UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Bruno Serra de Lacerda Valverde

Efeitos sistêmicos viscerais e somáticos do Benzo-[alfa]-pireno em *Physalaemus nattereri* mediante as vias de exposição oral e injetável

São José do Rio Preto

2018

Bruno Serra de Lacerda Valverde

Efeitos sistêmicos viscerais e somáticos do Benzo-[alfa]-pireno em *Physalaemus nattereri* mediante as vias de exposição oral e injetável.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto

2018

Valverde, Bruno Serra de Lacerda.
Efeitos sistêmicos viscerais e somáticos do Benzo-[alfa]-pireno em *Physalaemus nattereri* mediante as vias de exposição oral e injetável / Bruno Serra de Lacerda Valverde . -- São José do Rio Preto, 2018
70 f. : il.

Orientador: Classius de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Anuro. 3. Poluição. 4. Eritrócitos. 4. Fígado. 5. Intestino delgado. 6. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio deMesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 597.8

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

Bruno Serra de Lacerda Valverde

Efeitos sistêmicos viscerais e somáticos do Benzo-[alfa]-pireno em *Physalaemus nattereri* mediante as vias de exposição oral e injetável.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. André Luis da Cruz

Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini

UNESP – Bauru

São José do Rio Preto

28 de fevereiro de 2018

Dedico este trabalho para as futuras gerações.

Que ele inspire suas pesquisas.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Classius de Oliveira pela oportunidade dada a mim, durante minha graduação e pós-graduação, em ser membro do Laboratório de Anatomia Comparada. Sua confiança e ensinamentos lapidaram e moldaram o pesquisador que sou hoje e isso possibilitou a execução deste e de muitos outros trabalhos.

A Dra. Lilian Franco Belussi, minha coorientadora durante minha trajetória no Laboratório de Anatomia Comparada. Agradeço por todos os auxílios, companheirismo e ensinamentos que possibilitaram a execução de muitos trabalhos, e que contribuíram para eu me tornar o pesquisador que sou hoje.

Aos membros do Laboratório de Anatomia Comparada (Arleto Tenório dos Santos; Erick Augusto Bassi; Gabriel da Cunha Canevari; Lara Salgueiro de Gregório; Lara Zácari Fanali; Luciana Trevizan; Maysa Succi Domingues; Rinneu Elias Borges e Wadson Rodrigues Rezende) pela amizade, pela colaboração, pelos ensinamentos e pela paciência durante a minha trajetória científica junto ao Laboratório.

Aos meus muitos amigos, colegas e familiares que sempre estão ao meu lado proporcionando momentos de felicidades, reflexões e risadas não importando a distância. Suas amizades são muito importantes para mim e auxiliaram, diretamente e indiretamente, na execução deste trabalho de mestrado.

Aos meus pais pelos ensinamentos, tanto intelectual como de vida, que me moldaram e fizeram ser o que sou. Vocês sempre me apóiam em todas as

milhas escolhas e decisões e isso é o mais do que suficiente para mim. Amo vocês.

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

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Os anuros se encontram em declínio populacional, sendo uma das causas atribuídas à poluição de seus habitats. Características como ausência de cascas nos ovos, ciclo de vida dependente da água e elevada permeabilidade tegumentar tornam os anuros suscetíveis a compostos químicos presentes no ecossistema aquático e terrestre. Dentre esses compostos temos o benzo-[alfa]-pireno (BαP) um contaminante ambiental amplamente encontrado no ambiente em que os anuros vivem, o qual possui efeitos carcinogênicos e tóxicos. Esses efeitos são observados nos anuros, especificamente nas células pigmentares internas, no epitélio intestinal e nas células sanguíneas; sendo dessa forma considerados biomarcadores para o BαP. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos sistêmicos do BαP em *Physalaemus nattereri*, e se esses efeitos são influenciados pela via de exposição. Para isso foram coletados 24 espécimes, os quais receberam 3mg/Kg de BαP, diluído em óleo mineral, ou apenas o óleo (controle), por uma via oral ou injetável. Nossos resultados demonstraram que a via de exposição influencia nos efeitos do BαP sobre as células pigmentares, as quais apresentaram um aumento e uma diminuição em sua área pigmentar; e sobre a espessura do epitélio intestinal, que apresentou uma diminuição mais acentuada na via oral do que na injetável. O BαP também é responsável por aumentar a frequência de anormalidades nucleares, no entanto essas não foram influenciadas pela via de exposição, demonstrando efeitos genotóxicos do BαP independente da via de exposição. Esses resultados demonstram que o BαP tem o potencial de causar um efeito sistêmico, sendo evidenciado pelas alterações morfológicas nas células pigmentares internas do fígado e do testículo, no epitélio intestinal e nas células sanguíneas de *P. nattereri*.

Palavras chave: Eritrócitos, Fígado, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, Intestino Delgado, Testículo.

ABSTRACT

Anurans are in declining population, being one of the causes attributed to the pollution of their habitats. Characteristics such as absence of eggshells, water-dependent life cycle and high skin permeability make anurans susceptible to chemical compounds present in aquatic and terrestrial ecosystem. Among these compounds we found benzo-[alpha]-pyrene (BαP) an environmental contaminant widely found in the environment in which anurans live. BαP present carcinogenic and toxic effects in animals. These effects are observed in anurans, specifically in the internal pigment cells, in the intestinal epithelium and in the blood cells; being thus considered biomarkers for BαP. The aim of this study was to analyze the systemic effects of BαP on Physalaemus nattereri, and whether these effects are influenced by the route of exposure. For this, 24 specimens were collected, which received 3mg/kg of BαP diluted in mineral oil, or just the oil (control), by an oral or injectable route. Our results demonstrated that the route of exposure influences the effects of BαP on the pigmentary cells, which presented an increase and a decrease in their pigmentary area; and on the thickness of the intestinal epithelium, which presented a more pronounced decrease in the oral route than in the injectable. BαP is also responsible for increasing the frequency of nuclear abnormalities, but these were not influenced by the route of exposure, demonstrating genotoxic effects of BαP independent of the route of exposure. These results demonstrate that BαP has the potential to cause a systemic effect, being evidenced by the morphological alterations in the internal pigment cells of the liver and the testis, in the intestinal epithelium and in the blood cells of P. nattereri.

Keywords: *Erythrocytes, Liver, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Small Intestine, Testis.*

Lista de símbolos e abreviações

- **cm:** centímetros.
- **g:** gramas.
- **g/L:** gramas/litro, gramas por litro.
- **h:** horas.
- **LPS:** lipopolissacarídeo.
- **M:** molar.
- **mg/Kg:** miligrama/quilograma, miligrama por quilograma.
- **mL:** mililitros.
- **n:** número amostral, número de espécimes.
- **Nle^4, D-Phe^7-α-MSH:** análogo do hormônio estimulante de melanócitos.
- **SE:** *Standard error*.
- **sp:** espécie.
- **µm:** micrometros.
- **μm^2:** micrometros quadrados.
- **ºC:** graus Celsius.

