danos no DNA de células individuais, e os de Singh et al. (1988) e Klaude et al. (1996) que melhoraram a técnica com modificações para condições alcalinas, permitindo avaliar a integridade do DNA em vários tipos de células (CHRISTOFOLETTI; DAVID; FONTANETTI, 2009).

Um pequeno número de células embebidas em um fino gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia foi lisado, submetido à eletroforese e corado com corante fluorescente DNA-vinculativo. A corrente elétrica resultou na migração dos fragmentos de DNA em direção ao ânodo. As imagens resultantes, que foram posteriormente nomeadas pela sua aparência de "cometas", foram analisadas para determinar a extensão dos danos de DNA (FAIRBAIRN et al.,

1995). Cem células selecionadas aleatoriamente foram analisadas por amostra de acordo com a "cauda de migração" do DNA (MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005). Quanto mais danos ao DNA, mais fragmentos migram para a região da cauda durante a eletroforese em pH alcalino, formando maior "cauda de cometa", que pode ser facilmente visualizada em microscópio de fluorescência (ÇOK, 2011).

Procedimento:

Para cada animal foram previamente preparadas três lâminas pré-gelatinizadas com solução de agarose comum. Nessas lâminas, depositou-se uma solução homogeneizada de suspensão celular (sangue diluído em solução fisiológica) com agarose de baixo ponto de fusão. Posteriormente, as lâminas ficaram em solução de lise em geladeira por 1 h, sendo então submetidas à eletroforese alcalina, por 20 minutos a 25 V, 300 mA, no escuro para o processo de denaturação do DNA e a migração dos fragmentos de DNA em direção ao ânodo. As lâminas foram, a seguir, neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos.

Durante todos os procedimentos, o material foi mantido no escuro para evitar danos adicionais ao DNA. O material também foi mantido em gelo durante a coleta, transporte para o laboratório, bem como durante a eletroforese para proporcionar maior reprodutibilidade (MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005; TICE et al. 2000).

No momento da leitura, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,02 mg/mL). A análise foi realizada ao microscópio de fluorescência, filtro de excitação 515-560 nm de comprimento de onda e filtro de barreira de 590 nm, em objetiva de 40x.

Para cada amostra foram analisados 100 núcleóides, escolhidos aleatoriamente, e classificados visualmente de acordo com a migração dos fragmentos, conforme o comprimento e intensidade da cauda em: classe 0 (ausência de cauda); classe 1 (cauda com até o mesmo diâmetro da cabeça do cometa); classe 2 (cauda de tamanho médio, com 2 vezes o diâmetro da cabeça) e classe 3 (cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça) (Figura 7), de acordo com a classificação de Kobayashi et al. (1995).

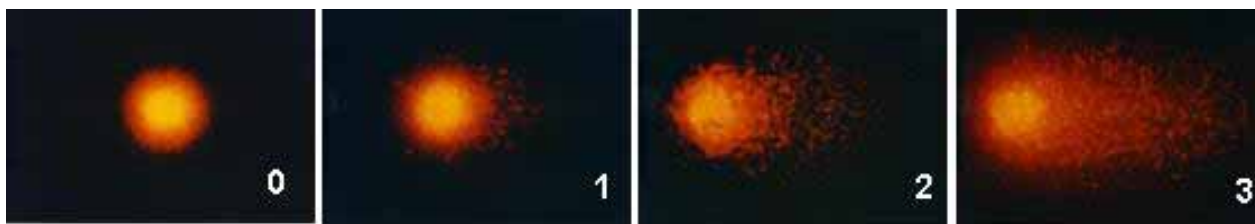


Figura 7. Classes do teste do cometa: classe 0 (pouco dano); classe 1 (pequeno dano); classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano) (KOBAYASHI et al., 1995).

Verificou-se os scores para cada concentração de benzo[*a*]pireno, pela multiplicação do número de nucleóides pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) (VENTURA; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

3.4. Análise Estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o *software* STATISTICA 8.0 e o nível de significância (*p*) de 5% ($p < 0,05$). As variáveis foram testadas quanto à homocedasticidade (teste de Levene) e normalidade (*Shapiro-Wilk*).

Para comparações entre os dois grupos da primeira etapa de acordo com o tipo de órgão foi utilizado o teste *t* independente para dados paramétricos e *Mann-Whitney* para não-paramétricos. As comparações entre os tratamentos com benzo[*a*]pireno foram realizadas pelo teste ANOVA *One-Way*, seguido pelo teste de *Tukey*, para dados paramétricos, ou pelo teste *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn*, para dados não-paramétricos.

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. ETAPA 1

4.1.1. Amostras e análises bioquímicas

Nesta primeira etapa do estudo foram analisadas amostras de fígado, coração, pulmão, pâncreas, cérebro, intestino delgado e intestino grosso de espécimes de *Phrynos geoffroanus* provenientes de ambiente contaminado por atuação antrópica (efluentes sanitários e industriais) e de criatório (grupo controle).

Em relação ao encéfalo, devido à pequena quantidade de tecido, insuficiente para realização de todas as metodologias propostas, foi priorizada sua utilização na análise da atividade enzimática da AChE. Isto porque esta enzima tem sua atividade mais pronunciada neste órgão, uma vez que, atua nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares, onde é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina.

Nas amostras dos demais órgãos (fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso) foram realizadas todas as análises.

4.1.2. Peroxidação lipídica

Foram realizadas as análises dos níveis de MDA em fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e grosso dos vinte animais. As análises revelaram aumento estatisticamente significativo nas concentrações de MDA para as amostras de fígado ($p = 0,0019$), coração ($p = 0,0220$), pulmão ($p = 0,0002$), intestino delgado ($p = 0,0002$) e intestino grosso ($p = 0,0000$) dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório (grupo controle). Em relação às amostras de pâncreas, os valores de MDA não diferiram entre os animais dos dois grupos.

A figura 8 apresenta os valores de MDA (em nmol/mg de tecido) expressos em média $\pm$ desvio-padrão de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado.

Observa-se que as concentrações de MDA do fígado estão em escala bem maior que dos demais órgãos. Deste modo, o maior nível de lipoperoxidação desta etapa foi apresentado em fígado de animais de ambiente urbano ($168,59 \pm 26,2$ nmol/mg de tecido). Já o pulmão apresentou o menor nível de MDA, tendo o nível basal (controle) de $9,66 \pm 0,88$ nmol/mg de tecido.

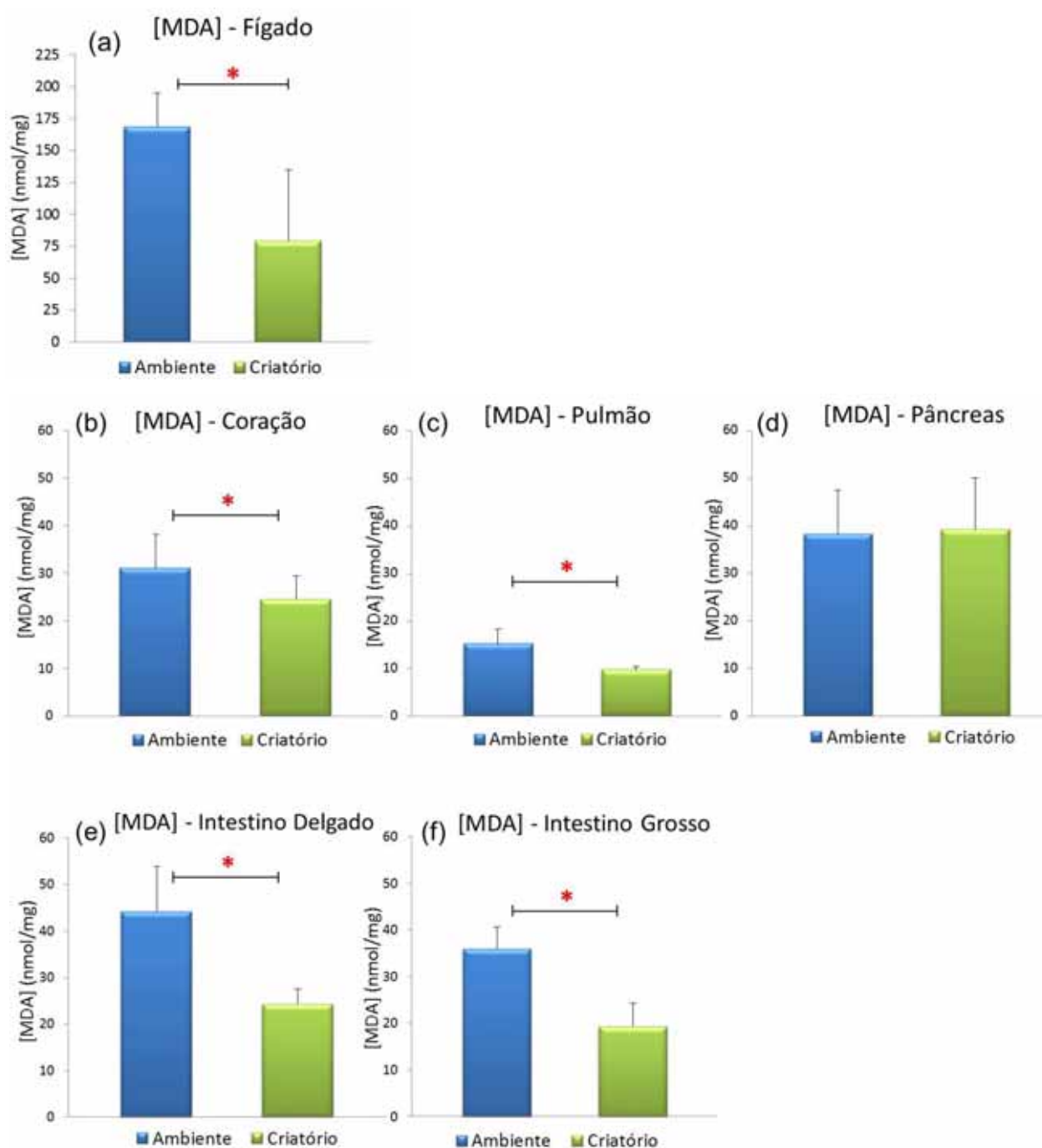


Figura 8. Concentração de MDA (nmol/mg de tecido) em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Escala de 0 - 225 em (a); escala de 0 - 60 de (b) a (f). Comparação estatística entre os grupos: **(a)** $p=0,00194$ ^{2*}; **(b)** $p=0,022046$ ^{1*}; **(c)** $p=0,000239$ ^{2*}; **(d)** $p=0,842546$ ¹; **(e)** $p=0,000239$ ^{2*}; **(f)** $p=0,000000$ ^{1*}.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

4.1.3. Análise da Glutathiona reduzida (GSH)

As análises dos órgãos de *Phrynops geoffroanus* revelaram aumento estatisticamente significativo nas concentrações da GSH para as amostras de fígado ($p= 0,0002$), pulmão ($p= 0,0025$) e intestino delgado ($p= 0,0494$) dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório (grupo controle).

Em relação ao coração, pâncreas e intestino grosso, não ocorreu diferenças estatísticas entre os valores da GSH dos animais destes dois ambientes. A figura 9 apresenta os valores médios e desvio-padrão da GSH (em nmol/g de tecido) de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado.

As diferentes escalas com que os valores da GSH foram apresentados na figura refletem a grande variação dos níveis de glutathiona entre os órgãos. Assim como no caso anterior, o maior valor de GSH foi apresentado em fígado de animais de ambiente urbano e o pulmão apresentou a menor concentração de GSH, tendo o nível basal (valor do grupo controle) de $34,07 \pm 4,28$ nmol/g de tecido.

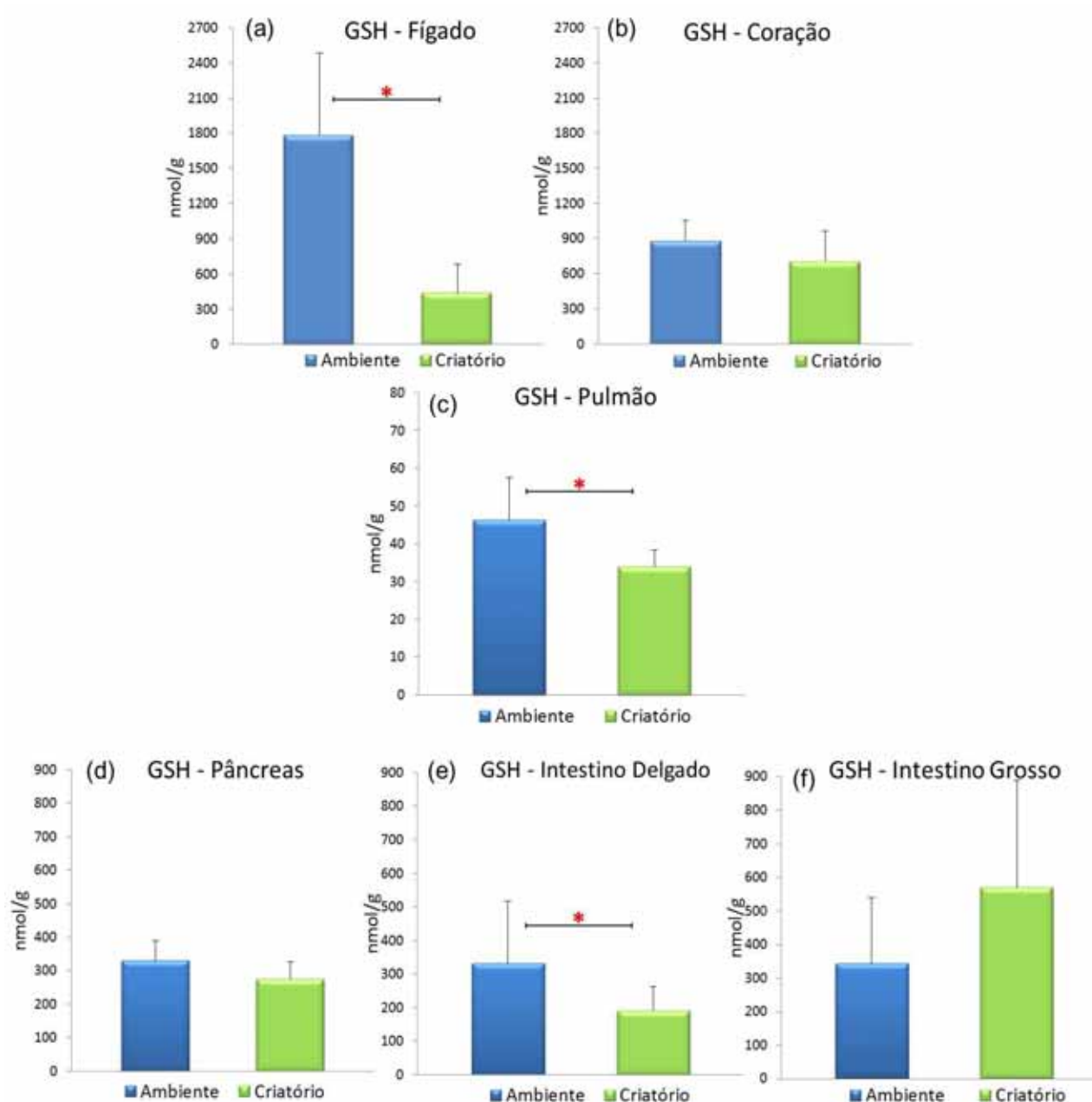


Figura 9. Concentração de GSH (nmol/g de tecido) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Escala de 0 - 2700 em (a) e (b); escala de 0 - 80 em (c); escala de 0 - 900 de (d) a (f). Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,000212$ ^{2*}; (b) $p = 0,097617$ ¹; (c) $p = 0,002497$ ^{2*}; (d) $p = 0,081647$ ¹; (e) $p = 0,049367$ ^{2*}; (f) $p = 0,072713$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

4.1.4. Ensaios Enzimáticos

• Avaliação da EROD

A atividade da isoforma 7-etóxi-resorufina-*O*-deetilase (EROD) foi mensurada nos órgãos dos animais dos dois grupos e apresentou-se significativamente maior no fígado ($p = 0,0454$), coração ($p = 0,0113$) e pâncreas ($p = 0,0416$) dos animais de área urbana em comparação aos cágados da área controlada, indicando que ocorreu indução da CYP1A nestes órgãos dos animais do córrego. Nos outros órgãos avaliados, porém, não houve diferença entre os valores da EROD dos dois grupos.

Os valores da atividade da EROD (em pmol resorufina/min/mg proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 10.

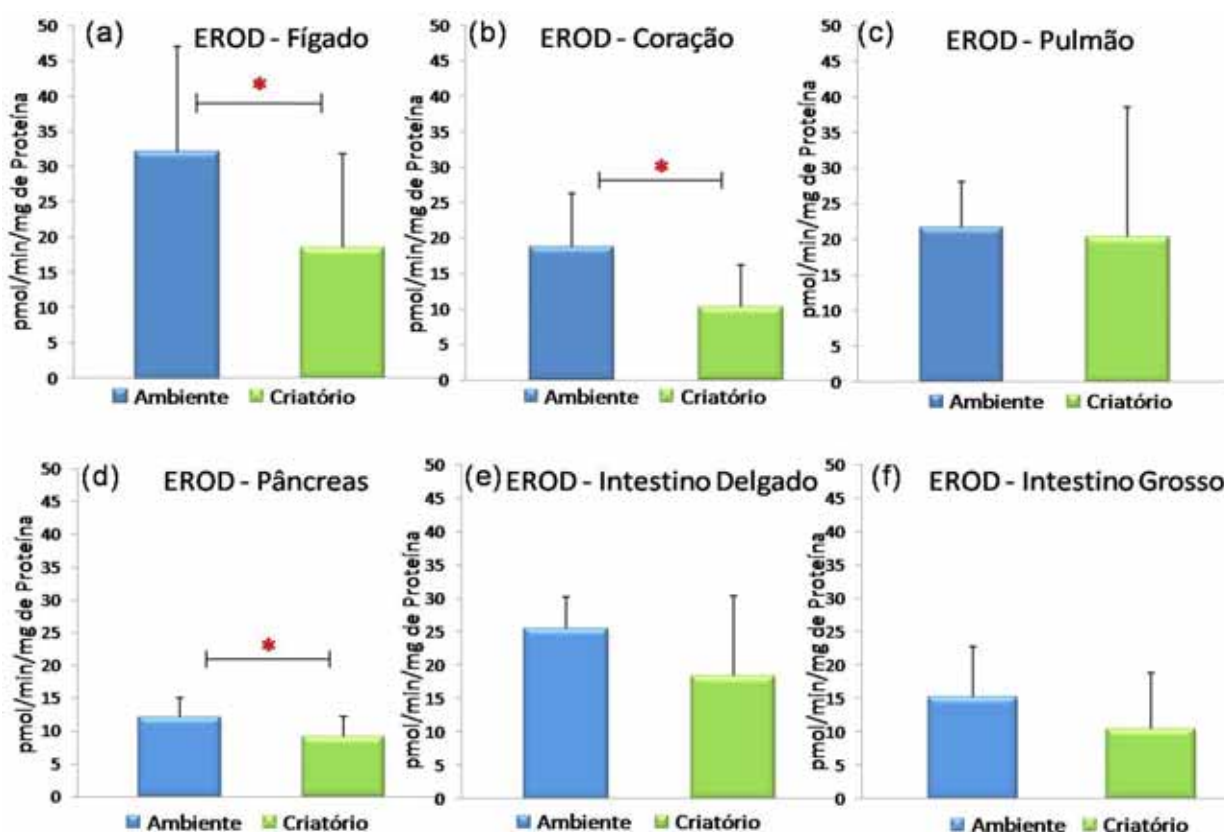


Figura 10. Atividade da EROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano ($n=10$) e criatório ($n=10$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,045406$ ^{1*}; (b) $p = 0,011324$ ^{1*}; (c) $p = 0,141646$ ²; (d) $p = 0,04164$ ^{1*}; (e) $p = 0,120820$ ²; (f) $p = 0,197244$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

• Avaliação da BROD

Os dados das análises da isoforma 7-benzilóxi-resorufina-*O*-debenzylase (BROD) revelaram aumento estatisticamente significativo nas atividades da BROD para as amostras de coração ($p = 0,0381$) e pâncreas ($p = 0,0331$) dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório. Nos demais órgãos, não houve diferenças estatísticas entre os valores da BROD dos animais destes dois grupos.