SUMÁRIO

RESUMO.....09

ABSTRACT.....10

I – Introdução Geral.....14

Anuros como bioindicadores ambientais.....14

Phsalaemus nattereri como modelo de estudo.....14

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos: benzo-[alfa]-pireno.....15

Efeitos sistêmicos de contaminantes nos anuros.....16

Efeitos de contaminantes no intestino de anuros:.....17

Efeitos de contaminantes nas células sanguíneas:.....17

Efeitos de contaminantes nas células pigmentares internas:.....19

II – Objetivos.....20

Geral.....20

Específicos.....21

III – Materiais e Métodos.....21

Experimentos *in vivo*.....21

Coleta dos espécimes.....21

Experimento com o benzo-[alfa]-pireno.....21

Análises.....23

Quantificação da área de melanina:.....23

Quantificação da pigmentação na superfície dos órgãos:.....23

Morfométria do epitélio intestinal:.....24

Quantificação de anormalidades nucleares:.....25

IV – Resultados.....26

Resultados do intestino e das células sanguíneas.....28

Manuscrito 1: Distintas vias de exposição do benzo-[alfa]-pireno podem potencializar os efeitos genotóxicos e morfológicos no anuro *Physalaemus nattereri*.....29

Resultados da pigmentação interna.....42

Manuscrito 2: Exposição aguda ao benzo-[alfa]-pireno altera a pigmentação melânica do anuro *Physalaemus nattereri*: efeitos subletais nos melanócitos e melanomacrófagos.....43

V – Conclusões.....61

VI – Referências bibliográficas.....62

I – INTRODUÇÃO GERAL

Anuros como bioindicadores ambientais:

A classe *Amphibia* surgiu a 350 milhões de anos, tendo sido os primeiros vertebrados a alcançarem o ambiente terrestre, estando ainda dependentes do ambiente aquático ou de microhábitats úmidos para a reprodução (Duellman & Trueb, 1994; Vitt & Caldwell, 2014). Atualmente a classe *Amphibia*, subclasse Lissamphibia, é constituída por três ordens (7728 sp.): Anura (sapos, rãs e pererecas - 6806 sp.), Caudata (salamandras e tritões - 715 sp.) e Gymnophiona (cecílias - 207 sp.); os quais compartilham características como: ciclo de vida bifásico com um estádio larval aquático e um adulto terrestre, e pele glandular com ausência de estruturas epidérmicas (Duellman & Trueb, 1994; Kardong, 2012; Frost, 2017).

Desde a década de 1980, herpetólogos tem relatado o declínio populacional dos anuros e a partir disso, estudos foram intensificados para se atribuir os fatores desse declínio (Mattoon, 2001; Collins & Stofer, 2003). Dentre estes fatores temos: alterações de hábitat (Blaustein & Wake, 1995; Delis *et al.*, 1996; Bruhl *et al.*, 2013; Lipinski *et al.*,2016), doenças emergentes (Carvalho *et al.*, 2017), introdução de espécies invasoras (Blaustein & Wake, 1995) e a radiação ultravioleta (Lipinski *et al.*, 2016).

Por se encontrarem associados aos ambientes aquático e terrestre os anuros são considerados importantes bioindicadores da qualidade do meio ambiente, uma vez que apresentam ovos sem casca e elevada permeabilidade cutânea, com rica vascularização da pele; o que possibilitam a absorção de compostos químicos presentes na água, solo ou no ar (Blaustein & Wake, 1995; Young *et al.*, 2004; DeGarady & Halbrook, 2006; Blaustein & Bancroft, 2007).

Physalaemus nattereri como modelo de estudo:

Physalaemus nattereri (Steindachener, 1863) é um anuro da família Leptodactylidae, subfamília Leiuperinae, com ampla distribuição geográfica ao longo das regiões central e sudeste do Brasil, oeste da Bolívia e do Paraguai (Aquino *et al.*, 2004). A espécie apresenta hábito alimentar carnívoro, especificamente insetívoro e é caracterizada pela presença de duas macroglândulas na região inginal (Lenzi-Mattos *et al*., 2005; Araújo *et al*., 2009).

Esta espécie tem sido utilizada como um modelo experimental para estudos em laboratório, visto que se comporta muito bem às condições laboratoriais devido a características como, fácil manipulação e boa adaptabilidade a cativeiro, onde se alimenta "*ad libitum*" (Franco-Belussi *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014; Zieri *et al.*, 2015; Franco-Belussi *et al.*, 2016). Além disso, a espécie apresenta ampla ocorrência na região sudeste do Brasil (Aquino *et al.*, 2004), o que possibilita a coleta de exemplares com número amostral suficiente para a execução de experimentos laboratoriais.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos: benzo-[alfa]-pireno:

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos químicos caracterizados pela presença de dois ou mais anéis aromáticos (benzeno) condensados (IPCS, 1998; Netto *et al.*, 2000). Esta classe apresenta mais de 100 compostos químicos, os quais são originados a partir da queima incompleta de matéria orgânica, tendo como fonte de origem: emissões indústriais de aço, alumínio e ferro; fumaça do tabaco; incêndios florestais; processamento de carvão, óleo e gás natural; e exaustão de veículos automotores (IPCS, 1998; ATSDR, 2011).

Dentre os HPAs, o benzo-[alfa]-pireno (BαP) é o mais conhecido e estudado (Caruso & Alaburda, 2008) devido sua propriedade carcinogênica, sendo classificado como agente de grupo 1 – carcinogênico para humanos – pela *International Agency for*

Research on Cancer (IARC, 2013). Este composto químico pode ser encontrado na água, nos animais, no ar e nas plantas o que possibilita sua absorção por diferentes vias de exposição (Wilcke *et al.,* 2003; Nasr *et al.,* 2010; Gupta *et al.,* 2011).

O BαP, assim como os HPAs, é lipossolúvel e pode ser absorvido naturalmente por via cutânea, oral ou respiratória (Netto *et al.,* 2000). Após sua absorção o BαP é metabolizado pelo organismo (Autrup *et al.,* 1977, 1982; Lemaire *et al.,* 1990) e durante esse processo são gerados metabólitos – grupos: diol, epóxido, fenol, hidróxi e quinonas – (Selkirk, 1977; Gelboin, 1980), os quais são responsáveis por ocasionar efeitos adversos que incluem: carcinogênese, citotoxicidade, estresse oxidativo e mutagênese (Gelboin, 1980; Quaroni & Isselbacher, 1981; Shimizu *et al.,* 2000; Costa *et al.,* 2010).

Esses efeitos adversos sofrem alterações decorrentes do tempo e da via de exposição do BαP (Lemaire *et al.,*1992a; De Oliveira *et al.,* 2017). Além disso, a via de exposição também influência no tempo de metabolismo do BαP (Lemaire *et al.,* 1990, 1992b) o que influência no seu tempo permanência no organismo e na geração de metabólitos.

Efeitos sistêmicos de contaminantes nos anuros:

Como os anuros encontram-se associados ao ecossistema aquático e terrestre (Blaustein & Wake, 1995; Blaustein *et al.,* 2003), sua exposição a contaminantes ambientais, como o BαP, pode ocorrer por diferentes vias naturais; o que influência nos seus efeitos adversos (Lemaire *et al.,* 1992a).

Esses efeitos são observados em diferentes sistemas de anuros – digestório, circulatório e reprodutor e são analisados utilizando, como ferramenta, os biomarcadores morfológicos; que incluem: o epitélio intestinal, os eritrócitos e as células pigmentares (Sadinski *et al.,* 1995; De Oliveira *et al.,* 2017; Fanali *et al.,* 2017).

Efeitos de contaminantes no intestino de anuros:

O intestino delgado é um dos órgãos que compõem o sistema digestório dos anuros, juntamente com a cavidade oral, faringe, esôfago, estômago e intestino grosso. Esse órgão, nos anuros, é composto por quatro camadas histológicas: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A camada mucosa corresponde à porção epitelial do órgão, sendo constituída por um epitélio colunar simples, com borda em escova, intercalado com células caliciformes (Duellman & Trueb, 1994; Stevens & Hume, 1995). A função desse órgão esta relacionada com absorção de partículas nutritivas, complementação e finalização da atividade digestiva (Duellman & Trueb, 1994; Zug *et al.*, 2001).

Alterações morfológicas no intestino delgado são observadas em anuros expostos a compostos agrícolas, como: fungicidas, herbicidas, inseticidas e nitratos. Essas alterações incluem: edema, hemorragia, inflamação, má formações no órgão, necrose e vacuolização das células epiteliais (Krishnamurthy *et al.*, 2008; Lenkowski *et al.*, 2010; Çakici, 2014, 2016). O BαP também induz alterações morfológicas, sendo elas o aumento e a diminuição na espessura do epitélio (Fanali *et al.*, 2017).

Estudos utilizando peixes (James *et al.*, 1997; Lemaire *et al.*, 1990, 1992b; Van Veld *et al.*, 1988) e mamíferos (Autrup *et al.*, 1977; Stohs *et al.*, 1977; Autrup *et al.*, 1982; Cavret & Feidt, 2005) demonstraram a capacidade de órgãos extra-hepáticos, como o intestino delgado, em metabolizar o BαP; sendo esse metabolismo desempenhado pelas células epiteliais (Stohs *et al.*, 1977; Cavret & Feidt, 2005).

Dessa forma o intestino delgado e o seu epitélio, estão sujeitos aos efeitos adversos do BαP, os quais incluem alterações morfológicas e ultraestruturais (Fair & Fortner, 1987; Lemaire *et al.*, 1992a; Yuen *et al.*, 2007; Fanali *et al.*, 2017).

Efeitos de contaminantes nas células sanguíneas:

Os eritrócitos correspondem a um dos três elementos celulares presentes na corrente sanguínea dos anuros, juntamente com leucócitos e trombócitos (Duellman & Trueb, 1994; Claver & Quaglia, 2009). A análise de amostras sanguíneas e a caracterização morfológica dos eritrócitos têm sido utilizadas para se verificar o status fisiológico dos animais, frente a agentes tóxicos (citotóxicos, genotóxicos e hematotóxicos; Fenech, 2007; Claver & Quaglia, 2009; Strunjak-Perovic *et al*., 2010; Muranli & Guner, 2011; Lajmanovich *et al.,* 2014; Sayed, 2015).

A caracterização do núcleo de eritrócitos, quanto à presença de anormalidades nucleares, tem sido uma das principais ferramentas para verificar os efeitos de compostos químicos, dentre esses: BαP, cromo, herbicidas e inseticidas; os quais induzem um aumento na frequência de anormalidades nucleares (Cabagna *et al.,* 2006; Yin *et al.,* 2009; Domingues *et al.,* 2010; Lajmanovich *et al.,* 2014; Pérez-Iglesias *et al.,* 2014, 2016).

O micronúcleo (MN) é uma anormalidade nuclear originada a partir da fragmentação de parte ou de todo um cromossomo durante a divisão nuclear, especificamente na anáfase, devido à exposição de compostos genotóxicos (Fenech, 2007; Muranli & Guner, 2011). Estes cromossomos, ou fragmentos de cromossomo estão envolvidos por uma lâmina nuclear e apresentam características morfológicas similares ao núcleo (Fenech *et al.,* 2011). Dentre outras anormalidades nucleares podemos citar: *bud* nuclear, que apresenta a mesma morfologia do MN, porém encontra-se conectado ao núcleo por um pedúnculo nucleoplasmático; células binucleadas, que exibem dois núcleos; e ponte nucleoplasmática, caracterizada por dois núcleos interconectados devido a um despareamento de DNA (Carrasco *et al*., 1990; Fenech, 2007; Lajmanovich *et al.,* 2014; Alimba & Bakare, 2016; Franco-Belussi *et al.,* 2016; Pérez-Iglesias *et al.,* 2016).

Efeitos de contaminantes nas células pigmentares internas:

Os vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) apresentam células pigmentares contendo melanina interna, freqüentemente encontrados em diferentes órgãos e tecidos (Roberts, 1975; Agius, 1980; Franco-Belussi *et al.,* 2009; Moresco & Oliveira, 2009). Estas células apresentam a capacidade de sintetizar melanina, por um processo denominado melanogênese, e armazenar melanina no interior de melanossomos (Roberts, 1975; Purrello *et al.*, 2001; Colombo *et al.,* 2011; Videira *et al.,* 2013).

Em anuros é possível distinguir duas linhagens de células pigmentares: os melanócitos e os melanomacrófagos (Colombo *et al.,* 2011; Franco-Belussi *et al.,* 2013). Os melanócitos são células derivadas da crista neural ectodérmica, similares aos melanócitos dérmicos, sendo freqüentemente observados no: coração, intestino, mesentério, nervos, peritônio parietal, pulmões e nos rins (Zuasti *et al.,* 1998; Moresco & Oliveira, 2009; Colombo *et al.,* 2011; Franco-Belussi & Oliveira, 2011; Franco-Belussi *et al.,* 2017). A função dos melanócitos esta relacionada com a própria função da melanina, que atua na neutralização de agentes bacterianos e na proteção contra radicais livres (Wolk *et al.,* 1985; Sichel, 1988; Hoogduijin *et al.,* 2004).

Os melanomacrófagos, por sua vez, são derivados de células-tronco hematopoiéticas, sendo encontrados em órgãos hematopoiéticos, como o baço e o fígado (Roberts, 1975; Agius, 1980). Os melanomacrófagos apresentam atividade fagocítica (Christiansen *et al.,* 1996) e atuam na detoxificação de xenobióticos; a partir de uma ação enzimática, que age no processo de biotransformação/detoxificação, conjunta com a melanina, que atua na neutralização de compostos tóxicos (Sichel, 1988; Fenoglio *et al.,* 2005; Pérez-Iglesias *et al.,* 2016).

Estudos utilizando os melanomacrófagos, melanócitos viscerais e testiculares têm demonstrado a capacidade responsiva dessas células frente ao BαP; bem como a outros agentes biológicos (LPS de *Escherichia coli*), físicos (temperatura e radiação ultravioleta) e químicos (glifosato; Franco-Belussi *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Franco-Belussi *et al.*, 2016; Pérez-Iglesias *et al.*, 2016; Fanali *et al.*, 2017).

II – Objetivos

Geral:

O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos adversos do contaminante Benzo-[alfa]-pireno (BαP) sobre o epitélio intestinal, eritrócitos e células pigmentares de *Physalaemus nattereri*; e se esses efeitos são influenciados pela via de exposição oral e injetável. A hipótese principal deste estudo é que ocorrerão alterações morfológicas devido ao BαP, e essas alterações serão influenciadas pela via de exposição do composto. Um resumo da contextualização teórica, bem como dos objetivos deste estudo encontram-se sumarizadas na Figura 1.