A figura 11 apresenta os valores da atividade da BROD (em pmol resorufina/min/mg proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado.

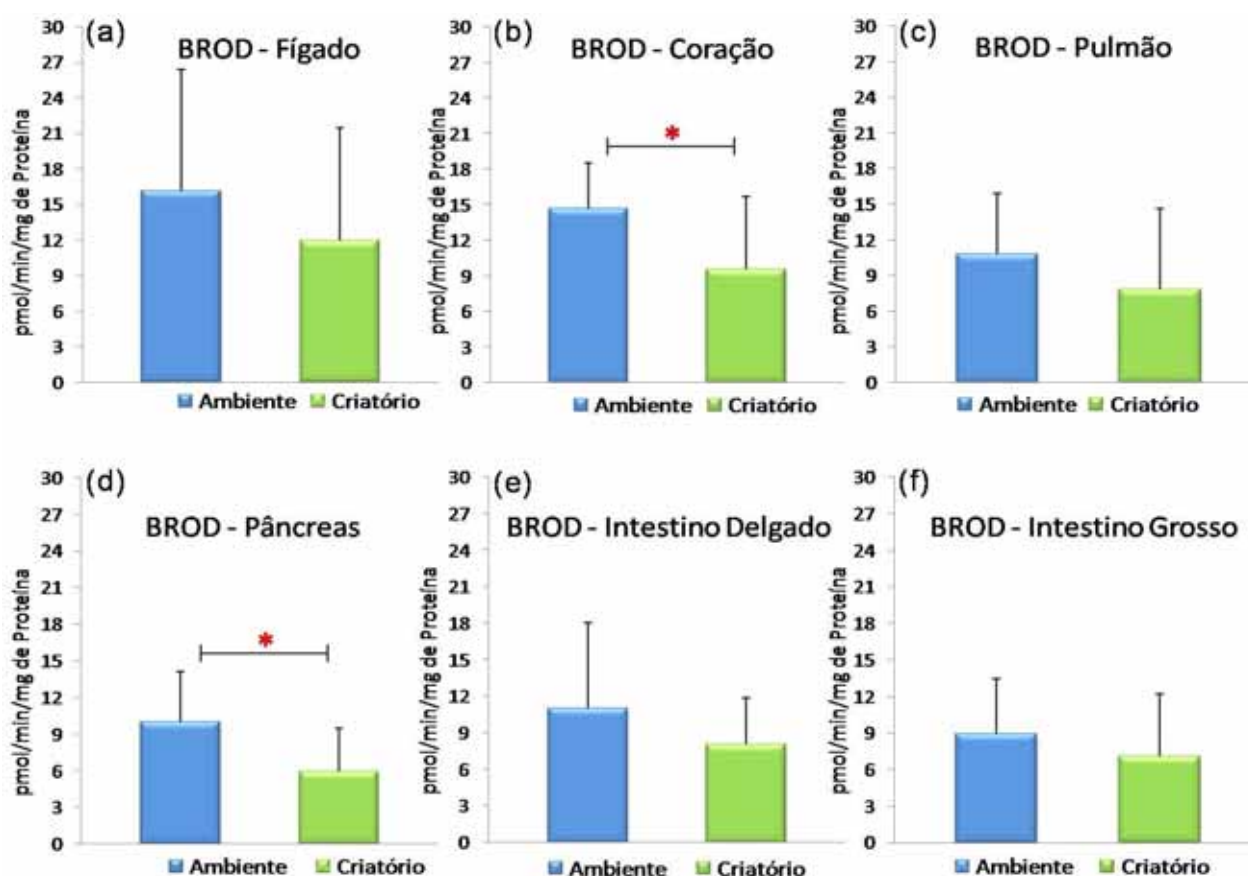


Figura 11. Atividade da BROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,496292$ ²; (b) $p = 0,038126$ ^{1*}; (c) $p = 0,291151$ ¹; (d) $p = 0,033083$ ^{1*}; (e) $p = 0,286229$ ¹; (f) $p = 0,401172$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann-Whitney*.

• Avaliação da PROD

A terceira enzima de detoxificação de fase I avaliada neste estudo, a isoforma 7-pentóxi-resorufina-*O*-depentilase (PROD), apresentou resultados similares aos observados para a BROD. A atividade da PROD foi significativamente aumentada nas amostras de coração ($p = 0,0387$) e pâncreas ($p = 0,0389$) dos animais de ambiente urbano em relação aos animais do grupo controle. Nos demais órgãos, não houve diferenças estatísticas entre os valores da PROD dos dois grupos.

Os valores médios e desvio-padrão da atividade da PROD (em pmol resorufina/min/mg proteína) de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 12.

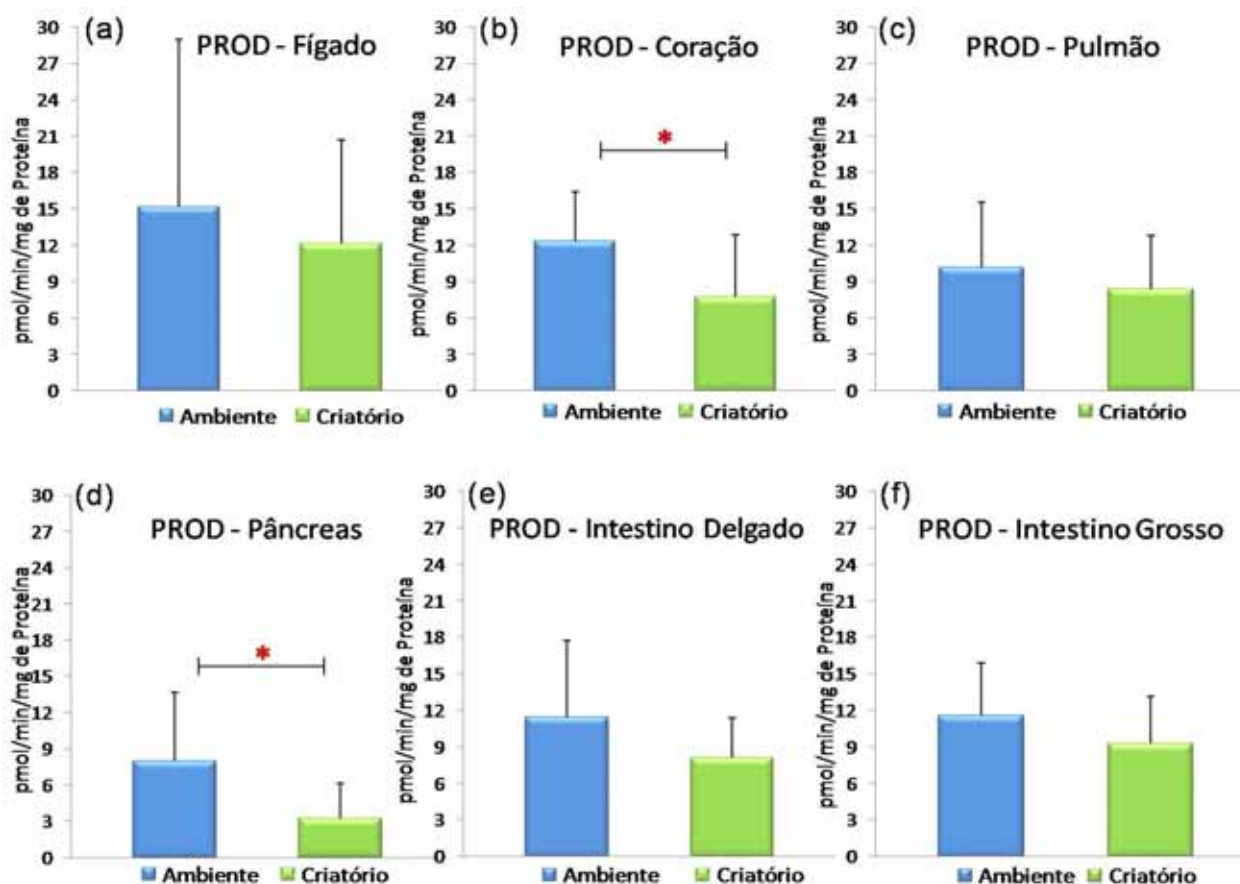


Figura 12. Atividade da PROD, em pmol/min/mg de proteína, das amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano ($n=10$) e criatório ($n=10$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,762369$ ²; (b) $p = 0,038701$ ^{1*}; (c) $p = 0,445298$ ¹; (d) $p = 0,038942$ ^{1*}; (e) $p = 0,171429$ ¹; (f) $p = 0,223747$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

• Avaliação da Glutathione S-transferase (GST)

A GST apresentou atividade aumentada significativamente nas amostras de fígado dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório (grupo controle) ($p = 0,0042$), o que representa uma diferença de 23,16% na atividade da GST entre os dois grupos. Para as amostras de pâncreas, também ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima entre os animais de ambiente urbano e controle ($p = 0,0365$), com aumento de 38,72% para os espécimes de ambiente em relação ao controle.

Em relação aos demais órgãos, não houve diferenças estatísticas entre animais destes dois ambientes para os valores desta enzima. A figura 13 apresenta os valores médios e desvio-padrão da atividade da GST (em U/mg de proteína) de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada órgão analisado.

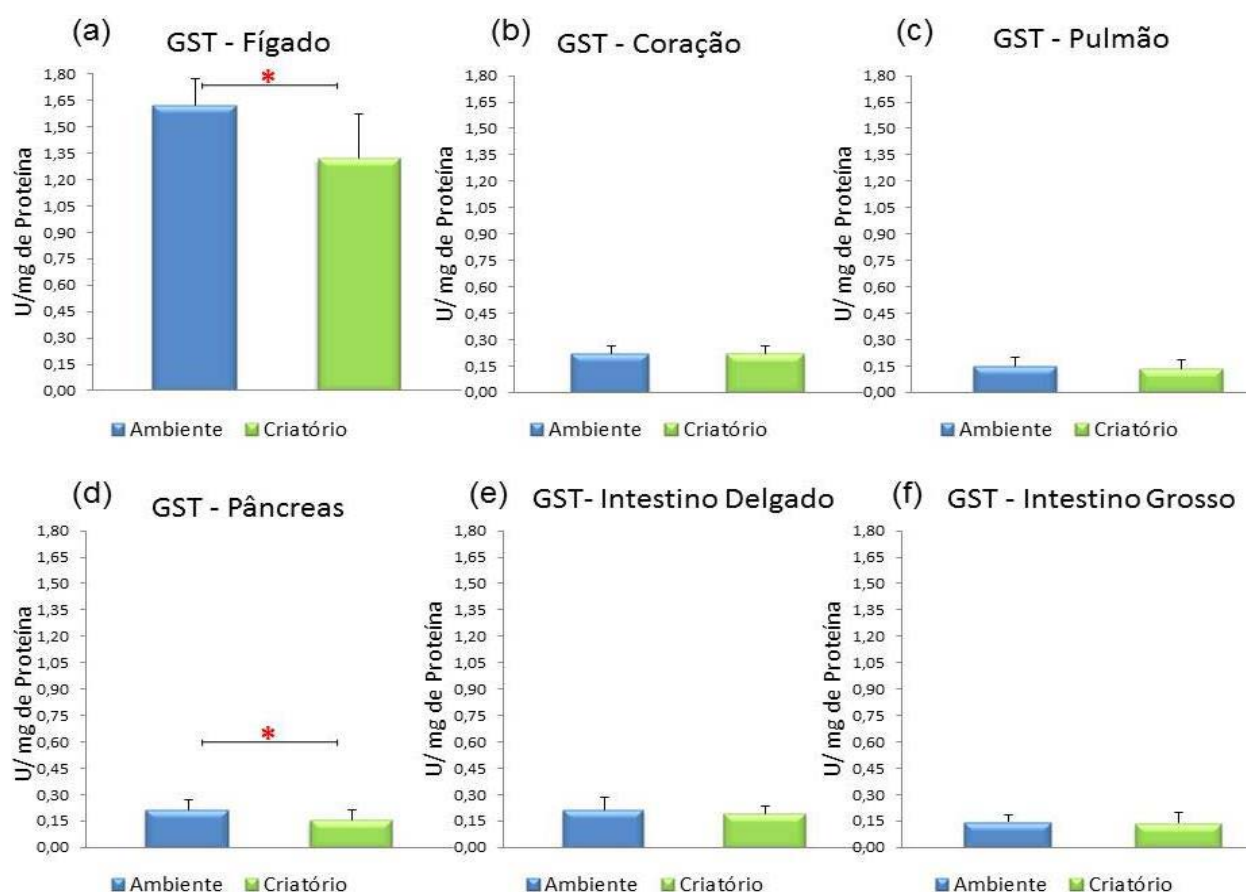


Figura 13. Atividade da GST (U/mg de proteína) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,004190$ ^{1*}; (b) $p = 0,867580$ ¹; (c) $p = 0,462433$ ²; (d) $p = 0,036504$ ^{1*}; (e) $p = 0,500156$ ¹; (f) $p = 0,704757$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste t Independente; ² Teste Mann Whitney.

• Análise da Superóxido Dismutase (SOD)

As análises revelaram aumento estatisticamente significativo na atividade da SOD para as amostras de intestino delgado dos animais do ambiente urbano em relação ao controle ($p = 0,0222$), com diferença de 27,42% entre os grupos. Porém, nas amostras de pâncreas ocorreu redução significativa na atividade desta enzima para os animais de ambiente urbano em relação ao controle ($p = 0,0412$), com diferença de 17,92% entre os dois grupos. Nos demais órgãos, a SOD não apresentou alterações estatisticamente significantes entre os dois grupos.

Na figura 14 são apresentados os valores médios e desvio-padrão da atividade da SOD (em U/mg de proteína) de animais destes dois grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada um dos órgãos analisados.

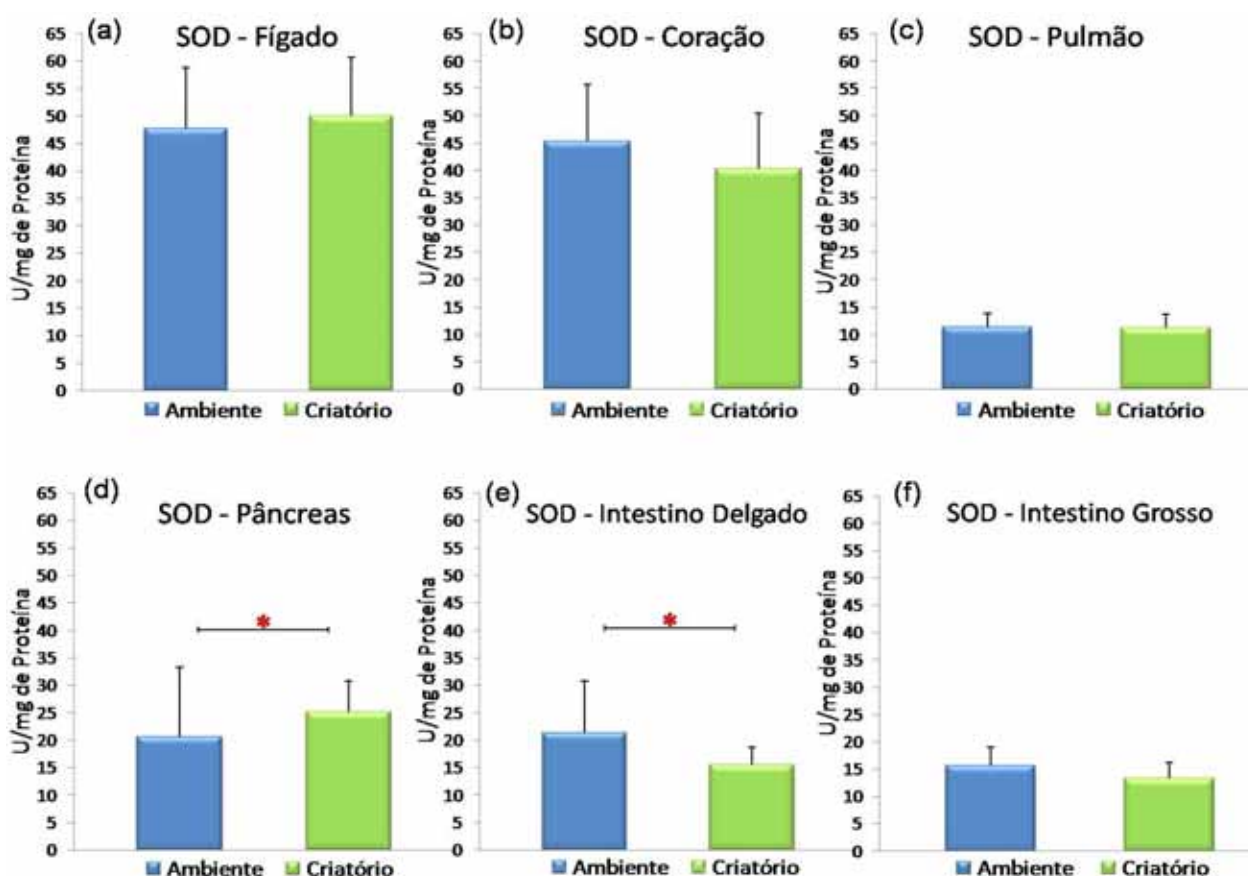


Figura 14. Atividade da SOD, em U/mg de proteína, das amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano ($n=10$) e criatório ($n=10$; controle). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,629913$ ¹; (b) $p = 0,879829$ ²; (c) $p = 0,931757$ ¹; (d) $p = 0,041228$ ^{2*}; (e) $p = 0,022244$ ^{2*}; (f) $p = 0,117241$ ¹.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

- **Análise da Catalase (CAT)**

A CAT apresentou atividade aumentada significativamente para as amostras de pulmão dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório ($p = 0,0167$), o que representa uma diferença de 28,49% na atividade da CAT entre os dois grupos. Para as amostras de intestinos delgado e grosso, também ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima entre os animais de ambiente urbano e controle ($p = 0,0041$ e $p = 0,0233$, respectivamente). A atividade da CAT aumentou 143,7% nas amostras de intestino delgado dos espécimes de ambiente em relação ao controle. Nas amostras de intestino grosso, os animais de ambiente urbano apresentaram 85,56% mais atividade da CAT do que o grupo controle.

Em relação ao fígado, coração e pâncreas não houve diferenças estatísticas entre animais destes dois ambientes para os valores desta enzima. Os valores da atividade da catalase (em U/mg de proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 15.

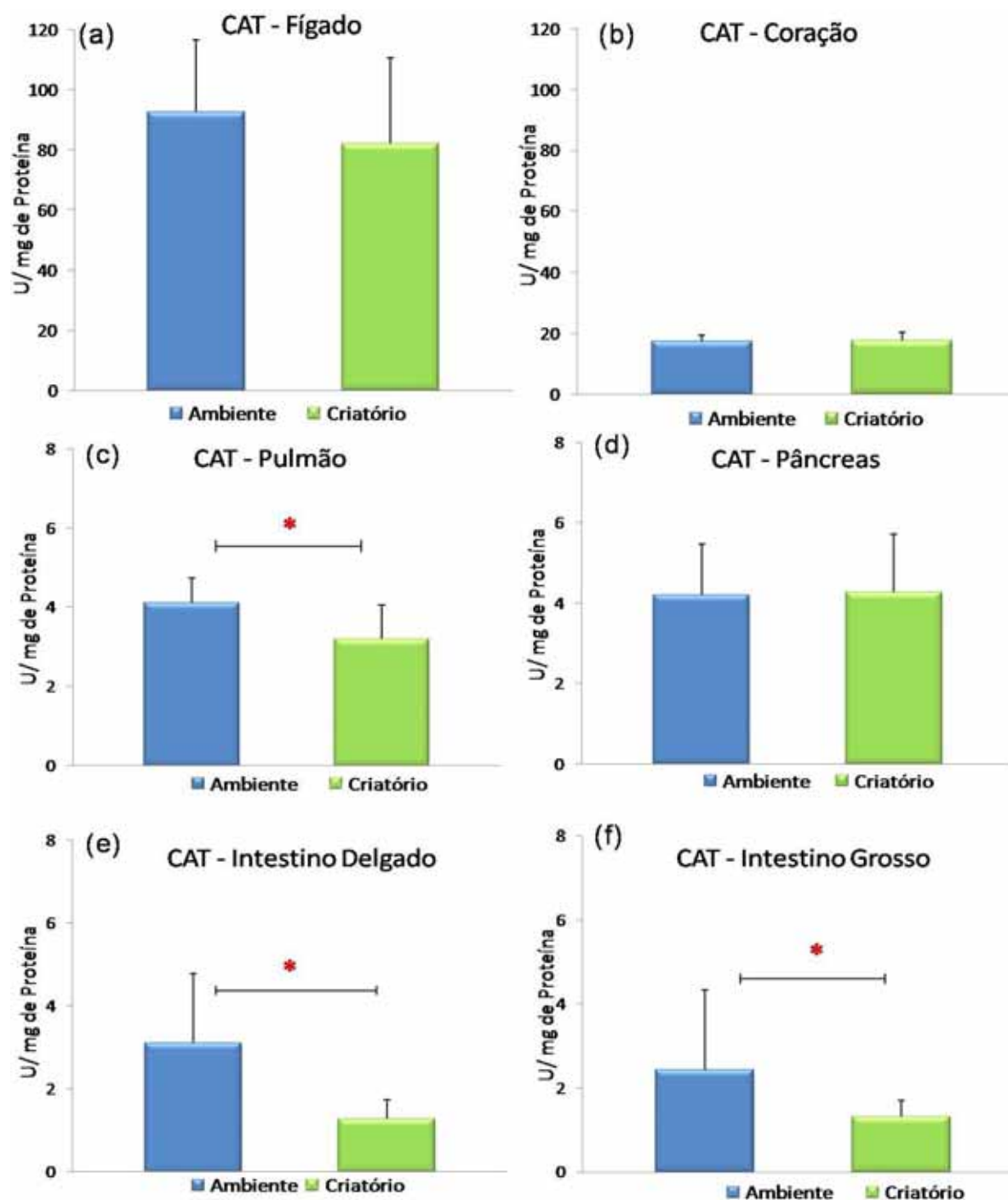


Figura 15. Atividade da catalase, em U/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Escala de 0 - 120 em (a) e (b); escala de 0 - 8 de (c) a (f). Comparação estatística entre ambiente e criatório: (a) $p= 0,387491$ ¹; (b) $p= 0,815282$ ¹; (c) $p= 0,016706$ ^{1*}; (d) $p= 0,906276$ ¹; (e) $p= 0,004107$ ^{2*}; (f) $p= 0,023343$ ^{2*}.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

• Avaliação da Glutathiona peroxidase (GPx)

Os valores da atividade da GPx diferiram significativamente entre os dois grupos nas amostras de fígado ($p=0,0431$), coração ($p=0,0126$), pulmão ($p=0,0006$), pâncreas ($p=0,0011$) e intestino grosso ($p=0,0191$), apresentando maiores valores para os animais de ambiente urbano em todos os casos.

A figura 16 apresenta os valores da atividade da GPx (em U/mg de proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado.

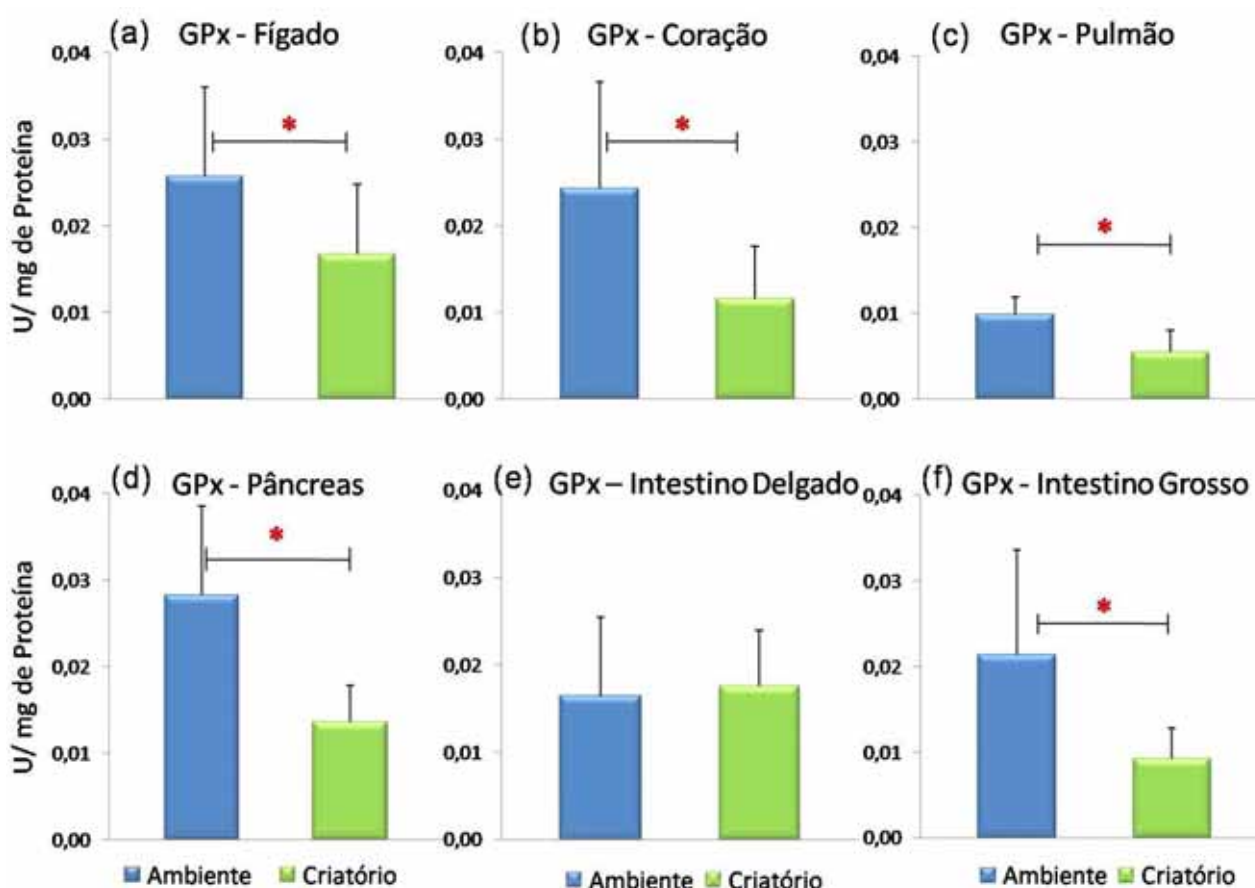


Figura 16. Atividade da GPx, em U/mg de proteína, das amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano ($n=10$) e criatório ($n=10$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p=0,043120$ ^{1*}; (b) $p=0,012612$ ^{2*}; (c) $p=0,000575$ ^{1*}; (d) $p=0,001091$ ^{2*}; (e) $p=0,730055$ ¹; (f) $p=0,019111$ ^{2*}.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

¹ Teste *t* Independente; ² Teste *Mann Whitney*.

Nas amostras de fígado, os animais de ambiente urbano apresentaram 54,17% mais atividade da GPx do que o grupo controle. A atividade desta enzima foi aumentada em 109,86% nas amostras de coração dos espécimes de ambiente em relação ao controle. Para o pulmão, a diferença na atividade da GPx entre os dois grupos foi 79,69%, no pâncreas esta diferença foi de 107,04%, enquanto no intestino grosso a atividade variou 56,84%.

- **Avaliação da Glutathione Redutase (GR)**

As análises da GR demonstraram aumento estatisticamente significativo nas atividades desta enzima para as amostras de intestino grosso dos animais de ambiente urbano quando comparados aos animais de criatório (grupo controle) ($p = 0,0211$). Porém, nas amostras de fígado, ocorreu redução significativa na atividade da GR para os animais de ambiente urbano em relação ao controle ($p = 0,0166$).

Em relação ao coração, pulmão, pâncreas e intestino delgado, não houve diferenças estatísticas nos valores de atividade da GR entre os animais destes dois grupos. Os valores médios e desvio-padrão da atividade da GR (em U/mg de proteína) de animais de ambiente urbano e criatório, assim como a comparação estatística entre estes dois grupos para cada tipo de órgão analisado estão representados na figura 17.

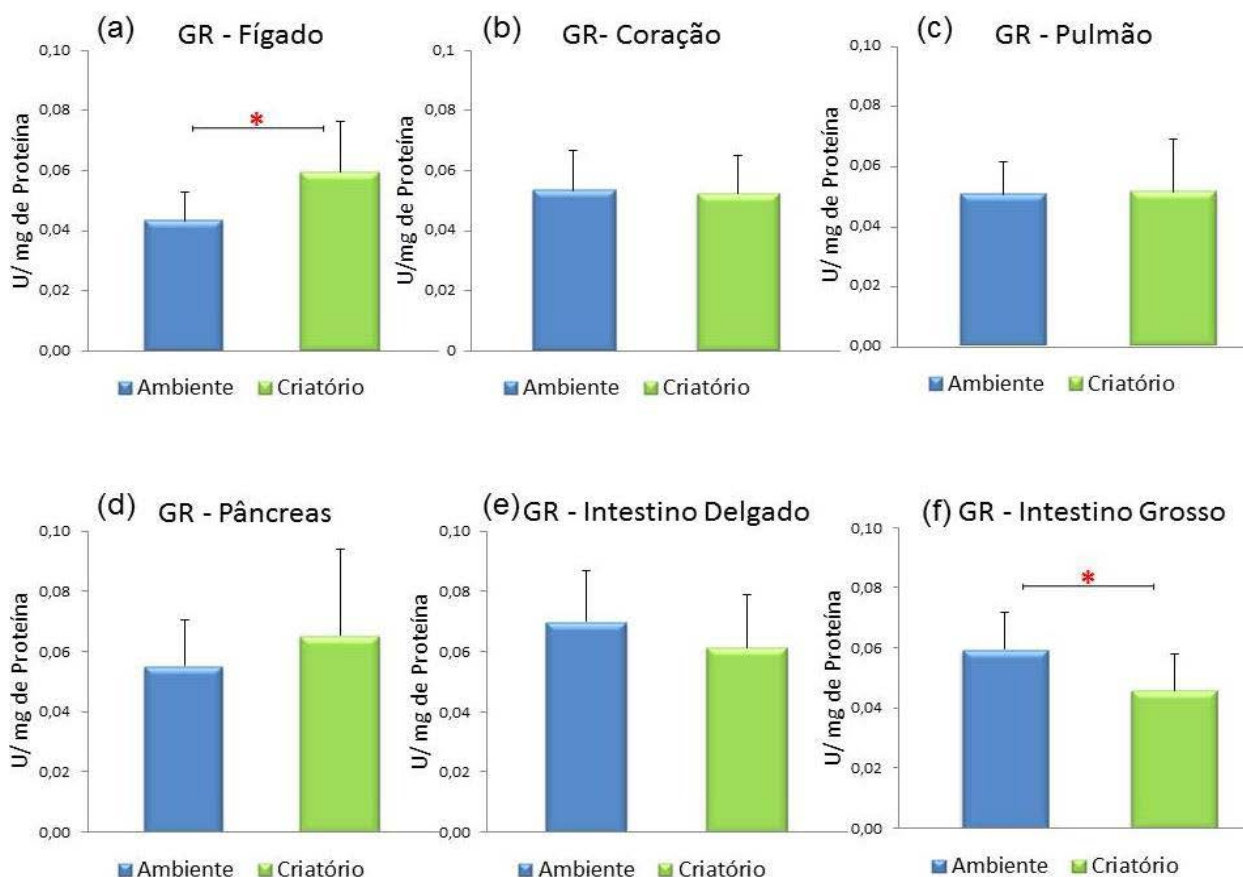


Figura 17. Atividade da GR, em U/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e criatório (n=10; controle). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre ambiente e criatório, realizadas pelo Teste *t* Independente: (a) $p = 0,016630^*$; (b) $p = 0,865243$; (c) $p = 0,908843$; (d) $p = 0,342537$; (e) $p = 0,290665$; (f) $p = 0,021102^*$.

* indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

• Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE foi analisada em amostras de fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso e ainda no encéfalo dos vinte animais. Somente para as amostras de pâncreas, ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima entre os animais dos dois grupos ($p = 0,0274$), com redução de 27,52% nos valores da atividade da AChE dos espécimes do córrego em relação ao controle.

Para os demais órgãos não ocorreu alterações estatisticamente significantes entre os valores da atividade da AChE de animais dos dois grupos, nem mesmo para o encéfalo, órgão mais representativo em relação à atividade das esterases, como pode ser visto na figura 18. Por este motivo, a atividade da AChE no encéfalo foi representada separadamente em escala maior que os demais órgãos.

A figura abaixo apresenta os valores médios e desvio-padrão da atividade da AChE (em U/mg de proteína) de animais de ambiente urbano e criatório, assim como os valores da comparação estatística entre estes dois grupos para cada um dos órgãos avaliados.

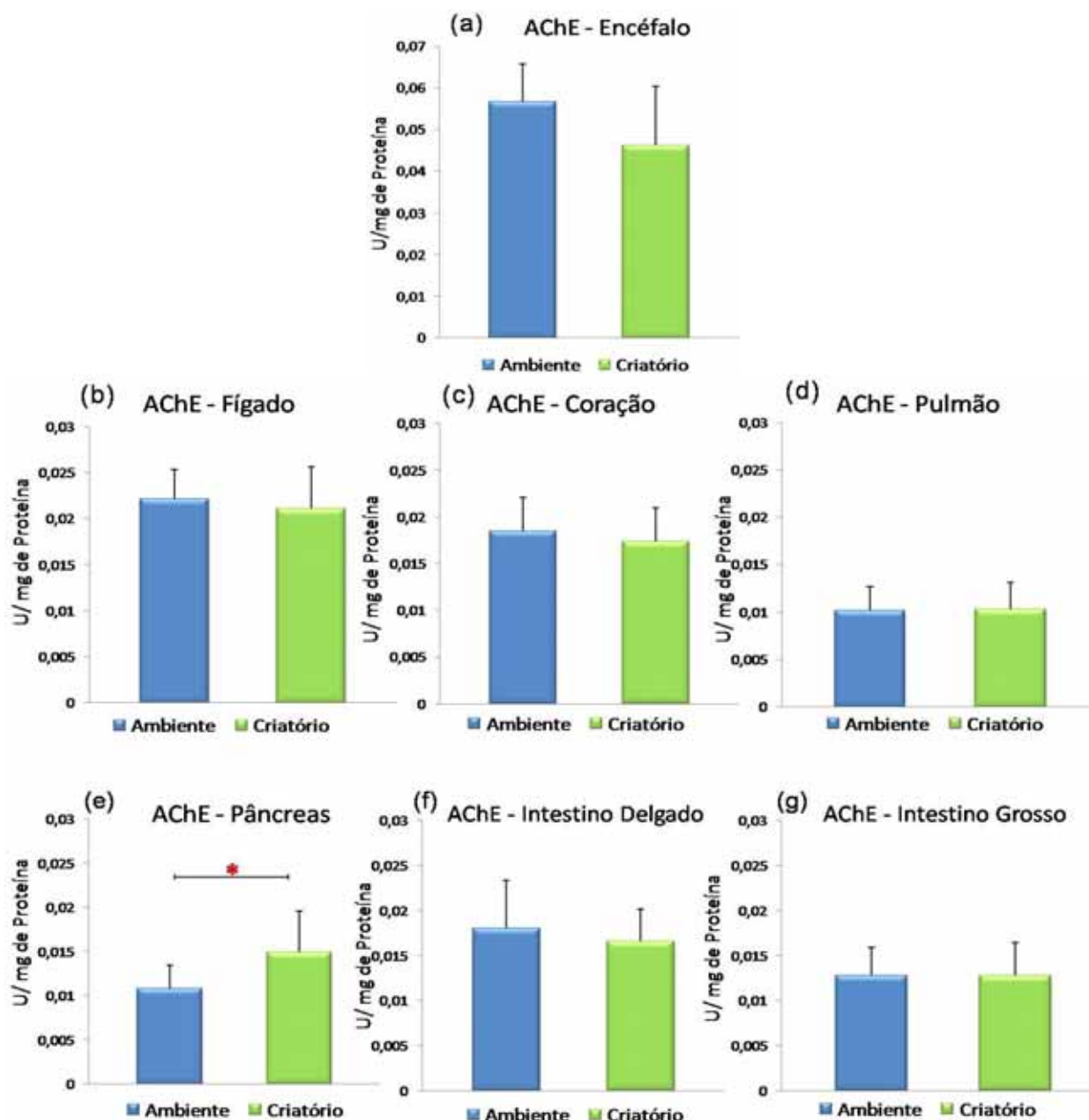


Figura 18. Atividade da AChE, em U/mg de proteína, das amostras de (a)-encéfalo, (b)-fígado, (c)-coração, (d)-pulmão, (e)-pâncreas, (f)-intestino delgado e (g)-intestino grosso de animais de ambiente urbano (n=10) e Criatório (n=10). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Escala de 0 – 0,07 em (a); escala de 0 – 0,03 de (b) a (g). Comparação estatística entre os grupos, realizada pelo Teste t Independente: (a) $p= 0,066294$; (b) $p= 0,560703$; (c) $p= 0,497179$; (d) $p= 0,896451$; (e) $p= 0,027409^*$; (f) $p= 0,512013$; (g) $p= 0,981958$.

* indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

4.2. ETAPA 2

4.2.1. Amostras e ensaios bioquímicos

Nesta segunda etapa do trabalho foram analisados os níveis de MDA e GSH, e as atividades enzimáticas das isoformas de CYP (EROD, BROD e PROD), GST, CAT, GPx e GR em amostras de fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso de espécimes de *Phrynops geoffroanus* expostos a diferentes concentrações de benzo[*a*]pireno.

Nas amostras sanguíneas destes mesmos animais avaliou-se a atividade enzimática da GGT (plasma) e a fragmentação do DNA pelo ensaio cometa.

4.2.2. Peroxidação lipídica

As análises revelaram que os níveis de MDA das amostras do fígado, pulmão, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso dos cágados expostos ao benzo[*a*]pireno por um período de 7 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($p > 0,05$).

As concentrações de MDA se alteraram apenas para o coração, com redução significativa do produto da peroxidação lipídica nos animais do grupo 2, submetidos a dose intermediária do composto (500 µg/kg), e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg) em relação ao controle ($p = 0,0131$). Os valores de MDA do coração dos animais do grupo 1 não foram alterados pelo tratamento.

A figura 19 apresenta os valores de MDA (em nmol/mg de tecido), expressos em média $\pm$ desvio-padrão, dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado.

Observa-se que o maior nível de lipoperoxidação desta etapa foi apresentado em fígado, pelos animais que receberam a dose intermediária de benzo[*a*]pireno (grupo 2: 500 µg/kg). Já os menores níveis de MDA foram apresentados em pulmão e intestino grosso dos animais do grupo controle.