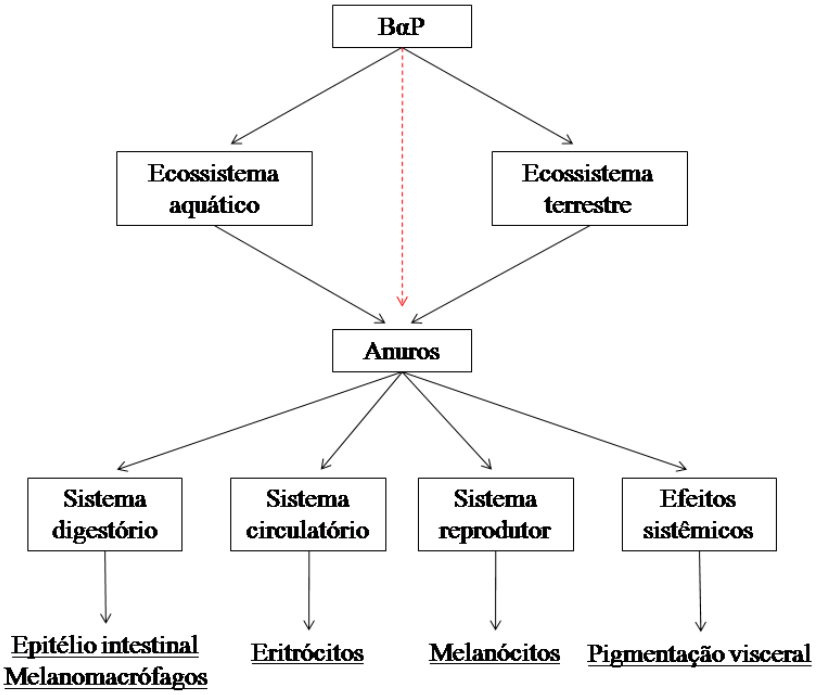

Figura 1 – Sumário de possíveis vias de contaminação do BαP e os efeitos sistêmicos avaliados neste trabalho.

Específicos:

Especificamente iremos avaliar os efeitos do BαP: (1) nos melanomacrófagos hepáticos, (2) nos melanócitos testiculares, (3) na pigmentação da superfície dos órgãos da cavidade celomática, (4) no epitélio intestinal e (5) na frequência de micronúcleo e de anormalidades nucleares nos eritrócitos.

III – Materiais e Métodos

Experimentos *in vivo:*

Coleta dos espécimes:

Exemplares machos de *P. nattereri* (Figura 2) foram coletados, por meio de busca ativa, na região de São José do Rio Preto – SP durante a estação reprodutiva em fevereiro de 2016. Os espécimes foram mantidos no Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) com regime de temperatura (27 ± 0,5ºC) e de luminosidade natural, por nove dias. Os espécimes foram mantidos, sob privação alimentar, em caixas plásticas (dimensões: 25x16x13 cm), contendo terra e água.

Figura 2 – Exemplar da espécie *Physalaemus nattereri.*

Experimento com o benzo-[alfa]-pireno:

Para analisar os efeitos sistêmicos do BαP (Sigma-Aldrich, 96% de pureza) e a influência das vias de exposição, 24 espécimes de *P. nattereri* foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo eles: gavagem controle/tratamento (GC/GT) e injetável controle/tratamento (IC/IT). Para o grupo gavagem a cavidade oral dos espécimes foi exposta manualmente (Figura 3a), sendo realizada a administração de óleo mineral (Farmax) para o grupo GC e de óleo mineral contendo 3mg/kg de BαP para o grupo GT. Para o grupo injetável os espécimes receberam uma injeção subcutânea no membro posterior (Figura 3b) contendo óleo mineral para o grupo IC e óleo mineral contendo 3mg/kg para o IT. O volume administrado, para todos os grupos, foi de 0,02mL.

Ao término do tempo experimental de três dias, os espécimes foram anestesiados localmente no membro posterior com xylocaína para a coleta de amostras sanguíneas, as quais foram fixadas em lâminas de vidro com metanol a 4ºC por 20 minutos. Posteriormente os espécimes foram eutanasiados em dose letal de benzocaína (5g/L), pesados e dissecados. Órgãos alvo do experimento: fígado, intestino delgado e testículos foram coletados e fixados em solução de Karnovsky (0,1M tampão fosfato Sörensen, tampão fosfato pH 7.2 com 5% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) a 4ºC por 24h. Posteriormente os órgãos foram lavados em água destilada, desidratados em série alcoólica crescente (50%, 70%, 90% e 100%) e incluídos em historresina (Leica historesin embedding kit). Cortes histológicos de 2µm foram obtidos em um micrótomo rotativo (Leica RM2255).

Terminada a coleta dos órgãos, os espécimes foram identificados e fixados em formol 10% por 24h, sendo mantidos em álcool 70% como material testemunhos junto ao Laboratório de Anatomia Comparada (IBILCE/UNESP), para posterior análise da pigmentação na superfície dos órgãos.

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP – CSJRP (nº. 145/2016).

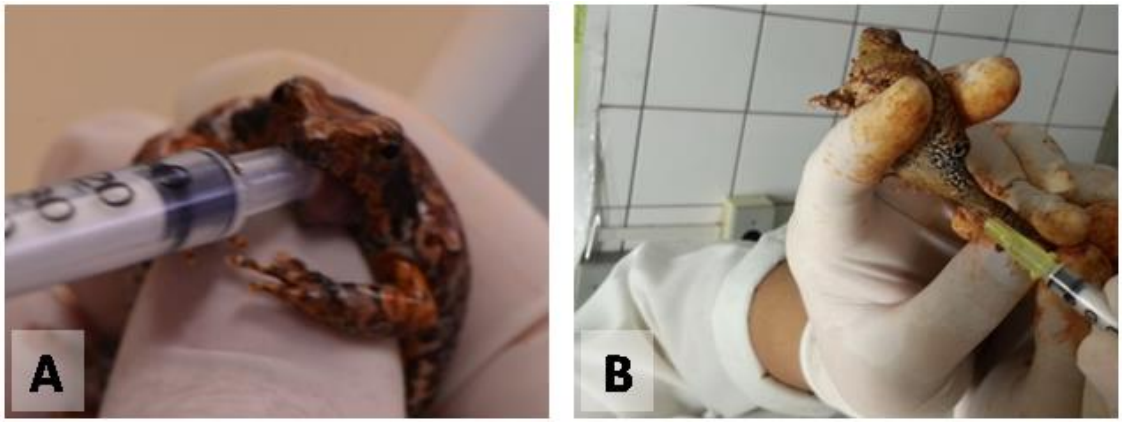

Figura 3 – Demonstração das vias de exposição oral ("A") e injetável ("B") utilizadas nos experimentos *in vivo*.

Análises:

Quantificação da área de melanina:

Cortes histológicos do fígado e do testículo foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 4000B) em objetiva de 20x. 25 campos histológicos, por animal, foram analisados no programa Image-Pro Plus versão 6.0 (Media Cybemetics Inc., Silver Spring, MD, USA), sendo realizada a quantificação da área de melanina por diferença de intensidade de coloração. Protocolo de análise segundo Franco-Belussi et al. (2013).

Para verificar a influência da via de exposição sobre os efeitos do BαP utilizamos o teste Two-Way ANOVA, realizado no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

Quantificação da pigmentação na superfície dos órgãos:

Para quantificar a pigmentação na superfície dos órgãos, a cavidade abdominal de *P. nattereri* será analisada em um estereomicroscópio (Leica MZ16). A análise seguiu o protocolo estabelecido por Franco-Belussi et al. (2009, 2017), que utiliza dados

categóricos (0, 1, 2 e 3) para quantificar a pigmentação. A categoria 0 é referente a ausência total de pigmentação, a categoria 3 é referente a pigmentação total do órgão e as categorias 1 e 2 são intermediárias, e exibem um grau progressivo de pigmentação (Figura 4). Os órgãos/tecidos analisados foram: coração, pericárdio e vasos da base do coração, peritônio parietal lumbo-sacral, plexo nervoso lombar, pulmões, face dorsal dos rins e testículos.