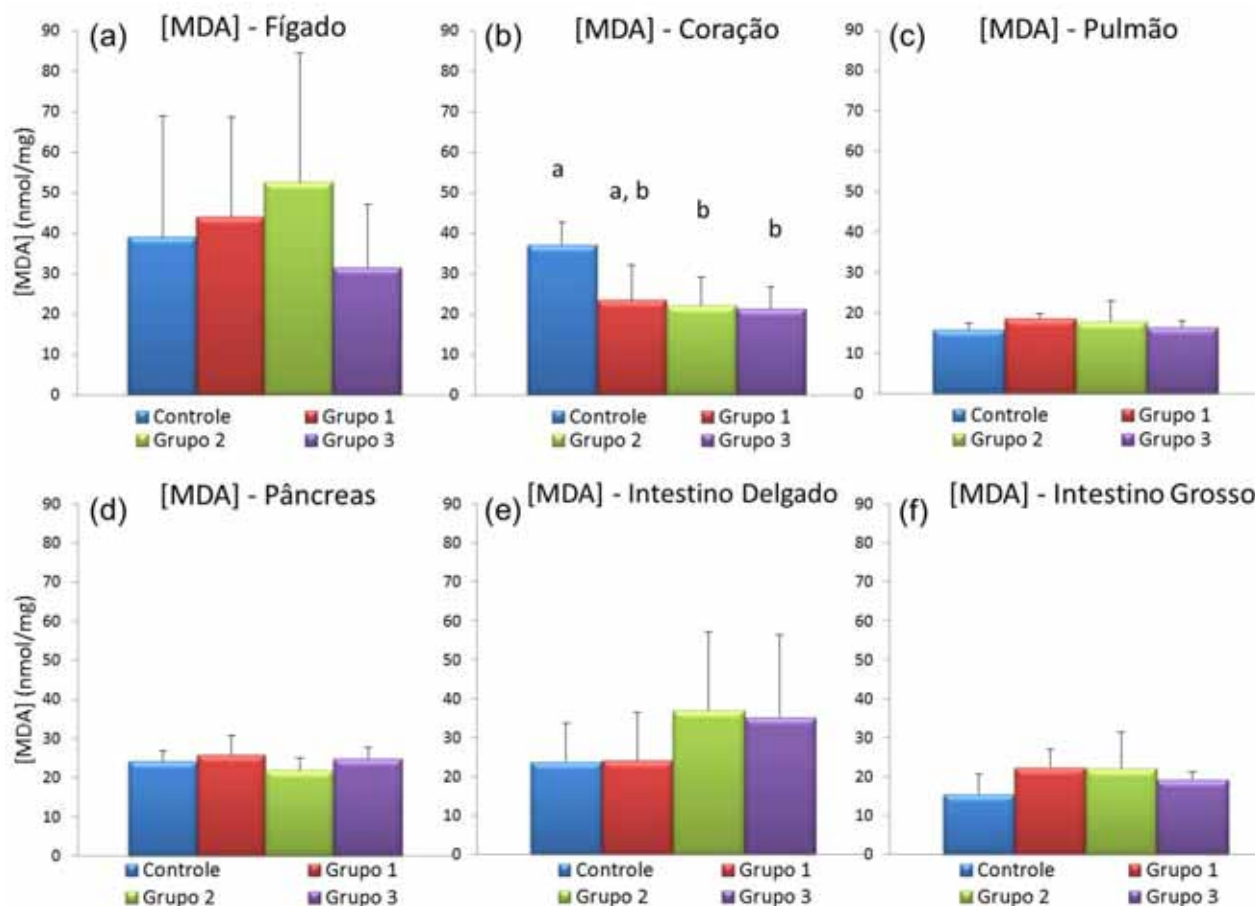


Figura 19. Concentração de MDA (nmol/mg de tecido) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose, 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação estatística entre os diferentes tratamentos com benzo[a]pireno, realizadas por *Kruskal-Wallis*: (a) $p = 0,5689$; (b) $p = 0,0131$; (c) $p = 0,1760$; (d) $p = 0,3846$; (e) $p = 0,3449$; (f) $p = 0,1392$.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.2.3. Análise da Glutathiona reduzida (GSH)

As análises demonstraram que as concentrações de GSH se alteraram para as amostras de fígado, com aumento significativo para os animais do grupo 2 (submetidos à dose intermediária do composto: 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg) em relação ao controle ($p = 0,0029$).

As concentrações de GSH dos grupos também se alteraram nas amostras de coração, porém com redução significativa dos valores do grupo 2 (dose de 500 µg/kg) em relação ao controle ($p = 0,0310$).

Os níveis de GSH do intestino delgado também diferiram entre os grupos, com aumento significativo nas concentrações de GSH do grupo 3 (dose de 1000 µg/kg) em relação ao controle

($p = 0,0470$). Em relação ao pulmão, pâncreas e intestino grosso, não houve diferenças estatísticas entre os valores da GSH dos quatro grupos do experimento.

A figura 20 apresenta os valores médios e desvio-padrão da GSH (em nmol/g de tecido), dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado.

Assim como na etapa 1, a figura reflete a variação nos valores de glutathione entre os diferentes órgãos pela representação da GSH em diferentes escalas. O maior valor de GSH desta etapa foi apresentado em fígado de animais que foram submetidos à dose intermediária de benzo[*a*]pireno; e o pulmão apresentou a menor concentração de GSH no nível basal (valor do grupo controle).

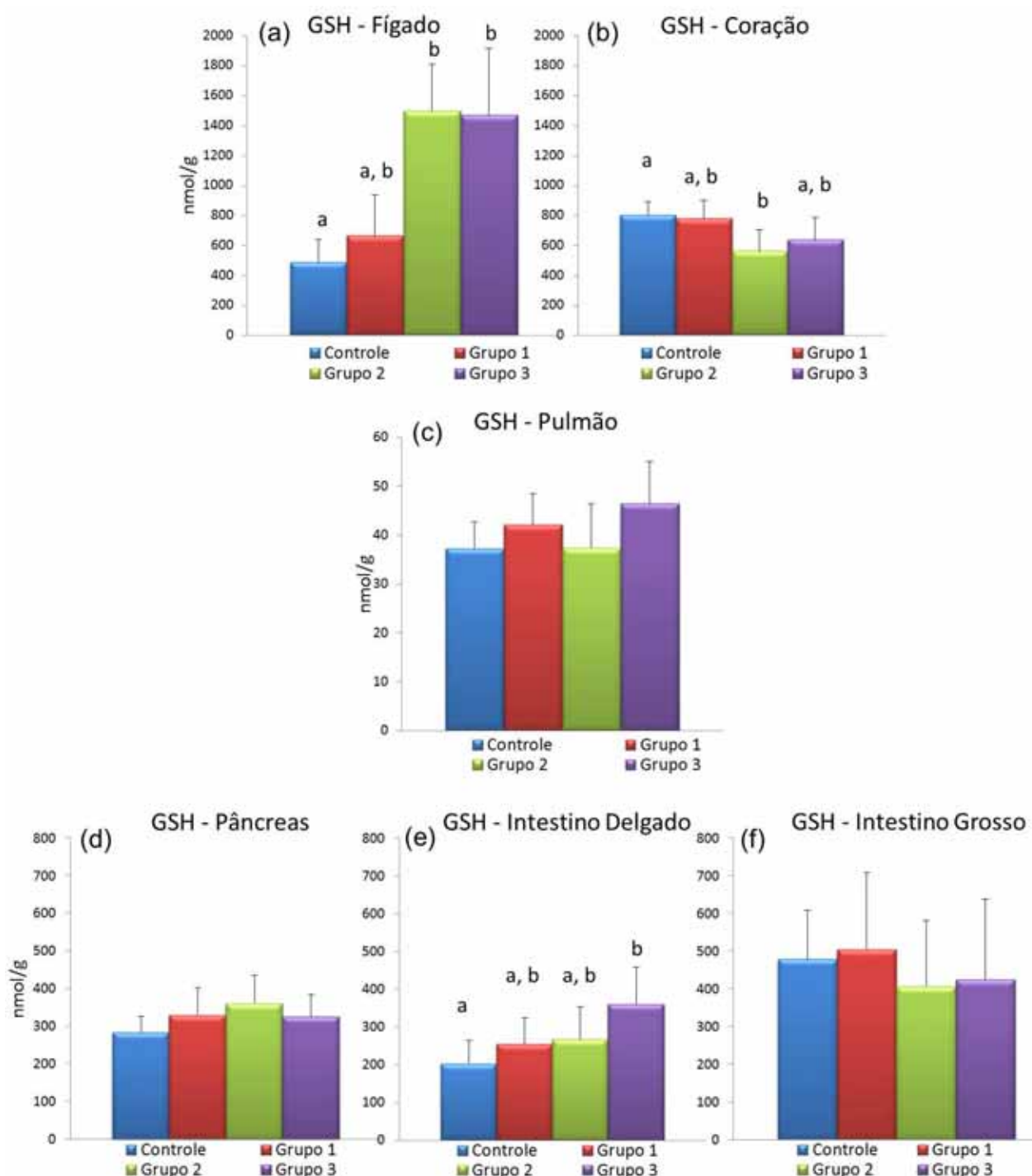


Figura 20. Concentração de GSH (nmol/g de tecido) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose, 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Escala de 0 - 2000 em (a) e (b); escala de 0 - 60 em (c); escala de 0 - 800 de (d) a (f). Comparação estatística entre os grupos: (a) p= 0,0029 - *Kruskal-Wallis*; (b) p= 0,030997; (c) p= 0,204716; (d) p= 0,313361; (e) p= 0,046991; (f) p= 0,812781 - ANOVA *One-Way*.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os grupos.

4.2.4. Ensaios Enzimáticos

- **Avaliação da EROD**

As análises da atividade da isoforma 7-etóxi-resorufina-O-deetilase (EROD) demonstraram alterações entre os grupos para amostras de fígado, pâncreas e intestino delgado, com indução da CYP1A nestes órgãos dos animais expostos às maiores doses de benzo[*a*]pireno. Nos outros órgãos, porém, o tratamento não afetou a atividade da EROD.

Para as amostras de fígado e intestino delgado, a atividade da EROD apresentou-se significativamente maior nas amostras dos cágados expostos à maior dose do contaminante (grupo 3) em relação ao controle ($p = 0,0395$ e $p = 0,0450$, respectivamente). Já no pâncreas, esta enzima apresentou atividade aumentada significativamente nos animais do grupo 2, que receberam a dose intermediária de benzo[*a*]pireno ($500 \mu\text{g/kg}$) em relação ao controle ($p = 0,0429$).

Os valores da atividade da EROD (em pmol resorufina/min/mg proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 21.

O maior valor de EROD desta etapa foi apresentado em fígado de animais que foram submetidos à maior dose de benzo[*a*]pireno; e o pâncreas apresentou a menor atividade da EROD no nível basal (valor do grupo controle).

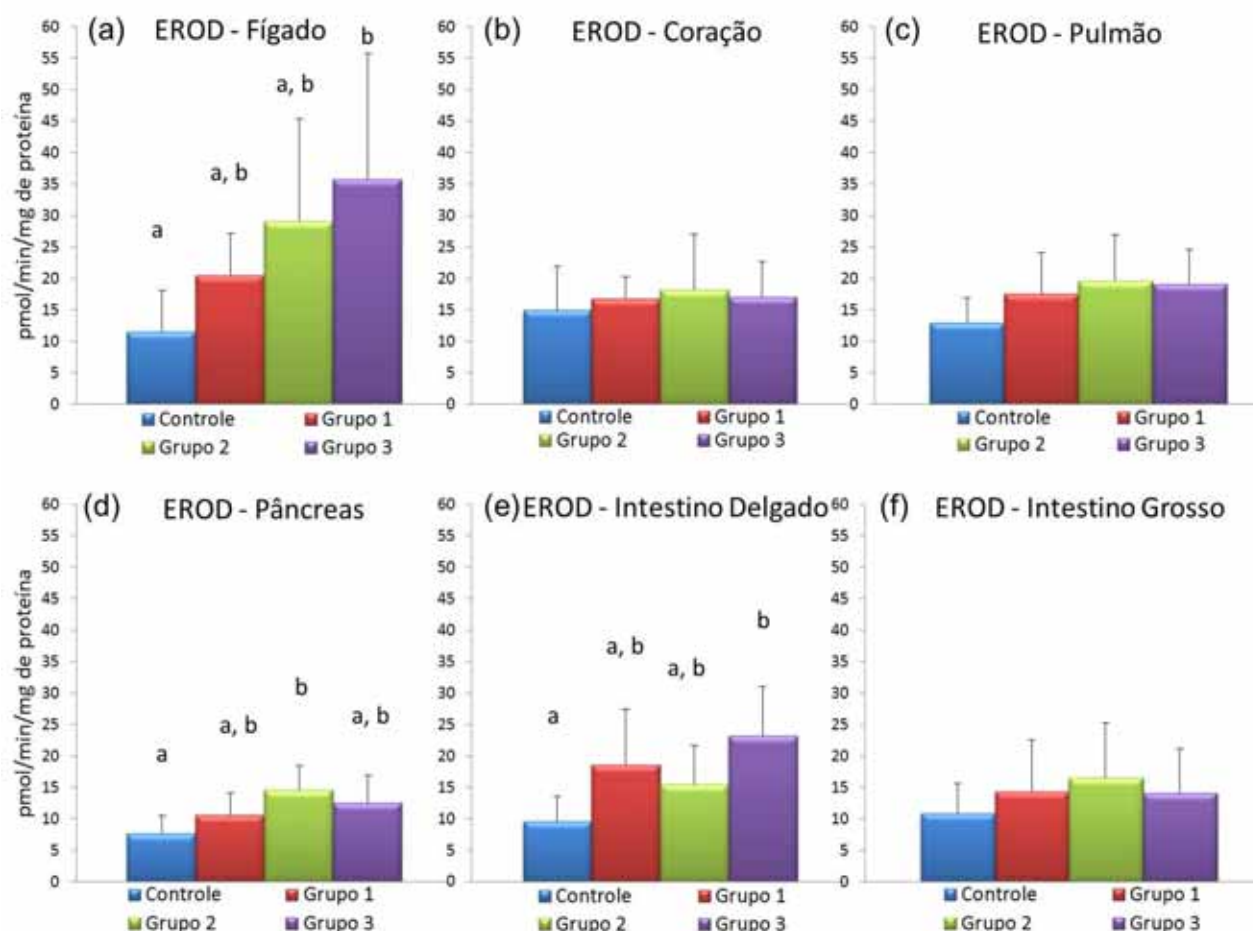


Figura 21. Atividade da EROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação estatística entre os diferentes tratamentos com benzo[a]pireno: (a) $p = 0,0395$ ²; (b) $p = 0,8399$ ²; (c) $p = 0,305116$ ¹; (d) $p = 0,042895$ ¹; (e) $p = 0,044977$ ¹; (f) $p = 0,6529$ ².

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

• Avaliação da BROD

As análises da isoforma 7-benzilóxi-resorufina-O-debenzilase (BROD) demonstraram aumento estatisticamente significativo nas atividades desta enzima para as amostras de fígado dos animais do grupo 1 (que receberam a menor dose de benzo[a]pireno) em relação ao controle ($p = 0,0452$). No pâncreas, esta enzima apresentou atividade significativamente maior nas amostras dos animais do grupo 3 (submetidos à maior dose de benzo[a]pireno) em relação ao controle ($p = 0,0109$).

Para as amostras de intestino delgado, também ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima, com aumento dos valores do grupo 2 (submetidos à dose intermediária do

composto) em relação ao controle ($p = 0,0473$). Nos demais órgãos, não houve alterações estatisticamente significantes nos valores da BROD entre os grupos.

A figura 22 apresenta os valores médios e desvio-padrão da atividade da BROD (em pmol resorufina/min/mg proteína) dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado.

Observa-se que o maior valor de BROD foi apresentado no intestino delgado dos animais que receberam a dose intermediária de benzo[a]pireno (grupo 2), com atividade de BROD bem próxima à média do fígado dos animais do grupo 1. Já o pâncreas apresentou a menor atividade da BROD no nível basal (valor do grupo controle).

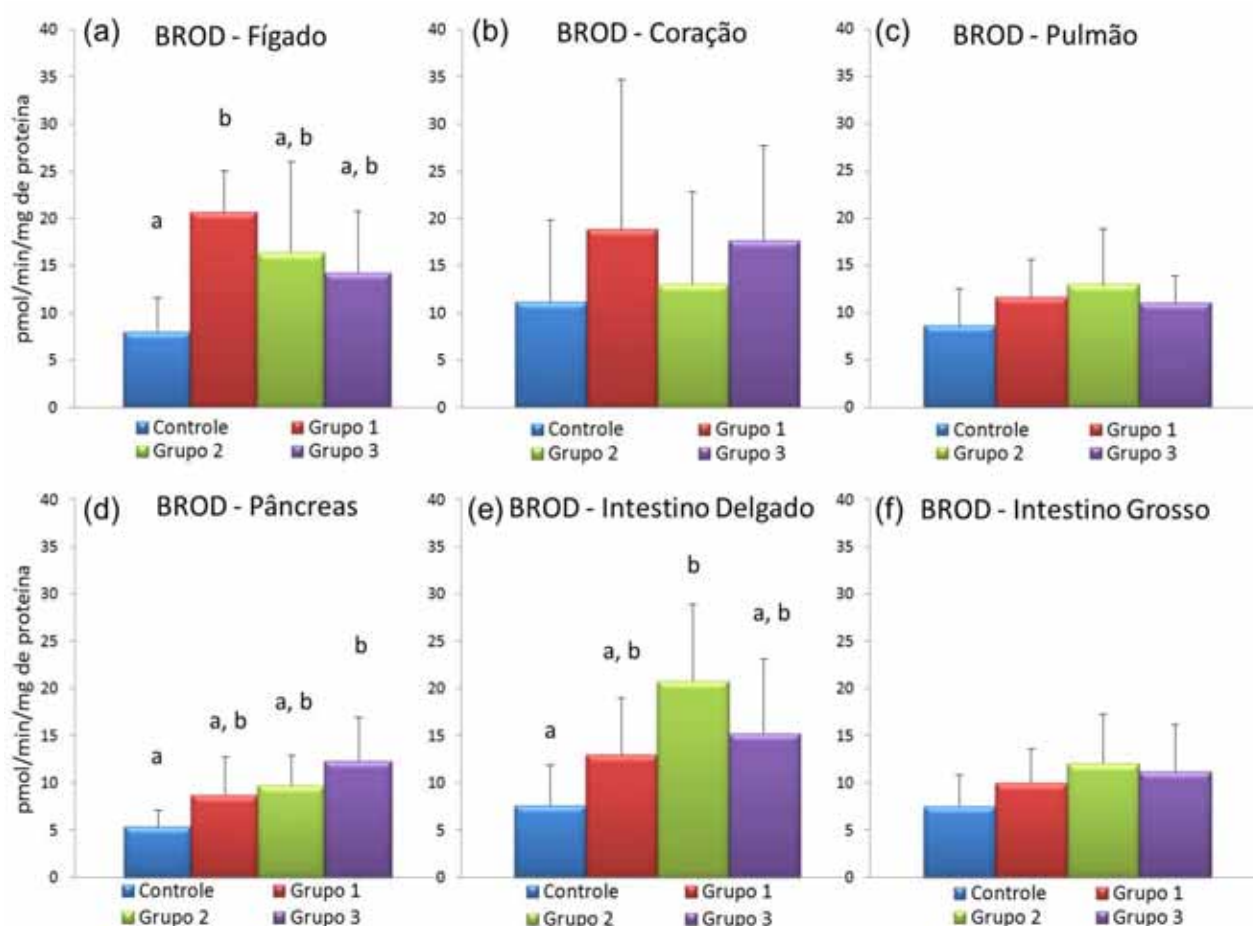


Figura 22. Atividade da BROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos ($n = 5$): controle, grupo 1 (dose de 100 μg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 μg /kg) e grupo 3 (dose de 1000 μg /kg). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,045206$ ¹; (b) $p = 0,676546$ ¹; (c) $p = 0,479954$ ¹; (d) $p = 0,0109$ ²; (e) $p = 0,047276$ ¹; (f) $p = 0,405474$ ¹.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

- **Avaliação da PROD**

As análises da terceira enzima de detoxificação de fase I avaliada neste estudo, a isoforma 7-pentóxi-resorufina-*O*-depentilase (PROD), demonstraram aumento estatisticamente significativo nas atividades desta enzima para as amostras de coração dos animais do grupo 3 (maior dose) em relação ao controle ($p = 0,0474$).