Para analisarmos a variação da pigmentação nos diferentes órgãos e tecidos e a influência da via de exposição utilizamos o G para dados categóricos com múltiplas categorias, código fornecido por Peter Hurd (Disponível em: http://www.psych.ualberta.ca/~phurd/cruft/g.test.r). A análise foi realizada no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

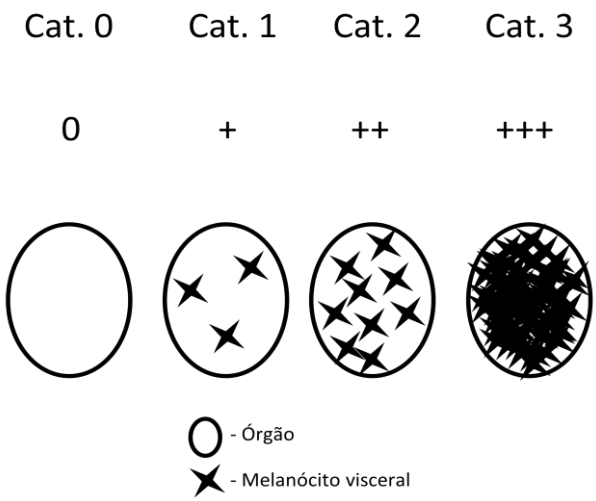

Figura 4 - Ilustração das categorias da pigmentação na superfície dos órgãos. Categoria 0 (Cat. 0; 0) corresponde a ausência de células pigmentares (melanócitos); categoria 1 (Cat.1; +) presença de poucas células pigmentares; categoria 2 (Cat. 2; ++) várias células pigmentares na superfície do órgão; categoria 3 (Cat. 3; +++) grande quantidade de células pigmentares/pigmentação total do órgão. Adaptado de Franco-Belussi et al. (2009, 2017)

Morfometria do epitélio intestinal:

Cortes histológicos do intestino delgado foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 4000B), em objetiva de 20x. 25 campos histológicos por animal foram analisados no programa Image-Pro Plus versão

6.0 (Media Cybemetics Inc., Silver Spring, MD, USA), onde foram realizadas 30 medidas/foto da altura do epitélio intestinal, que corresponde da base da célula até seu ápice (Figura 5). Protocolo de análise segundo Fanali et al. (2017).

Essas medidas foram analisadas no teste estatístico Two-Way Anova, para verificar a influência das vias de exposição. A análise foi realizada no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

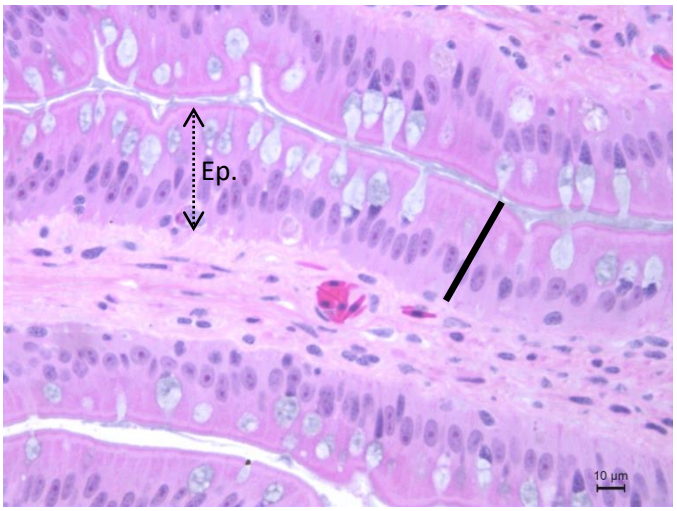

Figura 5 – Morfometria ilustrativa do epitélio intestinal de *P. nattereri*. Observe que a porção epitelial (Ep.) é composta por células colunares com borda em escova. Traço indica a base da célula até seu ápice. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 10µm.

Quantificação de anormalidades nucleares:

Lâminas de sangue foram coradas em Giemsa 7,5% por 15 minutos e analisadas em microscópio de luz (Leica DM 4000B), em objetiva de 100x. Foram analisados 2000 eritrócitos, dos quais foram contabilizadas as anormalidades nucleares: *Bud*, células anucleadas e binucleadas, e micronúcleo – protocolo adaptado de Pérez-Iglesias et al. (2016).

Para analisar a influência do BαP foi retirado a frequência de anormalidades nucleares, de maneira individual e conjunta, presentes nos 2000 eritrócitos. Esses dados foram então analisados no teste GLM, realizado no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

IV – Resultados

A exposição ao BαP provocou alterações nas células pigmentares, na morfologia do epitélio intestinal e na frequência de anormalidades nucleares em *P. nattereri*. Essas alterações foram influenciadas pela via de exposição, com exceção das anormalidades nucleares. Esses resultados serão agrupados e descritos em dois manuscritos: 1) Distintas vias de exposição do benzo-[alfa]-pireno podem potencializar os efeitos genotóxicos e morfológicos no anuro *Physalaemus nattereri*. 2) Exposição aguda ao benzo-[alfa]-pireno altera a pigmentação melânica do anuro *Physalaemus nattereri*: efeitos subletais nos melanócitos e melanomacrófagos.

Resultados

- Resultados do intestino e das células sanguíneas.

  Manuscrito 1: Distintas vias de exposição do benzo-[alfa]-pireno podem potencializar os efeitos genotóxicos e morfológicos no anuro *Physalaemus nattereri*

- Resultados da pigmentação interna.

  Manuscrito 2: Exposição aguda ao benzo-[alfa]-pireno altera a pigmentação melânica do anuro *Physalaemus nattereri*: efeitos subletais nos melanócitos e melanomacrófagos

Resultados do intestino e das células sanguíneas

Manuscrito 1: Distintas vias de exposição do benzo-[alfa]-pireno podem potencializar os efeitos genotóxicos e morfológicos no anuro *Physalaemus nattereri*

Distintas vias de exposição do benzo-[alfa]-pireno podem potencializar os efeitos genotóxicos e morfológicos no anuro *Physalaemus nattereri*

Bruno Serra de Lacerda Valverde[1], Lilian Franco-Belussi[2,3], Classius De Oliveira[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

[2] Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

[3] Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental CCTS, Universidade Federal de São Carlos, 18052-780, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

RESUMO: O benzo-[alfa]-pireno (BαP) é um contaminante ambiental, distribuído pelos ecossistemas aquático e terrestre. Seus efeitos adversos são pouco conhecidos para os anuros e apresentam enfoque nas células pigmentares e no metabolismo. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos do BαP sobre o intestino delgado e nas células sanguíneas de *Physalaemus nattereri*; e testar se os efeitos são influenciados pela via de exposição do BαP. Para isso foram coletados 24 espécimes, os quais receberam BαP diluído em óleo mineral (grupo tratado) ou apenas óleo mineral (grupo controle), administrado por uma via oral ou injetável. O BαP diminui a espessura do epitélio intestinal e aumenta a frequência de anormalidades nucleares, sendo apenas o epitélio intestinal influenciado pela via de exposição. A metabolização do BαP pelo organismo é responsável por gerar metabólitos secundários, que apresentam propriedades carcinogênicas e tóxicas. Esses metabólitos apresentam uma distribuição diferenciada de acordo com a via de exposição, o que influência nos seus efeitos adversos sobre o epitélio intestinal e as células sanguíneas.

Palavras-chave: Anura, Eritrócitos, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, Sistema Digestório, Toxicidade.