Verificou-se também alteração na atividade da PROD para o pâncreas, com aumento significativo dos valores do grupo 2 em relação ao controle ($p = 0,0264$). Nos demais órgãos, não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos.

Os valores médios e desvio-padrão da atividade da PROD (em pmol resorufina/min/mg proteína) dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 23.

O maior valor de PROD desta etapa foi apresentado em coração de animais que foram submetidos à maior dose de benzo[*a*]pireno. Novamente, o pâncreas apresentou a menor atividade da enzima no nível basal (valor do grupo controle).

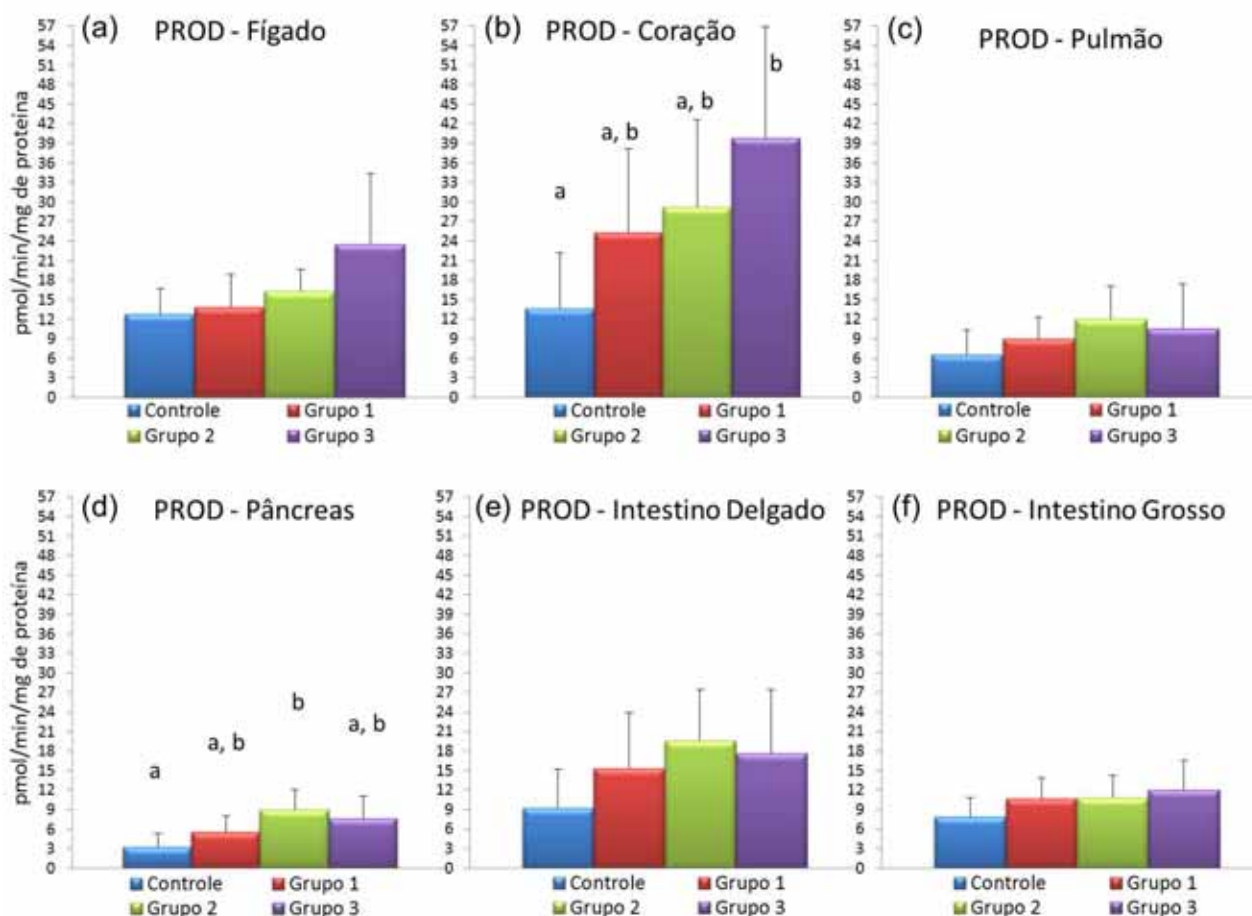


Figura 23. Atividade da PROD, em pmol/min/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação estatística entre os diferentes tratamentos com benzo[a]pireno: (a) p= 0,2839 - *Kruskal-Wallis*; (b) p= 0,047416; (c) p= 0,380596; (d) p= 0,026421; (e) p= 0,245349; (f) p= 0,334263 - *ANOVA One-Way*.
^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os grupos.

• Avaliação da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada em amostras de fígado, coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso dos animais dos quatro grupos. No fígado, a atividade da GST não se alterou em nenhum dos grupos expostos ao benzo[a]pireno. Já para as amostras de coração e pulmão, esta enzima apresentou atividade aumentada significativamente nos animais do grupo 2, que receberam a dose intermediária de benzo[a]pireno (500 µg/kg) em relação ao controle (p = 0,0465 e p = 0,0302, respectivamente).

As análises também demonstraram alteração na atividade da GST para o pâncreas, com aumento significativo dos valores do grupo 3, expostos a dose maior do contaminante, em relação ao controle (p = 0,0171). No intestino delgado, esta enzima apresentou atividade

significativamente maior nas amostras dos cágados expostos à maior dose do contaminante (grupo 3) quando comparado aos demais grupos (controle, grupo 1 e 2) ($p = 0,0012$).

Por fim, a GST mostrou atividade aumentada significativamente para as amostras de intestino grosso dos animais do grupo 3, em relação ao controle, e, quando comparados aos animais do grupo 1 (expostos a dose menor de benzo[a]pireno) ($p = 0,0004$).

A figura 24 apresenta os valores médios, desvio-padrão e comparações estatísticas da atividade da GST (em U/mg de proteína) dos animais dos quatro grupos para cada órgão analisado. Observa-se que os valores da atividade da GST no fígado são mais altos que dos demais órgãos, apresentando o maior valor para as amostras dos animais do grupo 2. A menor atividade foi verificada no pulmão dos animais do controle.

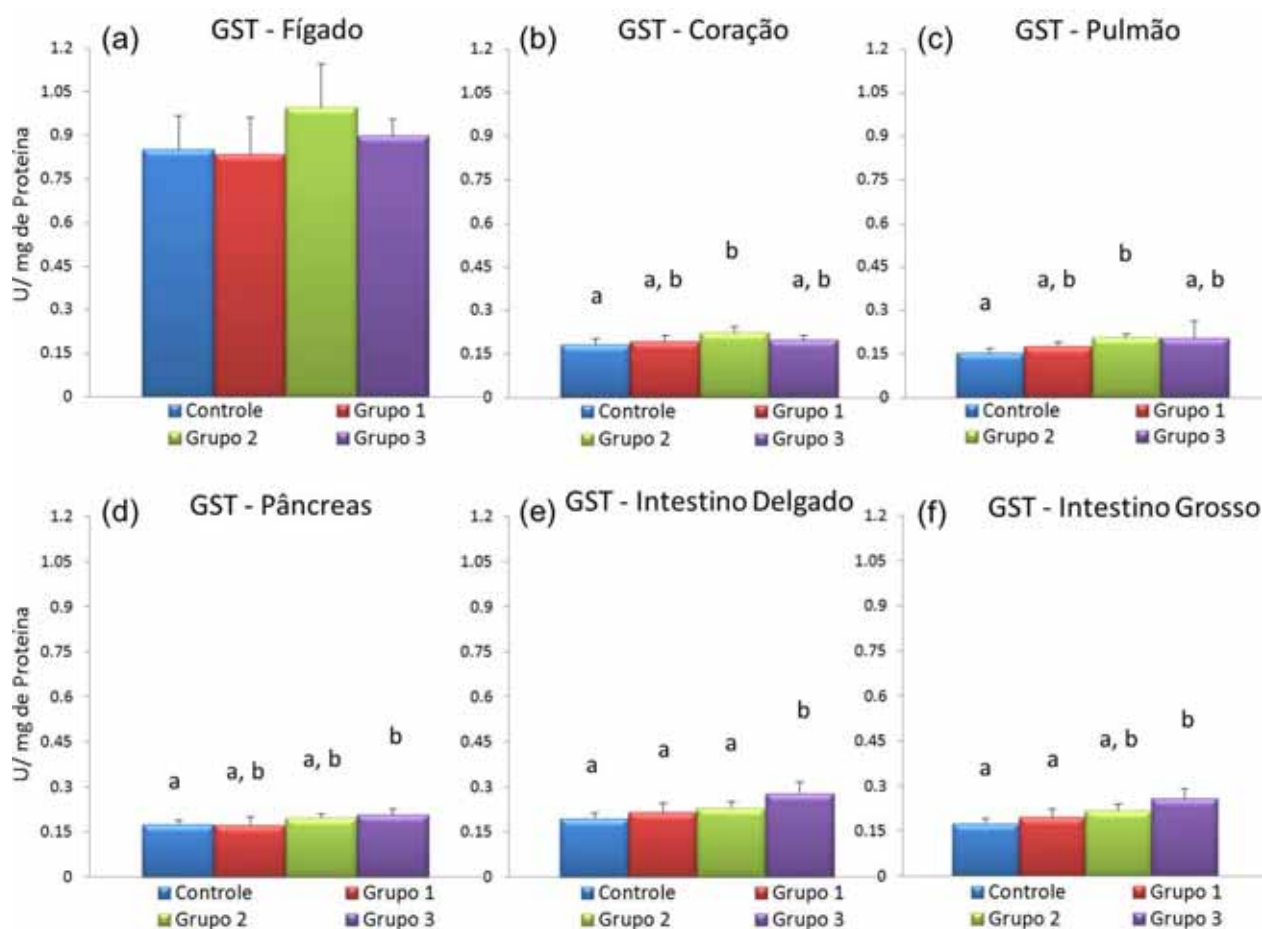


Figura 24. Atividade da GST (U/mg de proteína) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos ($n = 5$): controle, grupo 1 (recebeu a menor dose de benzo[a]pireno, 100 $\mu\text{g/kg}$), grupo 2 (dose de 500 $\mu\text{g/kg}$) e grupo 3 (dose de 1000 $\mu\text{g/kg}$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,165952$ ¹; (b) $p = 0,046554$ ¹; (c) $p = 0,0302$ ²; (d) $p = 0,0171$ ²; (e) $p = 0,001168$ ¹; (f) $p = 0,000385$ ¹.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

- **Análise da Catalase (CAT)**

As análises revelaram diferença significativa na atividade da CAT das amostras de pâncreas entre os animais do grupo 1 (submetidos a dose de 100 μg de benzo[*a*]pireno/kg) e grupo 3 (dose de 1000 $\mu\text{g/kg}$), com maior atividade para o grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p = 0,0440$).

Para as amostras de intestino delgado, também ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima, com aumento dos valores do grupo 3 em relação ao controle ($p = 0,0415$). Os valores desta enzima não diferiram estatisticamente entre os grupos para as amostras de fígado, coração, pulmão e intestino grosso.

Os valores da atividade da catalase (em U/mg de proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre os diferentes tratamentos com benzo[*a*]pireno para cada tipo de órgão analisado estão representados na Figura 25.

A diferença de escala na figura entre o fígado e os demais órgãos reflete a grande variação nos valores da atividade da CAT entre eles. Apesar dos valores da atividade de CAT em fígado nesta etapa não terem muita alteração, o maior valor foi apresentado no grupo 2. Já o intestino grosso apresentou a menor atividade da enzima no nível basal (valor do grupo controle).

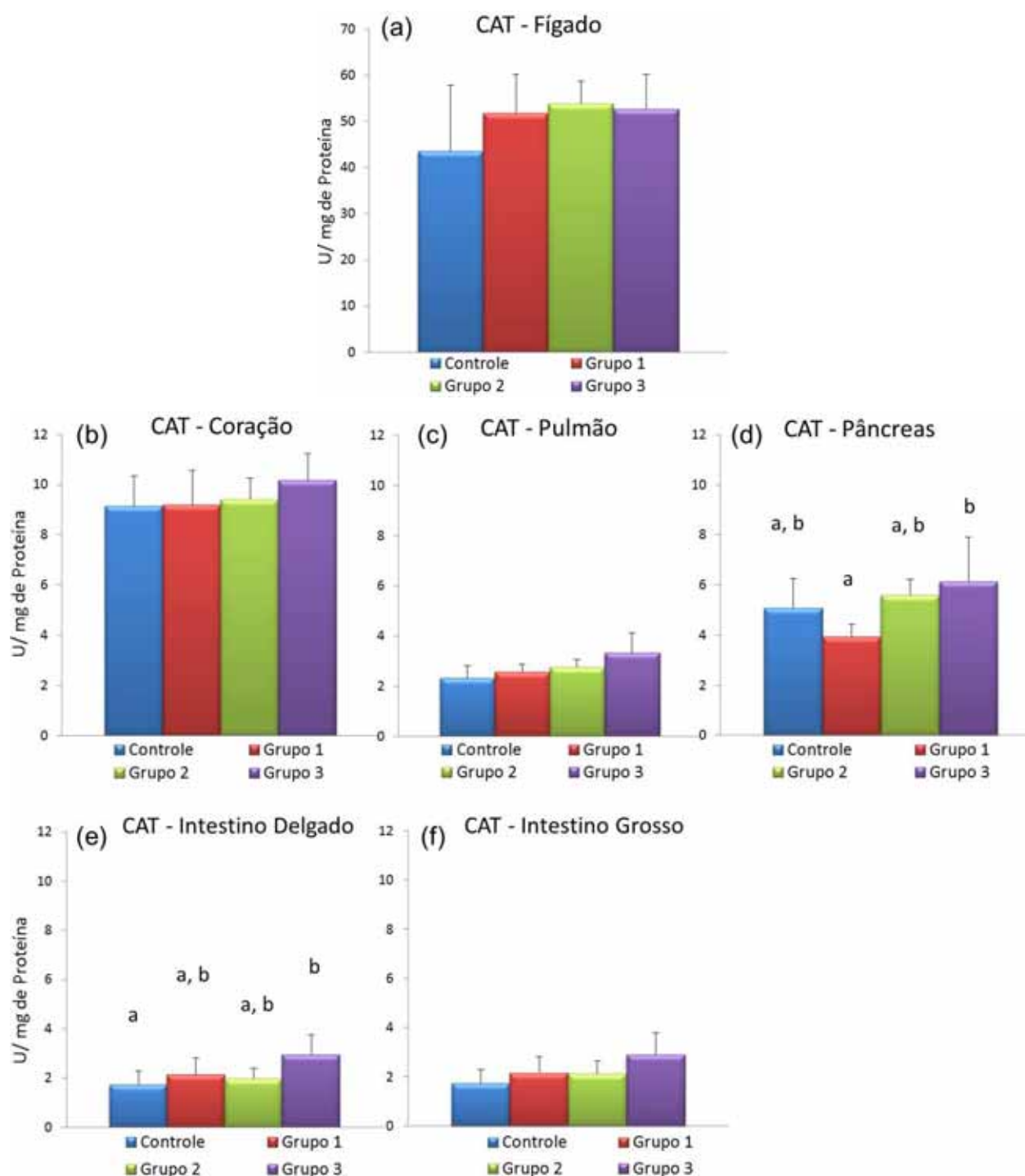


Figura 25. Atividade da catalase, em U/mg de proteína, em amostras de **(a)**-fígado, **(b)**-coração, **(c)**-pulmão, **(d)**-pâncreas, **(e)**-intestino delgado e **(f)**-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (dose de 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg de benzo[a]pireno/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Escala de 0 – 70 em **(a)**; escala de 0 – 12 de **(b)** a **(f)**. Comparação estatística entre os grupos: **(a)** p= 0,329697 ¹; **(b)** p= 0,46061¹; **(c)** p= 0,1958 ²; **(d)** p= 0,04401504 ¹; **(e)** p= 0,041473 ¹; **(f)** p= 0,081391 ¹.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

- **Avaliação da Glutathione peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx nas amostras de coração aumentou significativamente nos animais do grupo 2, que receberam a dose intermediária de benzo[*a*]pireno (500 µg/ kg) em relação ao controle ($p = 0,0171$).

As análises da GPx também demonstraram aumento estatisticamente significativo nas atividades desta enzima para as amostras de pulmão dos animais do grupo 2 e grupo 3 (maior dose) em relação ao controle. Ainda nas amostras de pulmão, houve diferença significativa na atividade desta enzima entre os animais do grupo 1 (que receberam a menor dose de benzo[*a*]pireno) e grupo 3, com maior atividade para o grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p = 0,0003$).

Verificou-se também alteração na atividade da GPx para o pâncreas, com aumento significativo dos valores do grupo 2 e grupo 3 em relação ao controle ($p = 0,0111$). No intestino grosso, esta enzima apresentou atividade significativamente maior nas amostras dos cães expostos à maior dose do contaminante (grupo 3) em relação ao controle ($p = 0,0284$).

Já para as amostras de fígado e intestino delgado, não ocorreu diferenças estatísticas nos valores de atividade da GPx entre os grupos analisados. A figura 26 apresenta os valores da atividade da GPx (em U/mg de proteína), em média $\pm$ desvio-padrão, dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre eles para cada tipo de órgão analisado.

O maior valor da GPx desta etapa foi apresentado em pâncreas de animais que foram submetidos à dose intermediária de benzo[*a*]pireno, enquanto o pulmão apresentou a menor atividade da GPx no nível basal (valor do grupo controle).

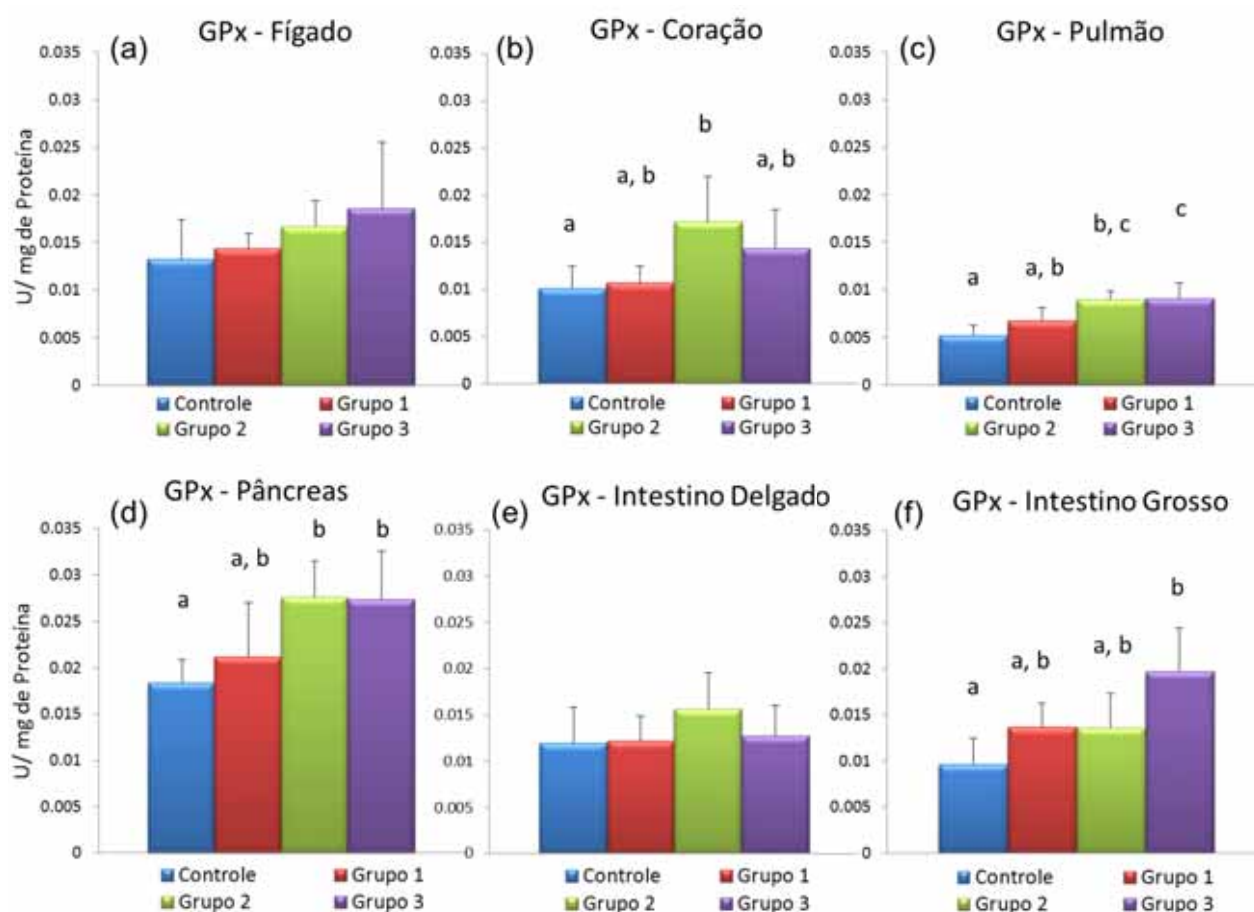


Figura 26. Atividade da GPx (U/mg de proteína) em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos (n = 5): controle, grupo 1 (menor dose de benzo[a]pireno, 100 µg/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,3294$ ²; (b) $p = 0,0171$ ²; (c) $p = 0,000343$ ¹; (d) $p = 0,011094$ ¹; (e) $p = 0,330151$ ¹; (f) $p = 0,0284$ ².

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

• Avaliação da Glutathiona Redutase (GR)

As análises da GR demonstraram aumento estatisticamente significativo nas atividades desta enzima para as amostras de pâncreas dos animais do grupo 2 (submetidos à dose intermediária de benzo[a]pireno) e grupo 3 (maior dose) em relação ao controle. Ainda nas amostras de pâncreas, ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima entre os animais do grupo 1 (que receberam a menor dose de benzo[a]pireno) e grupo 3, com maior atividade para o grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p = 0,0047$).

No intestino delgado, esta enzima apresentou atividade significativamente maior nas amostras dos cágados do grupo 1 e grupo 3 em relação ao controle ($p = 0,0023$). Para as amostras

de intestino grosso, também ocorreu diferença significativa na atividade desta enzima, com aumento dos valores do grupo 3 em relação ao controle ($p = 0,0031$).

Em relação ao fígado, coração e pulmão, não houve diferenças estatísticas nos valores de atividade da GR entre os grupos analisados. Os valores médios e desvio-padrão da atividade da GR (em U/mg de proteína) dos animais dos quatro grupos, assim como a comparação estatística entre os diferentes tratamentos com benzo[a]pireno para cada órgão avaliado estão representados na Figura 27.

Observa-se que o maior valor da atividade da GR do experimento foi apresentado no pâncreas dos animais do grupo 3. Já o coração apresentou a menor atividade da GR no nível basal (valor do grupo controle).

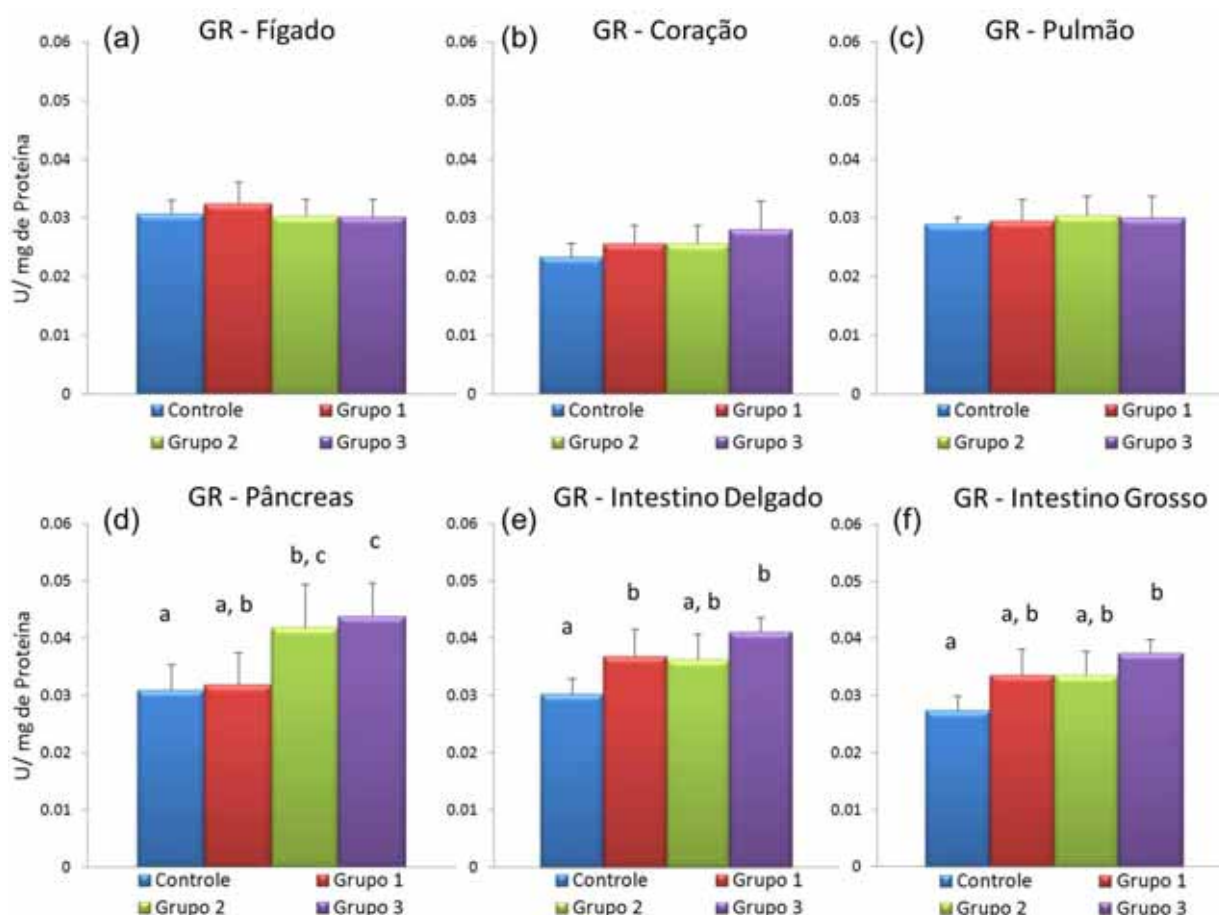


Figura 27. Atividade da GR, em U/mg de proteína, em amostras de (a)-fígado, (b)-coração, (c)-pulmão, (d)-pâncreas, (e)-intestino delgado e (f)-intestino grosso de animais de quatro grupos ($n = 5$): controle, grupo 1 (dose de 100 $\mu\text{g/kg}$), grupo 2 (dose de 500 $\mu\text{g/kg}$) e grupo 3 (dose de 1000 μg de benzo[a]pireno/kg). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos: (a) $p = 0,60601$ ¹; (b) $p = 0,221568$ ¹; (c) $p = 0,9042$ ²; (d) $p = 0,004745$ ¹; (e) $p = 0,002286$ ¹; (f) $p = 0,003142$ ¹.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

¹ ANOVA One-Way; ² Kruskal-Wallis.

- **Atividade enzimática Gama Glutamil Transferase**

Os valores da atividade da GGT no plasma diferiram entre os grupos, com aumento significativo e dose-dependente nas atividades desta enzima nos grupos tratados com as doses de 500 µg/kg (grupo 2) e 1000 µg de benzo[a]pireno/kg (grupo 3), em comparação ao grupo controle ($p = 0,0020$). O grupo exposto à dose de 100 µg/kg (grupo 1) não apresentou diferenças estatísticas na atividade desta enzima em relação aos demais grupos (Figura 28).

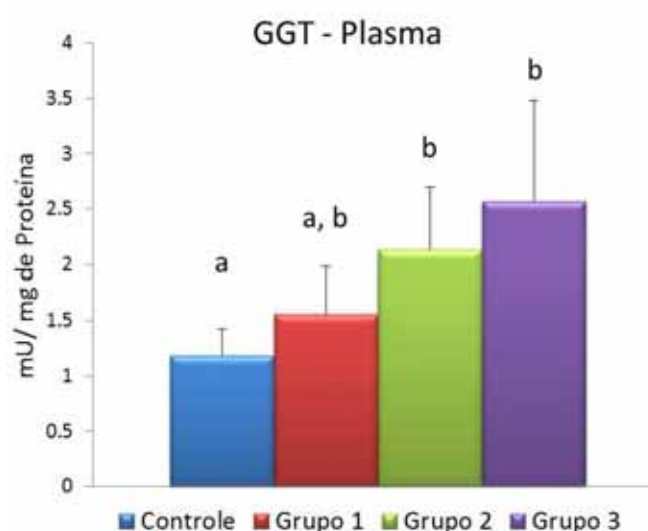


Figura 28. Atividade da GGT (mU/mg de proteína) das amostras de plasma de quatro grupos ($n = 5$): controle, grupo 1 (dose de 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação estatística entre os grupos, realizada por ANOVA One-Way: $p = 0,001997$.

^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.2.5. Ensaio Cometa

Os resultados obtidos com a análise do ensaio cometa demonstraram a influência do benzo[a]pireno sobre o organismo, com aumento significativo e dose-dependente de danos ao DNA nos grupos tratados com as doses de 500 µg/kg e 1000 µg/kg (grupos 2 e 3) em relação ao grupo controle e ao grupo 1. Este, tratado com 100 µg/kg, não diferiu estatisticamente do controle na quantidade de danos no DNA (soma de danos de classes 1, 2 e 3) observado pelo ensaio cometa.

A análise do ensaio cometa mostrou uma formação de nucleóides com cauda de danos 1, 2 ou 3, na maioria das células dos indivíduos dos grupos 2 e 3 e número reduzido de cometas para as células dos espécimes do controle.

Verificou-se de acordo com a distribuição dos danos entre as classes de cometa para cada concentração de benzo[a]pireno, e o scores dos grupos, que o grupo controle mostrou frequências de nucleóides com danos e sem danos de 33% e 67%, respectivamente. No grupo 1, a frequência de nucleóides com danos foi de 56,6% e nucleóides sem danos de 43,4%. Para o grupo 2, a frequência encontrada de nucleóides com danos foi de 94,2% e de nucleóides sem danos foi de 5,8%. Por fim, para o grupo 3, a frequência de nucleóides com danos foi de 92,8% e de nucleóides sem danos de 7,2% (Tabela 2).

Os scores médios de danos obtidos para os eritrócitos de *Phrynosops geoffroanus* dos diferentes grupos tratados com benzo[a]pireno foram de 39 (controle), 67,2 (grupo 1), 146,8 (grupo 2) e 172,8 (grupo 3) (Tabela 2 e Figura 29).

Houve diferença significativa para classe zero dos grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle, com $p= 0,0019$ (*Kruskal-Wallis*). Para a classe 1 não ocorreu nenhuma diferença significativa entre os grupos. Para a classe 2, os grupos 2 e 3 apresentaram valores significativamente maiores em relação ao controle ($p= 0,0022$ - *Kruskal-Wallis*). O grupo 3 apresentou aumento significativo de nucleóides de classe 3 em relação ao controle e quando comparado ao grupo 1 ($p= 0,0011$ - *Kruskal-Wallis*).

Observou-se aumento significativo dos scores para os grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle e também quando comparados ao grupo 1, sendo $p= 0,000001$ (Figura 29).

Os valores das contagens realizadas nos animais dos quatro grupos são apresentados na Tabela 2, representados pela contagem de 100 células para cada espécime, distribuídos segundo as classes do cometa, além do total de danos e scores dos grupos.

TABELA 2. Valores do ensaio Cometa para danos classe zero, classe 1, classe 2 e classe 3, além do total de danos e scores dos grupos controle, 1, 2 e 3 de *Phrynos geoffroanus* (Pg)

Grupos	Total de núcleos analisados	Total com Cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Scores
Controle							
Pg 1	100	28	72	24	4	0	32
Pg 2	100	45	55	36	9	0	54
Pg 3	100	54	46	45	7	2	65
Pg 4	100	14	86	11	3	0	17
Pg 5	100	24	76	21	3	0	27
Total	500	165	335	137	26	2	MED= 39
Grupo 1							
Pg 10	100	30	70	26	4	0	34
Pg 13	100	66	34	45	19	2	89
Pg 15	100	79	21	68	11	0	90
Pg 16	100	56	44	44	10	2	70
Pg 20	100	52	48	51	1	0	53
Total	500	283	217	234	45	4	MED= 67,2
Grupo 2							
Pg 10	100	91	9	31	51	9	160
Pg 13	100	93	7	67	23	3	122
Pg 15	100	90	10	62	23	5	123
Pg 16	100	98	2	55	29	14	155
Pg 20	100	99	1	39	45	15	174
Total	500	471	29	254	171	46	MED= 146,8
Grupo 3							
Pg 8	100	76	24	47	21	8	113
Pg 14	100	99	1	20	43	36	214
Pg 17	100	96	4	39	38	19	172
Pg 19	100	97	3	34	37	26	186
Pg 22	100	96	4	30	49	17	179
Total	500	464	36	170	188	106	MED= 172,8

Nesta primeira etapa, a análise dos níveis de MDA e da atividade de GPx foram os biomarcadores que se alteraram em mais tipos de órgãos (cinco dos seis analisados) e o pâncreas foi o órgão mais sensível aos poluentes da contaminação urbana e industrial difusa presente no córrego, apresentando alterações em grande parte dos biomarcadores avaliados.

Tabela 4. Alterações verificadas nos órgãos dos cães da Etapa 2: grupo 1 (dose de 100 µg de benzo[a]pireno/kg), grupo 2 (dose de 500 µg/kg) e grupo 3 (dose de 1000 µg/kg), em comparação com os dados do grupo controle.

GRUPO	ÓRGÃO	BIOMARCADORES								
		MDA	GSH	EROD	BROD	PROD	GST	CAT	GPx	GR
Grupo 1	Fígado				↑					
	Coração									
	Pulmão									
	Pâncreas									
	Int. Delgado									↑
	Int. Grosso									
Grupo 2	Fígado		↑							
	Coração	↓	↓				↑		↑	
	Pulmão						↑		↑	
	Pâncreas			↑		↑			↑	↑
	Int. Delgado				↑					
	Int. Grosso									
Grupo 3	Fígado		↑	↑						
	Coração	↓				↑				
	Pulmão								↑ [#]	
	Pâncreas				↑		↑	*↑	↑	↑ [#]
	Int. Delgado		↑	↑			↑ ⁺	↑		↑
	Int. Grosso						↑ [#]		↑	↑

+ atividade significativamente maior quando comparado aos demais grupos (controle, grupo 1 e 2).

atividade aumentada significativamente em relação ao controle e ao grupo 1.

* maior atividade para o grupo 3 em relação ao grupo 1.

Tabela 5. Alterações na GGT e Ensaio cometa dos animais da Etapa 2 em relação ao controle.

	GGT	Ensaio Cometa
Grupo 1		
Grupo 2	↑	↑ [#]
Grupo 3	↑	↑ [#]

atividade aumentada significativamente em relação ao controle e ao grupo 1.

Novamente, a GPx foi o biomarcador que mostrou a maior quantidade de alterações no experimento da etapa 2. Mas em termos de número de órgãos, a GST revelou ser mais responsiva ao benzo[*a*]pireno, pois se alterou em mais tipos de órgãos (cinco dos seis analisados). Novamente o pâncreas foi o órgão mais sensível para a espécie em estudo, apresentando alterações em sete dos nove biomarcadores nele avaliados.

Paralelamente, nas amostras sanguíneas dos animais desta segunda etapa foram analisadas a GGT e a fragmentação do DNA de eritrócitos pelo ensaio cometa. Ambas as técnicas foram responsivas ao contaminante, demonstrando a influência deste HPA sobre o organismo, ocasionando lesões hepáticas e genotoxicidade.

Discussão



5. DISCUSSÃO

As análises bioquímicas da primeira etapa deste estudo demonstram uma influência importante da contaminação por efluentes sanitários e industriais nos quelônios de vida livre, indicando que os cágados do córrego Felicidade estão sofrendo pressões de fatores externos e internos, alterando assim, a homeostase dos organismos. Este impacto ambiental na área urbana provocou uma série de alterações nos biomarcadores analisados nos órgãos destes animais.

Os níveis de MDA apresentados nos órgãos dos animais do córrego Felicidade em comparação com os do local de referência (controle) indicam danos oxidativos por estresse ambiental e reforçam a associação existente entre exposição ao contaminante e aumento nos danos celulares. A peroxidação lipídica representa uma consequência primária do estresse oxidativo celular e produz espécies reativas adicionais, que podem agravar a toxicidade (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Além disso, o nível de peroxidação lipídica tem sido amplamente mensurado como um indicador de danos causados por ERO em diferentes organismos, e é um dos biomarcadores que melhor respondem à presença de contaminantes prooxidantes e ao estresse ambiental (ALMEIDA et al., 2005; VOITURON et al., 2006; MAI et al., 2010; SUREDA et al., 2011; XU et al., 2014; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015).

O pâncreas não apresentou aumento de lesões oxidativas, quando se comparou as amostras deste órgão dos animais do córrego com as do controle. Isto, possivelmente por ter a capacidade de neutralizar as ERO geradas, evitando dano, seja devido à sua capacidade antioxidante elevada, como demonstrado nas análises das enzimas de biotransformação de fase I (EROD, BROD e PROD) e fase II (GST) e enzima antioxidante GPx, nas quais as amostras de animais do ambiente apresentaram altos valores; ou por sofrer menos ação de contaminantes prooxidantes que os demais órgãos analisados.

A exposição dos organismos aos contaminantes pró-oxidantes aumenta a geração de ERO e induz o estresse oxidativo intracelular, o que pode causar numerosos efeitos deletérios às células, incluindo a peroxidação lipídica, inativação de enzimas, oxidação de bases de DNA, e degradação protéica, causando distúrbio morfológico-funcional da célula lesada, morte celular e danos aos órgãos (ALMEIDA et al., 2005; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Neste contexto, o estresse oxidativo induzido por compostos químicos presentes no córrego Felicidade pode ser

responsável pelo alto nível de peroxidação lipídica observada nos órgãos dos espécimes deste local.

Frente a este impacto ambiental na área urbana, os animais intensificam sua defesa antioxidante, aumentando sua capacidade de detoxificação de compostos químicos. Os animais de área urbana exibiram maior atividade da EROD em comparação aos cágados da área controlada, em três dos órgãos avaliados (fígado, coração e pâncreas). Essa indução da isoforma CYP1A pode estar relacionada com a presença de contaminantes orgânicos antropogênicos na área urbana, tais como HPAs e bifenilas policloradas (PCBs), entre outros (WHYTE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; PATHIRATNE; HEMACHANDRA, 2010). Na exposição a estes contaminantes, a enzima CYP1A pode ser induzida, mediante a ligação do receptor aril hidrocarboneto (AhR) (LYONS et al., 2014).