INTRODUÇÃO:

O BαP é um Hidrocarboneto Policíclico Aromático mundialmente conhecido por sua propriedade carcinogênica, sendo classificado com agente de grupo 1 – carcinogênico para humanos – pela *International Agency for Research on Cancer* (Caruso & Alaburda, 2008; IARC, 2013). Numerosos estudos com enfoque em sua metabolização e em seus efeitos morfológicos têm sido realizados para diferentes vertebrados, em especial peixes e mamíferos (Autrup *et al.,* 1982; Van Veld *et al.,* 1987 Lemaire *et al.,* 1990, 1992a; Shimizu *et al.,* 2000; Jeng *et al.,* 2013). Estudos envolvendo os anuros, no entanto, são escassos e tem enfoque principal na resposta das células pigmentares (De Oliveira *et al.,* 2017; Fanali *et al.,* 2017, 2018), o que compromete o conhecimento sobre os possíveis efeitos adversos do BαP em diferentes sistemas.

É estabelecido que para o BαP causar seus efeitos adversos, que incluem: carcinogênese, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênese, ele deve ser inicialmente metabolizado pelo organismo, gerando metabólitos reativos (Gelboin, 1980; Quaroni & Isselbacher, 1981; Verma *et al.,* 2012). Estudos demonstraram que o tempo de metabolismo do BαP é influenciado por sua via de exposição, o que influência na quantidade de metabolitos gerados bem como no seu tempo de permanência no organismo; por consequência os efeitos adversos induzidos pelo BαP também são alterados de acordo com a via de exposição (Lemaire *et al.,* 1990, 1992a, 1992b; Monreau & Bouchard, 2015).

Lemaire et al. (1992b) observou que o BαP, quando administrado por via oral , é quase exclusivamente encontrado no fígado, intestino, rins e na vesícula biliar. Isto demonstra que o BαP é absorvido e metabolizado pelo intestino e transportado, via

corrente sanguínea, para diferentes órgãos. Dessa forma o intestino e as células sanguíneas são potenciais alvos para os efeitos adversos do BαP.

O presente trabalho propõe analisar a influência da via de exposição nos efeitos adversos do BαP no intestino delgado um órgão com capacidade de metabolizar o BαP (Autrup *et al.*, 1977; James *et al.*, 1997), e nos eritrócitos, um tipo celular utilizado em estudos ecotoxicológicos para compostos com propriedades genotóxicas (Fenech, 2007; Muranli & Güner, 2011), de *Physalaemus nattereri*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animal experimental:

24 exemplares machos de *Physalaemus nattereri* (Peso: 7,8 ± 0,6g SE) foram coletados na região de São José do Rio Preto (Coordenadas: 20º49'12'' S, 49º22'44'' O), durante o período reprodutivo em fevereiro de 2016 (IBAMA nº 18573-1). Os espécimes foram mantidos em um laboratório com regime de temperatura e de luminosidade naturais (27 ± 0,5ºC; 12h:12h claro/escuro), por nove dias. Os espécimes foram mantidos em caixas plásticas (dimensões: 25x16x13 cm), contendo terra e água, fornecida "*ad libitum*".

Experimento com BαP:

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP – CSJRP (nº. 145/2016). Os espécimes do grupo tratamento (n=12) receberam uma única dose (3mg/kg) de BαP diluído em 0,02mL de óleo mineral (Farmax), administrado por via oral (n=6) e via injetável (n=6). Essa concentração foi estabelecida com base no levantamento da literatura (Padros *et al.*,

2003; Barakat *et al*., 2011; Fanali *et al*., 2017). Para o grupo controle (n=12) os animais receberam apenas 0,02mL de óleo mineral, administrado da mesma forma.

Ao término do tempo experimental de três dias, os espécimes foram anestesiados localmente no membro posterior com xylocaína para a coleta de amostras sanguíneas, as quais foram fixadas em lâmina de vidro, com metanol a 4ºC por 20 minutos. Posteriormente os espécimes foram eutanasiados com dose letal de benzocaína (5g/L) e dissecados. Fragmentos do intestino delgado foram coletados e fixados em solução de karnovisky (0,1M tampão fosfato Sörensen, tampão fosfato pH 7.2 com 5% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) a 4ºC por 24 horas. Posteriormente os órgãos foram lavados em água destilada, desidratados em série alcoólica crescente, sendo incluídos em historresina (Leica historesin embedding kit). Cortes histológicos de 2µm foram obtidos em um micrótomo rotativo (Leica RM2255).

Análise morfométrica do epitélio intestinal:

Cortes histológicos do intestino delgado foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 4000B), em objetiva de 20x. 25 campos histológicos por animal foram analisados no programa Image-Pro Plus versão 6.0, onde foram realizadas 30 medidas/foto da altura do epitélio intestinal – metodologia de análise segundo Fanali (2017).

Essas medidas foram analisadas no teste estatístico Two-Way Anova, para verificar a influência das vias de exposição. A análise foi realizada no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

Análise de anormalidades nucleares:

Lâminas de sangue foram fixadas em Metanol a 4ºC, coradas em Giemsa 7,5% por 15 minutos e analisadas em microscópio de luz (Leica DM 4000B), em objetiva de 100x. Foram analisados 2000 eritrócitos, dos quais foram contabilizadas as anormalidades nucleares: *Bud*, células anucleadas e binucleadas, e micronúcleo - protocolo adaptado de Pérez-Iglesias et al. (2016).

Para analisar a influência do BαP foi retirado a frequência de anormalidades nucleares, de maneira individual e conjunta, presentes nos 2000 eritrócitos. Esses dados foram então analisados no teste Two-Way ANOVA, realizado no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

RESULTADOS

Morfometria do epitélio intestinal:

O BαP diminui a espessura do epitélio intestinal. Esta diminuição ocorreu tanto para a via oral (Gavagem Controle: 45,6 ± 1,7 µm SE; Gavagem Tratamento: 43,3 ± 1,8 µm - $P<0,01$) como para a via injetável (Injetável Controle: 46 ± 1,4 µm; Injetável Tratamento: 45,3 ± 2,7 µm - $P<0,01$); sendo que a via de exposição influenciou nos efeitos do BαP ($P<0,01$) (Figura 1 e 2).

Quantificação de anormalidades nucleares:

A frequência de micronúcleos (Figura 3; Tabela 1) nas células sanguíneas não apresentou variação significativa devido ao tratamento com o BαP ($P<0,135$) ou com relação às vias de exposição ($P<0,207$). Outras anormalidades nucleares (Figura 3; Tabela 1) como: *bud*, células anucleadas e binucleadas quando analisadas em conjunto com os micronúcleos apresentaram um aumento devido ao BαP ($P<0,01$), no entanto a via de exposição não influenciou esses resultados ($P<0,03$).

DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu o potencial tóxico do BαP no epitélio intestinal e nos eritrócitos de *P. nattereri*. Até o presente momento, esse foi o primeiro trabalho que analisou a influência da via de exposição sobre os efeitos adversos do BαP no epitélio intestinal e nos eritrócitos de anuros.