As enzimas de biotransformação de xenobióticos pertencentes à família enzimática do citocromo P450 atuam no metabolismo oxidativo de ampla gama de compostos exógenos e endógenos (ARUKWE et al., 2008). Talvez devido a sua capacidade de metabolizar esta generalidade de compostos, como já descrito para a superfamília de enzimas da CYP 1, 2 e 3, incluindo compostos a base de óleo, estas enzimas foram detectadas em vários órgãos e tecidos de organismos aquáticos (ARUKWE et al., 2008).

Nos animais do córrego, a BROD e a PROD foram induzidas em coração e pâncreas, apesar de não terem sido alteradas no fígado. As atividades PROD e BROD são biomarcadores que também têm se mostrado sensíveis em estudos de biomonitoramento, apesar de serem pouco estudados em organismos aquáticos, menos ainda em quelônios, sendo que ainda não se sabe quais isoformas específicas de P450 são responsáveis pelas atividades dessas enzimas nestes organismos.

A família enzimática do citocromo P450 possui um papel chave na biotransformação de grande quantidade de contaminantes (como dioxinas, furanos, HPAs), catalisando reações de detoxificação e bioativação (SARKAR et al., 2006). As isoformas de CYP (EROD, BROD e PROD) são utilizadas como potenciais biomarcadores em monitoramento de ambientes poluídos. Elas atuam na primeira fase do metabolismo de detoxificação, expondo ou adicionando grupos funcionais reativos por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Dessa forma, transformam compostos lipofílicos em produtos mais solúveis em água, facilitando a excreção destes metabólitos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; FATIMA; AHMAD,

2006). Porém, devido a este papel na detoxificação e bioativação de xenobióticos, a alteração da expressão das CYPs pode também alterar os potenciais riscos de um composto químico no organismo, o que também é importante do ponto de vista toxicológico. Além disso, a exposição a compostos que induzem a biotransformação pela P450, pode ocasionar consequências ao organismo após longo período. Como há vários mecanismos tóxicos que envolvem a função de P450 ou receptores aril hidrocarboneto, e estes estão relacionados com várias outras funções fisiológicas como a produção hormonal e o funcionamento do sistema imunológico, pode haver prejuízos nas funções reprodutivas e/ou comportamentais (ARUKWE et al., 2008).

Do mesmo modo, os valores de atividade de GST, GPx, CAT e de concentração de GSH mais elevados em alguns tipos de órgãos refletem a possibilidade da exposição dos cágados a concentrações subletais de poluentes resultar na indução ou ativação de enzimas de biotransformação, como um possível ajuste enzimático na tentativa de evitar danos causados por estressores locais. Deste modo, a indução dessas enzimas está provavelmente relacionada com resposta adaptativa para neutralização de ERO na defesa contra dano oxidativo e produtos de peroxidação lipídica e de DNA (GEORGE et al., 1994; MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2009).

Os compostos derivados de xenobióticos produzidos durante a fase I da biotransformação e outros compostos químicos no organismo devem ser ligados a moléculas endógenas por meio de reações de conjugação (fase II). Este mecanismo bioquímico de defesa serve para aumentar a hidrossolubilidade dos compostos e, dessa maneira, facilitar a sua excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dentre as enzimas mais importantes nesse processo estão as glutathione S-transferases (GST), uma família multigênica de enzimas que catalisam reações de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de compostos eletrofílicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos e de radicais de oxigênio. A GST está entre as mais abundantes classes de enzimas do fígado e constitui o maior sistema de defesa contra compostos químicos eletrofílicos que são geralmente citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos mostrando, portanto, grande importância na detoxificação do organismo (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

A reação primária catalisada pela GST é o ataque nucleofílico pela GSH em um grupo de diversos compostos hidrofóbicos que contém um átomo de carbono, nitrogênio ou enxofre eletrofílico (HAYES; PULFORD, 1995). Esses compostos eletrofílicos podem causar mudanças

adversas em macromoléculas, como proteínas e lipídios, dentro da estrutura celular. De modo que o aumento da atividade da GST em animais de populações naturais está geralmente relacionado ao aumento da geração de espécies reativas (STEPHENSEN; STURVE; FÖRLIN, 2002).

A contaminação ambiental pode afetar a capacidade antioxidante e a rede de elementos envolvidos na proteção do estresse oxidativo. Deste modo, a biotransformação desempenha um papel essencial na eliminação de xenobióticos. Dentre os compostos ambientais detoxificados pela GST, destacam-se os HPAs, agroquímicos e intermediários reativos produzidos pela fase I de biotransformação e outras reações bioquímicas. Assim, este aumento na atividade de GST pode ser também devido à grande produção de compostos derivados de fase I da biotransformação, uma vez que as atividades da EROD, BROD e PROD também estão elevadas (HENSON; GALLAGHER, 2004; OZMEN et al., 2006).

A glutathiona reduzida (GSH) está entre as principais defesas celulares antioxidantes e que participam da detoxicação de compostos químicos. É uma potente molécula nucleofílica e redutora, neutralizando radicais livres e atuando como cofator da GST é inserida na molécula do xenobiótico, tornando-o mais hidrossolúvel (HELLOU et al., 2012). As concentrações de GSH foram elevadas no fígado, pulmão e intestino delgado dos cães do córrego. Esse aumento da GSH pode ser um estímulo de síntese do organismo para detoxificar ERO, no combate ao estresse oxidativo.

A glutathiona peroxidase (GPx), juntamente com as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), formam um sistema de defesa que tende a diminuir a concentração de oxirradicais, eliminando os produtos primários de oxigênio parcialmente reduzido (BAKER et al., 2007; LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). A SOD é uma metaloenzima que age como primeira linha de defesa, catalisando a transformação de O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular; CAT e a GPx, então, detoxificam H_2O_2 (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Como os cães têm o maior contato com o contaminante pela via oral, o intestino delgado, entre os órgãos analisados é o primeiro ter contato com os compostos químicos, o que justifica o aumento da atividade da SOD neste órgão atuando como primeira linha de defesa, já que há grande variedade de substâncias em interação.

O balanço entre atividades destas enzimas é crucial para a determinação do nível do estado de equilíbrio de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Este balanço, juntamente com o sequestro de íons metálicos, é importante para prevenir a formação do radical hidroxil e na

aquisição de tolerância ao estresse oxidativo, sendo indispensável para detoxificação e remoção de ERO durante o estresse (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

A CAT responde a ampla gama de contaminantes capazes de produzir ERO, tais como HPAs, PCBs, metais pesados, agroquímicos (TSANGARIS et al., 2010), de modo que a evidente elevação observada na atividade desta enzima nos órgãos (pulmão, intestino delgado e intestino grosso) dos quelônios de ambiente esteja relacionada aos diferentes poluentes presentes no córrego, provenientes da contaminação por fontes difusas urbanas, industriais e agrícolas.

Durante a detoxificação, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos são reduzidos pela GPx (ZHANG et al., 2004), cujas isoformas utilizam a glutatona reduzida (GSH) como substrato, transformando os peróxidos orgânicos em álcoois. A glutatona dissulfeto (GSSG) gerada neste processo pode ser reduzida pela ação da glutatona redutase (GR) sob consumo de NADPH (NORDBERG; ARNER, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A GPx possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e protege as biomembranas de danos relacionados à peroxidação lipídica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Por atuar na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas, essa enzima é utilizada com sucesso como biomarcador de exposição a diferentes contaminantes (metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALDIVIA et al., 2007).

Nesta etapa a GPx apresentou-se bastante expressiva, pois demonstrou atividade elevada nos animais do córrego em relação ao controle para cinco dos seis órgãos avaliados: fígado, coração, pulmão, pâncreas e intestino grosso. Provavelmente, para reduzir a concentração de peróxido de hidrogênio produzido não só na reação catalisada pela SOD, mas também durante o ciclo do citocromo P450, que também teve sua atividade muito aumentada. Embora a GPx não tenha se elevado no intestino delgado dos animais do ambiente, a atividade da CAT neste órgão estava maior, tentando manter o equilíbrio. Apesar disto houve estresse oxidativo neste órgão, o que significa que a ação do sistema antioxidante não foi suficiente para combater as ERO geradas.

Deste modo, o aumento na atividade da GPx verificada demonstra a influência da contaminação ambiental nos cágados em estudo, que precisaram intensificar suas defesas antioxidantes a fim de proteger os tecidos dos danos causados pelas ERO. O afluxo de compostos

geradores de oxirradicais devido aos contaminantes pode alterar vários processos metabólicos e ter impacto na atividade das enzimas envolvidas na detoxificação e capacidade antioxidante dos animais.

Entre os biomarcadores, a medida da atividade da AChE é considerada de grande interesse para avaliar os efeitos da exposição a compostos neurotóxicos em animais aquáticos (CAJARAVILLE et al., 2000). AChE desempenha um papel importante no funcionamento do sistema neuro-muscular, impedindo a contração muscular contínua (FULTON; KEY, 2001). A atividade da AChE do pâncreas dos animais de ambiente urbanos foi reduzida. A AChE é tipicamente inibida por praguicidas organofosforados (VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2007). Para os demais órgãos não ocorreu diferenças estatisticamente significantes entre os valores da atividade da AChE dos dois grupos, nem mesmo para o encéfalo, órgão com atividade mais representativa em relação às esterases.

Os quelônios parecem ter desenvolvido evolutivamente uma elevada capacidade antioxidante como estratégia de tolerância à anóxia/ hipóxia, especialmente nas espécies que hibernam no frio, mas também nas espécies aquáticas que lidam com grande variação na disponibilidade de oxigênio devido aos episódios de mergulho e emersão. Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que fundamentam a tolerância à anóxia/ hipóxia em quelônios, incluem elevada defesa antioxidante que ajuda a combater os radicais livres gerados nos múltiplos episódios de anóxia-reoxigenação. Além da manutenção das defesas antioxidantes constitutivas em taxas elevadas, também são capazes de induzir proteínas associadas com a defesa antioxidante (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010).

Porém, mesmo em animais com extraordinária capacidade antioxidante, o estresse oxidativo pode, no entanto, ocasionar problemas durante longos períodos de exposição aos contaminantes (BAKER et al., 2007). Apesar dos animais de ambiente urbano apresentarem aumento da capacidade antioxidante, essas defesas não foram suficientes para proteger o organismo após a persistência das condições estressoras ambientais e evitar danos oxidativos, como verificado pelos altos níveis de MDA na maioria dos órgãos avaliados dos mesmos animais.

Ocorreram várias alterações nos biomarcadores testados nos cágados da primeira etapa, porém não se pode atribuir a quais compostos se deve cada alteração. Em geral, os ambientes aquáticos estão sujeitos a uma vasta mistura de contaminantes, que podem apresentar efeitos

sinérgicos e antagônicos. Porém, poucos estudos há sobre os efeitos desses compostos em quelônios de água doce. Na etapa 2, tentou-se estabelecer o efeito da exposição controlada à 3 doses de benzo[a]pireno após 7 dias.

A avaliação de biomarcadores em diferentes órgãos demonstrou ser uma ótima estratégia para evidenciar os efeitos do contaminante, pois como também foi observado na primeira etapa do trabalho, alguns biomarcadores foram alterados em órgãos específicos, havendo diferenças de suscetibilidade entre os diferentes órgãos desta espécie.

Os níveis de MDA dos órgãos não apresentaram aumento para nenhum dos grupos submetidos ao tratamento com benzo[a]pireno (grupos tratados com 100 µg/kg, 500 µg/kg e 1000 µg/kg). Isto sugere que os organismos conseguiram interceptar as ERO geradas por meio de enzimas antioxidantes, impedindo a peroxidação lipídica. No coração, porém, os níveis de MDA reduziram no grupo 3. Talvez por ser uma exposição aguda, a ativação das defesas antioxidantes pode ter protegido as células contra a peroxidação lipídica e reduzido os valores de MDA abaixo dos níveis basais nas amostras de coração do grupo 3, além disso, algumas isoformas de GST tem atividade peroxidase, o que pode ter ajudado no combate das ERO (ALMEIDA et al., 2005).

A mensuração da EROD tem sido amplamente utilizada para verificar a indução do citocromo P450 isoforma 1A em organismos aquáticos expostos a vários contaminantes orgânicos, inclusive HPAs (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; TRIDICO et al., 2010). Benzo[a]pireno, como um composto modelo de HPA, é típico indutor da EROD (TRISCIANI et al., 2011). Assim, em nosso estudo a exposição ao benzo[a]pireno induziu a EROD no fígado, pâncreas e intestino delgado dos cágados submetidos às maiores doses do contaminante, como esperado.

Outros trabalhos também analisaram a atividade da EROD após exposição ao benzo[a]pireno. Tridico e colaboradores (2010) relataram que a exposição a 0,5 mg/L do composto também induziu a atividade da enzima em tilápias após o período de pré-exposição de três dias, e também depois de dois e sete dias de exposição. O mesmo foi verificado em *Lepomis macrochirus* dois dias após terem sido submetidos a 10 e 50 mg/kg do contaminante via injeção intraperitoneal (BRAMMELL et al., 2010) e em trutas expostas a 3 µg de benzo[a]pireno/g peixe/dia após 3 e 14 dias (CURTIS et al., 2011).

Apesar de serem menos estudados em organismos aquáticos e não se saber quais isoformas específicas de P450 são responsáveis pelas atividades dessas enzimas nestes

organismos, a BROD e a PROD também se mostraram responsivas ao benzo[a]pireno em *Phrynos geoffroanus*, com indução em alguns tipos de órgãos na tentativa de metabolizar o composto.

O aumento na atividade da BROD no fígado (animais do grupo 1), pâncreas (animais do grupo 3) e intestino delgado (grupo 2), sugere a atuação da enzima na metabolização do contaminante. Atividades de enzimas relacionadas, tais como EROD, BROD e MROD (7-metóxioresorufina-O-deetilase) foram avaliadas em peixes coletados em área de refinaria de petróleo, região considerada como altamente impactada com HPAs. A BROD foi responsiva, e também se mostrou aumentada, apresentando correlação positiva com a EROD e a MROD (TRISCIANI et al., 2011).

Os resultados também sugerem a atuação da PROD na tentativa de metabolizar o composto, com aumento na sua atividade no coração e pâncreas dos animais expostos às maiores doses de benzo[a]pireno (500 e 1000 µg/kg). A atividade da PROD também foi estudada em gastrópodes, apresentando indução após 96 h de exposição a 5 e 50 µg de benzo[a]pireno/L (GAGNAIRE et al., 2010).

Nesta segunda etapa, cinco dos seis órgãos analisados apresentaram alterações na atividade da GST (coração, pulmão, pâncreas, intestino delgado e grosso). As alterações observadas foram sempre aumento da atividade enzimática em um dos grupos que receberam as duas maiores doses: 500 µg/kg e 1000 µg/kg, provavelmente como resposta de defesa aos estressores químicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos e atuação da enzima na metabolização do contaminante. Alguns estudos também observaram aumento na atividade da GST após exposição por sete dias ao benzo[a]pireno (10 µg/L), como para a espécie de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (MARIA; BEBIANNO, 2011).

A concentração da GSH foi maior no fígado e intestino delgado dos grupos que receberam as maiores doses. Por ser uma das principais defesas celulares antioxidantes, foi requisitada na detoxificação do contaminante. Já no coração, os níveis da GSH diminuíram no grupo 2 em relação ao controle. A diminuição do nível do antioxidante pode indicar um consumo por ERO geradas nas células ou metabolização, pois além de atuar como antioxidante a GSH pode participar como cofator para a GST nas reações de fase II de biotransformação.

Os valores da atividade da GR também aumentaram para alguns dos grupos tratados do pâncreas, intestino delgado e intestino grosso. Assim, uma porcentagem da GSH utilizada (GSSG) pode ser novamente reciclada.

As análises das atividades da CAT e da GPx apresentaram-se elevadas em alguns dos grupos tratados, principalmente naqueles submetidos às maiores doses de benzo[a]pireno (grupos 2 e 3), para a maioria dos tipos de órgãos. Assim, os animais submetidos ao contaminante intensificaram suas defesas antioxidantes para detoxificação e remoção de ERO, evitando o estresse oxidativo.

Na maioria das análises, a menor dose de benzo[a]pireno (100 µg/kg), em um período de exposição de sete dias, não apresentou efeito sobre a atividade destas enzimas nos órgãos avaliados e apresenta valores próximos ao nível basal (valor do grupo controle). A maioria das alterações observadas foi aumento da atividade enzimática nos grupos que receberam as duas maiores doses: 500 µg/kg e 1000 µg/kg, como resposta de defesa aos estressores químicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos, com algumas exceções.

Em relação às três doses de benzo[a]pireno testadas na etapa 2, os quelônios da espécie *Phrynops geoffroanus* demonstram ser tolerantes e apresentar mecanismos eficazes de defesa à contaminação. Embora os animais não apresentem níveis de MDA elevado, o que indicaria que não houve lipoperoxidação, o ensaio cometa e a análise da gama glutamil transferase (GGT) revelaram lesões hepáticas e genotoxicidade.

As análises da atividade enzimática da GGT e da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa demonstraram a influência de benzo[a]pireno sobre o organismo, apresentando resultados significantes nas alterações hepáticas e genotoxicidade entre os diferentes tratamentos, com aumento dose-dependente das lesões no DNA e dos valores da atividade da GGT.

O aumento de GGT sérica está associado à desordem hepática, doença hepatobiliar, principalmente colestase intra e extra-hepática. Essa enzima também tem sido sugerida como um meio de detecção de carcinomas hepatocelulares em estágio inicial (HENDRICH; PITOT, 1987; DIAL, 1995; KOMLOSH et al., 2001). Deste modo, a determinação de sua atividade no plasma dos animais expostos ao benzo[a]pireno pode ser de grande utilidade na compreensão de alguns dos efeitos deste composto.

A análise da GGT também pode ser utilizada para avaliar os níveis de estresse oxidativo sistêmico. A GGT está envolvida na hidrólise de glutathiona plasmática, fornecendo aminoácidos

precursores a serem assimilados e reutilizados para a síntese de GSH intracelular, um antioxidante essencial na detoxificação de xenobióticos e carcinógenos. Paradoxalmente, estudos indicam que a GGT pode também estar envolvida na geração de ERO, em presença de ferro ou outros metais de transição, por gerar intermediários reativos ao atuar no metabolismo da GSH. Além disso, aumento dos níveis de GGT sérica pode estar associado com processo inflamatório (LEE; BLOMHOFF; JACOBS Jr., 2004; LEE, et al., 2007; COLACINO et al., 2014). Neste contexto, os aumentos nos níveis da GGT sérica podem ser indicativos de estresse oxidativo, de modo que os grupos que receberam maior dose do composto possam ter aumentado a atividade da enzima para regeneração da GSH, o que elevou os níveis de ERO e GGT .

Como observado na análise, a exposição à dose de 100 µg/kg (grupo 1) não apresentou efeito sobre a atividade desta enzima. Isto indica que *Phrynos geoffroanus* apresenta eficiente sistema para detoxificação de compostos como HPAs e seus metabólitos em baixa dose, demonstrando rápido ajuste às alterações ambientais.

O ensaio cometa mostrou-se eficaz e sensível para eritrócitos de *P. geoffroanus*, capaz de detectar número elevado de lesões no DNA dos grupos tratados com as duas maiores doses de benzo[a]pireno, demonstrando genotoxicidade dose-dependente deste composto para a espécie. Do mesmo modo, no ensaio cometa, a dose de 100 µg/kg não causou alterações significantes de genotoxicidade nesta espécie, possivelmente devido à capacidade de detoxificação e tolerância do organismo à baixa dose do composto.

Vários estudos têm sido realizados ao longo dos últimos anos que empregam o ensaio cometa para avaliar diferentes agentes genotóxicos em diferentes espécies. Pandrangi e colaboradores (1995) avaliaram o ensaio cometa para a detecção de danos ao DNA em eritrócitos da espécie de peixe *Ameiurus nebulosus* de sete locais na região dos Grandes Lagos, no Canadá. Maior dano foi identificado em três sítios poluídos com sedimentos pesados baseados em níveis elevados de HPAs e PCBs.