O BαP, exposto por via oral e injetável, induziu uma diminuição na espessura do epitélio intestinal. Esse resultado sugere que o BαP foi metabolizado pelo organismo, gerando metabólitos secundários com propriedades tóxicas, que podem alterar a morfologia das células epiteliais (Lemaire *et al.*, 1990, 1992b; Miller & Ramos, 2001). Autrup et al. (1977, 1982) e Van Veld et al. (1988), utilizando mamíferos e peixes, demonstraram a capacidade do intestino em metabolizar o BαP; sendo esse metabolismo influenciado pela via de exposição. Lemaire et al. (1990, 1992b), utilizando *Dicentrarchus labrax* (peixe), observaram que o tempo de meia-vida do BαP no intestino varia de acordo com a via de exposição, sendo de 5.1 dias para a via injetável e 3.3 dias para a via oral. Isso demonstra que o tempo de metabolismo do BαP e o tempo que ele permanece no órgão são dependentes da via de exposição. Esses resultados justificam a espessura do epitélio intestinal apresentar uma diminuição mais acentuada na via oral. Nessa via o BαP apresentaria uma meia-vida menor, sendo metabolizado mais rapidamente, e por conseqüência seus efeitos adversos seriam causados em um curto espaço de tempo, com um maior tempo de duração; levando a uma diminuição mais acentuada na espessura do epitélio.

Stohs et al. (1977) e Cavret e Feidt (2005) demonstraram que o metabolismo do BαP no intestino, é desempenhado pelas células epiteliais, as quais estão sujeitas aos seus efeitos adversos. Esses efeitos são descritos por Fanali et al. (2017), que observaram a diminuição do epitélio intestinal de *Hypsiboas albopunctatus*, após três

dias de exposição ao BαP. Esse resultado é similar ao observado em nosso estudo; sendo o único trabalho encontrado que também analisa a morfologia do epitélio intestinal de anuros, expostos ao BαP. Essas alterações demonstram o potencial tóxico do BαP sobre o intestino; no entanto não podemos afirmar se a diminuição na espessura do epitélio leva a um comprometimento funcional do órgão. Para confirmarmos isso, serão necessários estudos complementares.

No presente estudo, observamos que o BαP também foi responsável por aumentar a frequência de anormalidades nucleares; as quais não foram influenciadas pela via de exposição. Essas anormalidades também foram observadas em espécimes larvais de anuros; onde foi descrito um aumento na frequência de micronúcleos (Sadinski *et al.*, 1995). Esses resultados demonstram o efeito sistêmico induzido pelo BαP e corroboram nossa premissa de que o BαP foi metabolizado pelo organismo (incluindo o intestino) e que foram gerados metabólitos secundários com propriedades tóxicas; os quais são distribuídos pelo organismo através da circulação sanguínea.

CONCLUSÃO

Concluímos que o tratamento com o BαP é responsável por diminuir a espessura do epitélio intestinal e aumentar a frequência de anormalidades nucleares nas células sanguíneas de *P. nattereri*. Além disso, a diminuição da espessura do epitélio intestinal sofre influência da via de exposição do BαP, tendo uma diminuição mais acentuada na via oral do que na injetável. Isto demonstra que diferentes vias influenciam nos efeitos do BαP e conseqüentemente na resposta dos diferentes sistemas de anuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTRUP, H.; GRAFSTROM, R.C.; BRUGH, M.; LECHNER, J.F.; HAUGEN, A.; HARRIS, C.C. 1982. Comparison of Benzo(a)pyrene metabolism in bronchus, esophagus, colon, and duodenum from the same individual. **Cancer Research.** 42: 934-938.

AUTRUP, H.; HARRIS, C.C.; FUGARO, S.; SELKIRK, J.K. 1977. Effect of various chemicals on the metabolismo of Benzo(a)pyrene by cultured rat colon. **Chemico–Biological Interactions.** 18: 337-347.

BARAKAT, A.O.; MOSTAFA, A.; WADE, T.L.; SWEET, S.T.; El SAYED, N.B. 2011. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean costal environment of Egypt. **Marine Pollution Bulletin.** 62: 1969-1978.

CARUSO, M.S.F.; ALABURDA, J. 2008. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** 67: 1-27.

CAVRET, S.; FEIDT, C. 2005. Intestinal metabolismo of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. **Environmental Research.** 98: 22-32.

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L.Z.; SANTOS, L.R.S. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. In: LARRAMENDY, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models.** Croydon: The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 125-142.

FANALI, L.Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; OLIVEIRA, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution.** 237: 93-102.

FANALI, L.Z.; VALVERDE, B.S.L.; FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D.B.; OLIVEIRA, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. **Amphibia-Reptilia.** 38: 175-185.

FENECH, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols.** 2: 1084-1104.

GELBOIN, H.V.; 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidase and related enzymes. **Physiological Reviews.** 60: 1107-1166.

IARC, International Agency for Research on Cancer. 2013. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 103.
Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol103/index.php
Acesso em: Março de 2018.

JAMES, M.O.; ALTMAN, A.H.; MORRIS, K.; KLEINOW, K.M.; TONG, Z. 1997. Dietary modulation of phase 1 and phase 2 activities with benzo(a)pyrene and related compounds in the intestine but not the liver of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Drug Metabolism and Disposition.** 25: 346-354.

JENG, H.A.; YORDT, D.; DAVIS, S.; SWANSON, J.R. 2013. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by subchronic exposure to benzo(a)pyrene via oral administration. **Environmental Toxicology.** 30: 1-8.

LEMAIRE, P.; BERHAUT, J.; LEMAIRE-GONY, S.; LAFAURIE, M. 1992a. Ultrastructural changes induced by benzo[a]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route. **Enviromental research.** 57: 59-72.

LEMAIRE, P.; LEMAIRE-GONY, S.; BERHAUT, J.; LAFAURIE, M. 1992b. The uptake, metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene administred by force-feeding in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 23: 244-251.

LEMAIRE, P.; MATHIEU, A.; CARRIERE, S.; DRAL, P.; GIUDICELLI, J.; LAFAURIE, M. 1990. The uptake metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 20: 223-233.

MILLER, K.P.; RAMOS, K.S. 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews.** 33: 1-35.

MOREAU, M; BOUCHARD, M. 2015. Comparison of the kinetics of various biomarkes of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. **Journal of Applied Toxicology.** 35: 781-790.

MURANLI, F.D.G.; GUNER, U. 2011. Inductuion of micronuclei and nuclear abnormalities in erithrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyalothrin. **Mutation Research.** 726: 104-108.

PADRÓS, J., PELLETIER, É., RIBEIRO, C.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 192: 45-55.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes response in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research.** 23: 9852-9861.

QUARONI, A.; ISSELBACHER, K.J. 1981. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. **Journal of the National Cancer Institute.** 67: 1353-1362.

SADINSKI, W.J.; LEVAY, G.; WILSON, M.C.; HOFFMAN, J.R.; BODELL, W.J.; ANDERSON, S.L. 1995. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology.** 32: 333-352.

SHIMIZU, Y.; NAKATSURU, Y.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; KUME, H.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; ISHIKAWA, T. 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **PNAS.** 97: 779-782.

STOHS, S.J.; GRAFSTRGM, R.C.; BURKE, M.D.; ORRENIUS, S. 1977. Benzo(a)pyrene metabolism by isolated rat intestinal epithelial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 179: 71-80.

VAN VELD, P.A.; PATTON, J.S.; LEE, R.F. 1988. Effect of preexposure to dietary Benzo[a]pyrene (BP) on the first-pass metabolism of BP by the intestine of toadfish (*Opsanus tau*): in vivo studies using portal vein-catheterized fish. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 92: 255-265.

VAN VELD, P.A.; VETTER, R.D.; LEE, R.F.; PATTON, J.S. 1987. Dietary fat inhibits the intestinal metabolismo f the carcinogen benzo[a]pyrene in fish. **Journal of Lipid Research.** 28: 810-817.