Frenzilli, Bosco e Barale (2000) utilizaram o ensaio cometa para a validação dos efeitos genotóxicos de 18 compostos químicos, revelando sua eficiência na identificação de agentes genotóxicos. Os mesmos pesquisadores também demonstraram que a produção de quebras nas fitas do DNA pode ser correlacionada com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos poluentes ambientais.

O monitoramento de efeitos clastogênicos ocasionados pelos poluentes é de grande importância em ambientes aquáticos quando se pretende avaliar o estresse ocasionado pela poluição. Compostos químicos genotóxicos possivelmente originam lesões no DNA de animais aquáticos, ocasionando efeitos adversos na estabilidade dos ecossistemas (KURELEC, 1993; TUCKER; PRESTON, 1996; POLETTA et al., 2008).

O desenvolvimento de um sistema de biomarcadores para avaliar o estado de saúde de quelônios e detectar precocemente a exposição a contaminantes ambientais e outros estressores, proporcionaria um instrumento útil para a conservação das espécies aquáticas e poderia ser usado como referência em áreas onde poluição e outros impactos ambientais têm ameaçado às populações dos animais (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; VALDIVIA et al., 2007).

Conclusões



6. CONCLUSÕES

- Os resultados da primeira etapa deste estudo revelam influência da contaminação por efluentes sanitários e industriais nos quelônios de vida livre.
- Os compostos químicos presentes no córrego Felicidade ocasionam estresse oxidativo e consequente elevação dos níveis de peroxidação lipídica nos órgãos dos espécimes deste local.
- O pâncreas foi o único órgão que não apresentou aumento de lesões oxidativas, quando se comparou as amostras dos animais do córrego com as do controle, além de ser o órgão mais sensível aos poluentes.
- Frente a este impacto ambiental na área urbana, os animais elevam sua resposta antioxidante para detoxificar os compostos químicos. Os animais exibiram maior atividade da P450, GST, GPx, CAT e concentração de GSH em alguns órgãos quando comparados ao controle.
- A avaliação de biomarcadores em diferentes órgãos evidenciou alterações em órgãos específicos e diferenças de suscetibilidade entre os órgãos desta espécie.
- Em relação às doses de benzo[a]pireno testadas na etapa 2 (grupos tratados com 100 µg/kg, 500 µg/kg e 1000 µg/kg), os quelônios da espécie *Phrynops geoffroanus* demonstram ser tolerantes e apresentar mecanismos eficazes de defesa à contaminação, pois não ocorreu aumento nos níveis de MDA dos órgãos.
- Embora o benzo[a]pireno seja um típico indutor da EROD, a BROD e a PROD também se mostraram responsivas à exposição, o que sugere a atuação dessas enzimas na metabolização do composto.
- A maioria das alterações observadas foi aumento da atividade enzimática nos grupos que receberam as duas maiores doses, 500 µg/kg e 1000 µg/kg, como resposta de defesa aos estressores químicos.
- As análises da atividade enzimática da GGT e da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa demonstram a influência de benzo[a]pireno sobre o organismo, ocasionando lesões hepáticas e genotoxicidade, com aumento dose-dependente das lesões no DNA e dos valores da atividade da GGT.

Referências



7. REFERÊNCIAS

- ADAM, O. et al. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 441–449, 2009.
- AKERBOOM, T.P.M., SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *In: Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems*. **Academic Press**, p. 373–382, 1981.
- ALMEIDA, E.A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology**, v. 135C, n. 3, p. 295-303, 2003.
- ALMEIDA, E.A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5-6, p. 386-392, 2004.
- ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21-30, 2005.
- ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, p. 588-600, 2007.
- ANDERSEN, M.L. et al. **Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. COBEA, p.71-79, 2004.
- ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.
- ARUKWE, A. et al. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. **Environmental Research**, v. 107, p. 362-370, 2008.
- BAKER, P.J. et al. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. **Journal of Comparative Physiology, Part B**, v. 177, n. 8, p. 875–883, 2007.
- BANNI, M. et al. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. **Chemosphere**, v.77, p. 92-906, 2009.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 1–14, 2006.

BAUMANN, P.C. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. **Mutation Research**, v. 411, n. 3, p. 227-233, 1998.

BENEDETTI, M. et al. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 167-175, 2007.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: 17 de Nov. 2010.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. Ed. Grune & Stratton–New York, 1975.

BODIN, N. et al. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea.

Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology, v.138, n.4, p.411-427, 2004.

BOURAOUI, Z. et al. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1893-1898, 2009.

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.

BRAMMELL, B.F. et al. Differential sensitivity of CYP1A to 3,3',4',4-tetrachlorobiphenyl and benzo(a)pyrene in two *Lepomis* species. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, p. 42-50, 2010.

BRITO, F.M.M. **Aspectos anátomo radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em Cágado de Barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae)**. 2007. 30 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG. 2007.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal -O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, n. 6, p. 583-588, 1974.

- BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 33-37, 1985.
- CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CAMPANHA, M.B. et al. Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1831-1836, 2010.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. *Methods Enzymol*, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CAZENAVE, J. et al. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River Basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v.157, p.3025-3033, 2009.
- CHRISTENSEN, M. et al. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. **Aquatic Toxicology**, v. 58, p. 15–25, 2002.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 155-158, 2009.
- ÇOK, I. et al. Evaluation of DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). **The Scientific World Journal**, v.11, p.1455-1461, 2011.
- COLACINO, J.A. et al. Dietary antioxidant and anti-inflammatory intake modifies the effect of cadmium exposure on markers of systemic inflammation and oxidative stress. **Environmental Research**, v. 131, p. 6-12, 2014.
- COLBORN, T. The wildlife/human connection: modernizing risk decisions. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p.55-59, 1994.
- Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande, Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 15 (CBH-TG-UGTHI-15). **Relatório da situação dos recursos hídricos**. http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat_view/42-planos-e-estudos, p. 1-32, 2010.
- CURTIS, L.R. et al. Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 1-7, 2011.

DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1995. v. 25, p. 257-273.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.88-95, 1961.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; **Locating and estimating air emissions from sources of polycyclic organic matter**, EPA-454/R-98/014, 1998.

ERNEST, C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**. Washington D. C.: Smithsonian Institution Press, 1989. p. 29-30, 182-183, 209-210.

FAIRBAIRN, D.W. et al. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research: Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. **Chemosphere**, v.62, n.4, p.527-537, 2006.

FERGUSON, K.K.; LOCH-CARUSO, R.; MEEKER, J.D. Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress: NHANES 1999–2006. **Environmental Research**, v. 111, p. 718-726, 2011.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.

FOSSI, M.C. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Supplement 12, p. 49-54, 1994.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 468, n. 1, p. 93-108, 2000.

FULTON, M.H.; KEY, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 37-47, 2001.

GAGNAIRE, B. et al. In vivo indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. **Environmental Toxicology**, v. 25, p. 545-553, 2010.

GARBELLINI, G.S.; ULIANA, C.V. Toxidez, degradação no meio ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 29-36, 2007.

GASTALDI, L. et al. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 146, p. 398–405, 2007.

GEORGE, S.G. et al. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives**. Malins, D.C., Ostrander, G.K. (editors). Lewis Publishers, 1994, 37-85p.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al. Influence of mussel biological variability on pollution biomarkers. **Environmental Research**, v. 137, p. 14-31, 2015.

GOULART, C. E. S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed L. F. Livros de Veterinária Ltda, 1.ed., 2004. p. 21-56, 99-108, 131-144.

GRUNDY, S. M. Gamma-Glutamyl Transferase. Another Biomarker for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. **Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 4-7, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, 4. ed, 2007.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.445-600, 1995.

HELLOU, J. et al. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2007-2023, 2012.

HENDRICH, S; PITOT, H.C. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 6, n.2, p. 155-178, 1987.

HENSON, K.L.; GALLAGHERI, E.P. Glutathione S-Transferase expression in pollution-associated hepatic lesions of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the Cuyahoga River, Cleveland, Ohio. **Toxicological Sciences**, v.80, p.26-33, 2004.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IAPC Monographs**, v. 1-42 (Suppl. 7), 1987. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

JHA, A.N. et al. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Mutation Research**, v. 464, p. 213-228, 2000.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research: DNA Repair**, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KOMLOSH, A. et al. γ -Glutamyl transpeptidase and glutathione biosynthesis in non-tumorigenic and tumorigenic rat liver oval cell lines. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 12, p. 2009-2016, 2001.

KOYAMA, J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination and recovery characteristics in some organisms after the Nakhodka oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 1054–1061, 2004.

KRIVORUCHKO, A.; STOREY, K. B. Forever young - Mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 3, p. 186-198, 2010.

KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, v. 35, n. 4, p.341-348, 1993.

LA TORRE FERNANDO, R. et al. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 577-583, 2005.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182-186, 2003.

LEE, D.H.; BLOMHOFF, R.; JACOBS Jr., D.R. Is Serum Gamma Glutamyltransferase a Marker of Oxidative Stress? **Free Radical Research**, v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.

LEE, D.S. et al. Gamma Glutamyl Transferase and Metabolic Syndrome, Cardiovascular Disease, and Mortality Risk - The Framingham Heart Study. **Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 127-133, 2007.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, n. 1, p. 3-15, 1998.

LYONS, K. et al. Bioaccumulation of organochlorine contaminants and ethoxyresorufin- O-deethylase activity in southern California round stingrays (*Urobatis halleri*) exposed to planar aromatic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1380-1390, 2014.

MAI, W.-j. et al. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 271-281, 2010.

- MARIA, V.; BEBIANNO, M. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, p. 53-63, 2011.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- McINTYRE, T.M.; CURTHOYS, N.P. Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal γ -glutamyltranspeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 14, p. 6499-6504, 1979.
- MEISTER, A. On the enzymology of amino acid transport, **Science**, v. 180, p. 33-39, 1973.
- MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998.
- MIYAMOTO, M.; VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, p. 15-27, 2005.
- MOLINA, F.B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynos geoffroanus*, *Acanthochelis radiolata* e *Acanthochelis spixii*. **Revista Brasileira de Etologia**, p.25-40, 1989.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. The effect of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.149, p.40-49, 2009.
- NEFF, J.M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R.(Eds.), **Fundamental of Aquatic Toxicology Methods and Applications**. Taylor and Francis, London, 1985, p. 416–454.
- NETO, A.F. et al. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.
- NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- OZMEN, M. et al. Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. **Ecotoxicology**, v.15, n.2, p.157-169, 2006.

- PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 1, p. 64-75, 2001.
- PANDRANGI, R. et al. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 345–356, 1995.
- PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K. Modulation of ethoxiresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution. **Ecotoxicology**, v.19, p. 1012-1018, 2010.
- PERCÁRIO, S. et al. Dosagem do Malondialdeído (MDA). **NewsLab**, ANO II, n. 6, p.46-50, 2004.
- PFEIFER, S. et al. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. **Journal of Marine Biology and Ecology**, v.320, n.15, p.93-103, 2005.
- PIÑA, C.I. et al. Heavy Metal Contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 771-775, 2009.
- POLETTA, G.L. et al., *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 202-209, 2008.
- POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **Vertebrate life**. Pearson Prentice Hall, 7. ed., 2005.
- PRETTI, C.; COGNETTI-VARRIALE, A.M. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 11, p. 299-303, 2001.
- PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles, 1984. p. 111-117.
- RODRIGUES, M.T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 87-94, 2005.
- ROSALKI, S.B.; TARLOW, D. Optimized Determination of γ -Glutamyltransferase by Reaction-Rate Analysis. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1121-1124, 1974.
- RUBIO-CLEMENTE, A.; TORRES-PALMA, R.A.; PEÑUELA, G.A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. **Science of the Total Environment**, v. 478, p. 201-225, 2014.

SANTOS, A.L.Q. et al. Radiographic anatomy aspects and gastrointestinal transit time in *Podocnemis unifilis* troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p.431-435, 2010.

SARKAR, A. et al. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SILVA, M.I.A. **Perfil hematológico e estresse por influência ambiental em *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. 2009. 52. F. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP, 2009.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112-120, 2008.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

STEPHENSEN, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.133, p. 435-442, 2002.

SUREDA, A. et al. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 540-549, 2011.

TICE, R.R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TIETZE, F. Enzymic method for quantifitative determination of nanogram of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 502-522, 1969.

TRIDICO, C.P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p. 858-863, 2010.

TRISCIANI, A. et al. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: A field study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p.806-814, 2011.

TSANGARIS, C. et al. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 151, p. 369-378, 2010.

TSUJI, A.; MATSUDA, Y.; KATUNUMA, N. Characterization of human serum gamma-glutamyltranspeptidase. **Clinica Chimica Acta**, v. 104, p. 361-366, 1980.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research: Reviews in Genetic Toxicology**, v. 365, p. 147-159, 1996.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (VAN DIJK, P.P.; IVERSON, J.B.; RHODIN, A.G.J.; SHAFFER, H.B; BOUR, R.) Turtles of the world, 7th edition: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. **Chelonian Research Monographs**, n. 5, p. 329-479, 2014.

VALDIVIA, P.A. et al. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizi*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 111-117, 2007.

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.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281-300, 2007.

VIOQUE-FERNANDEZ, A. et al. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C., v. 145, p. 404-412, 2007.

VOITURON, Y. et al. Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. **Cryobiology**, v. 52, p. 74-82, 2006.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, p. 347-570, 2000.

WHITACKER, A.M. Inovações tecnológicas, mudanças nos padrões locacionais e na configuração em cidades médias. **Scripta Nova**, v. XI, n. 245, 2007.

WYNEKEN, J. The anatomy of sea turtles. **National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Technical Memorandum, National Marine Fisheries Services**, 2001, 172p.

XU, X.H. et al. Immunological and histological responses to sulfide in the crab *Charybdis japonica*. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p.144-150, 2014.

ZAGO, C.E.S. et al. Morphological, mophometric and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. **Micron**, v. 41, p. 1005-1010, 2010.

ZANGAR, R.; DAVYDOV, D.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, n. 3, p. 316-331, 2004.

ZHANG, J. F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 1, p. 110-116, 2004.



ANEXO A - Autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1)



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16488-1	Data da Emissão: 19/08/2008 10:08	Data de Validade: 19/08/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2838725	Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio	CPF: 326.516.068-80
Título do Projeto: Cágado-de-barbeles (<i>Phrynops geoffroanus</i> - Testudine: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética		
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contatar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Aline Fernanda Chessa	Pesquisadora	346.405.458-60	33749356-X ssp-SP	Brasileira
2	Maria Teresita Vilela de Azeredo Oliveira	Pesquisadora	018.731.028-95	7842186-X ssp-SP	Brasileira
3	Claudia Regina Bonini Domingos	Orientadora da Pesquisa	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
4	Italo Cristiano Ribeiro	Pesquisador	358.534.388-08	40109487x SSP-SP	Brasileira
5	Tiago Lucena da Silva	Pesquisador	329.812.378-10	433137782 ssp-SP	Brasileira
6	Carlos Eduardo Saranz Zago	Pesquisador	246.376.238-12	21233397 ssp-SP	Brasileira
7	Josué Rodrigues dos Santos	Pesquisador	546.317.698-15	5246965 ssp-SP	Brasileira
8	Maria Isabel Afonso da Silva	Pesquisador	074.584.676-90	8.836.693 SSPMG-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	CA*regos Felicidade, Piedade e Rio Preto (S.J. Rio Preto)	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Phrynops geoffroanus</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Phrynops geoffroanus</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Phrynops geoffroanus</i> (*Qtde: 25)
4	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Phrynops geoffroanus</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 23948844



Página 1/3

ANEXO B - Autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-2)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16488-2	Data da Emissão: 23/09/2009 15:06
Dados do titular	
Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio	CPF: 326.516.068-80
Título do Projeto: Cágado-de-barbelas (<i>Phrynos geoffroanus</i> - Testudine: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análise de EROD	09/2009	12/2009
2	Análise de Esterase	09/2009	12/2009
3	Coleta de animais e amostras de sangue	10/2009	10/2010
4	Construção das bibliotecas genômicas parciais	11/2009	05/2010
5	Isolamento de microsatélites	02/2010	10/2010

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviço on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Aline Fernanda Chessa	Pesquisadora	346.405.458-60	33749356-X ssp-SP	Brasileira
2	Maria Tereza Vilela de Azeredo Oliveira	Pesquisadora	018.731.028-95	7842186-X ssp-SP	Brasileira
3	Claudia Regina Bonini Domingos	Orientadora da Pesquisa	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
4	Italo Cristiano Ribeiro	Pesquisador	358.534.388-08	40109487x SSP-SP	Brasileira
5	Yago Lucena da Silva	Pesquisador	329.812.378-10	433137782 SSP-SP	Brasileira
6	Carlos Eduardo Saranz zago	Pesquisador	246.376.238-12	21233397 ssp-SP	Brasileira
7	Josué Rodrigues dos Santos	Pesquisador	546.317.698-15	5246965 ssp-SP	Brasileira
8	Maria Isabel Afonso da Silva	Pesquisador	074.584.676-90	8.836.693 SSPMG-MG	Brasileira
9	Vinicius Augusto Gobbe Mochetta	Pesquisador	368.971.228-90	46916448-7 -	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	Córregos Felicidade, Piedade e Rio Preto (S.J. Rio Preto)	Fora de UC
2	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	córrego Felicidade, córrego Piedade e rio Preto	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 97868443



Página 1/3

ANEXO C - Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da FAMERP**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

O projeto de pesquisa intitulado "Cágado-de-Barbelas (*Phrynops geoffroanus* – Testudines: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética" (Protocolo FAMERP nº 5517/2008) sob responsabilidade da Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 16 de Outubro de 2008.

Profa. Dra. Cristiane Damás Gil
Presidente CEEA - FAMERP

ANEXO D - Autorização do IBAMA/ICMBio (autenticação: 14727648/nº 28549-1)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28549-1	Data da Emissão: 29/04/2011 14:05
Dados do titular	
Nome: Maria Isabel Afonso da Silva	CPF: 074.584.676-90
Título do Projeto: Estudo das alterações bioquímicas em tecidos de <i>Phrynos geoffroanus</i> (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae), como biomarcadores de contaminação ambiental e exposição ao benzo[a]pireno	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Curso de Doutorado	04/2011	02/2015

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Italo Cristiano Ribeiro	Pesquisador	358.534.388-08	40109487x SSP-SP	Brasileira
2	Tiago Lucena da Silva	Pesquisador	329.812.378-10	433137762 SSP-SP	Brasileira
3	Claudia Regina Bonini Domingos	Pesquisadora	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
4	Larissa Paola Rodrigues Venancio	Pesquisadora	326.516.068-80	32285625-5 SSP-SP	Brasileira
5	Vinicius Augusto Gobbe Mochetta	Pesquisador	368.971.228-90	46916448-7 -	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	Bacia Turvo Grande	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Phrynos geoffroanus</i>

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14727648



Página 1/3

ANEXO E - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - IBILCE/UNESP - CSJRP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

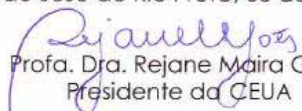
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo das alterações bioquímicas em tecidos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae), como biomarcadores de contaminação ambiental e exposição ao benzo[a]pireno**" (protocolo nº. 045/2011 CEUA), sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 08 de junho de 2011.

CERTIFICATE

UNESP/IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEUA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Study of biochemical changes in tissues of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae), as biomarkers of environmental contamination and exposure to benzo[a]pireno**" (protocol nº. 045/2011 CEUA), on Eduardo Alves de Almeida responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on June, 08th, 2011.

São José do Rio Preto, 08 de junho de 2011.


 Profa. Dra. Rejane Maira Góes
 Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – STAEPE
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth
 CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP - Brasil
 Tel 17 221 2425 fax 17 221 2390 / 3221 2500
 E-mail: btonti@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br