VERMA, N.; PINK, M.; RETTENMEIER, A.W.; SCHMITZ-SPANKE, S. 2012. Review on the proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. **Proteomics.** 12: 1731-1755.

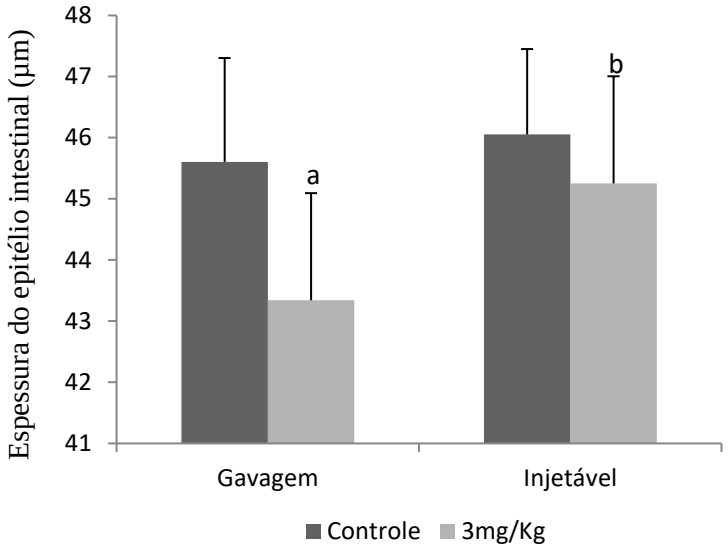

Figura 1 – Variação na espessura do epitélio intestinal. Letras diferentes ('a' e 'b') indicam variação estatisticamente significativa entre os animais do tratamento com o controle do mesmo tratamento. *P*<0,01.

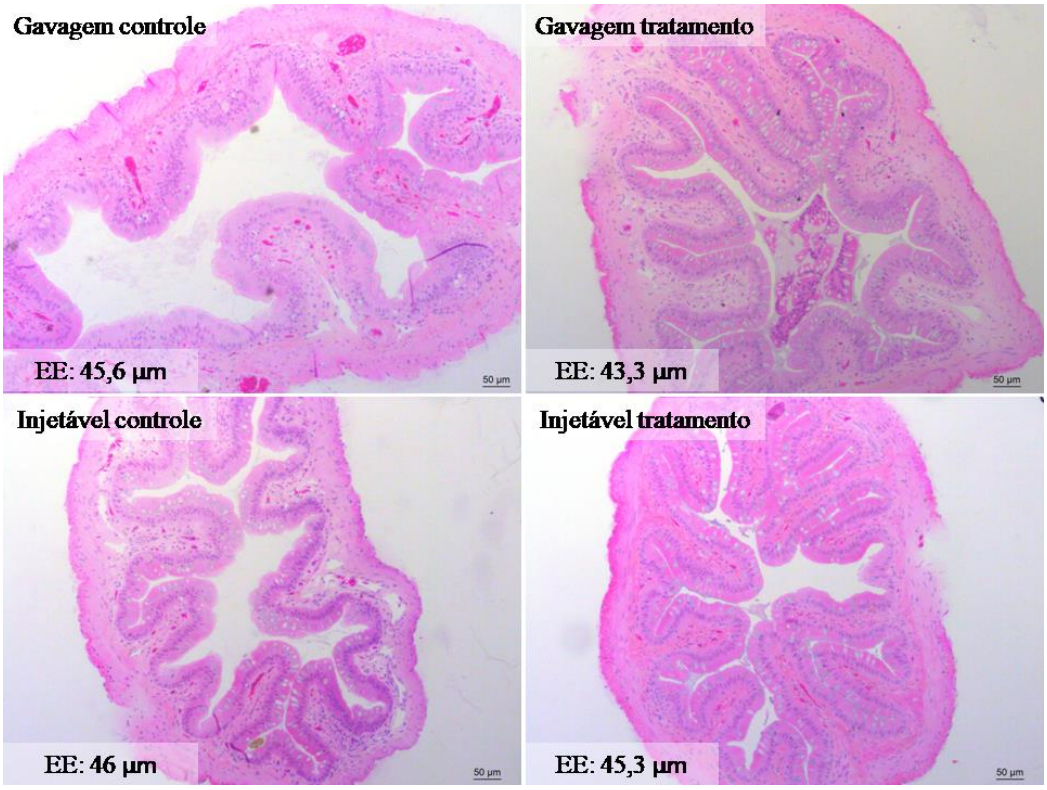

Figura 2 – Fotomicrografias do intestino delgado demonstrando a variação média da espessura do epitélio (EE). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 50µm

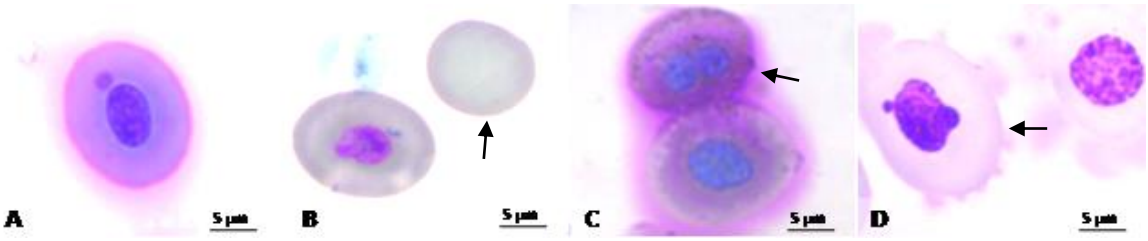

Figura3 – Fotomicrografias das anormalidades nucleares observadas nos eritrócitos de *P. nattereri*. A – micronúcleo; B – célula anucleada (seta); C – célula binucleada (seta); D – *Bud* (seta). Coloração: Giemsa. Barras: 5µm.

Tabela 1 – Frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos de *P. nattereri*. GC: Gavagem Controle; GT: Gavagem Tratamento; IC: Injetável Controle; IT: Injetável Tratamento; MN: Micronúcleo.

Grupo	MN	Anucleada	Binucleada	*Bud*	Total
GC	2,16 ± 1,04	0,16 ± 0,16	0,16 ± 0,16	0,33 ± 0,33	2,83 ± 1,19
GT	1,83 ± 0,60	0,66 ± 0,21	0,33 ± 0,21	1 ± 0,44	3,66 ± 0,76*
IC	1,66 ± 1,17	0 ± 0	0,16 ± 0,16	0 ± 0	1,83 ± 1,13
IT	1,16 ± 0,40	0,33 ± 0,21	0,66 ± 0,21	0 ± 0	2,16 ± 0,04*

N = 6 espécimes por grupo, 2000 células analisadas por animal (12000 por grupo). Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle *P<0,01.

Resultados das células pigmentares

Manuscrito 2: Exposição aguda ao benzo-[alfa]-pireno altera a pigmentação melânica do anuro *Physalaemus nattereri*: efeitos subletais nos melanócitos e melanomacrófagos

Exposição aguda ao benzo-[alfa]-pireno altera a pigmentação melânica do anuro *Physalaemus nattereri*: efeitos subletais nos melanócitos e melanomacrófagos

Bruno Serra de Lacerda Valverde[1], Lilian Franco-Belussi[2,3], Classius De Oliveira[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

[2] Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

[3] Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental CCTS, Universidade Federal de São Carlos, 18052-780, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os anuros possuem células pigmentares internas, que atuam na proteção do organismo contra xenobióticos. Essas células são denominadas de melanócitos e melanomacrófagos, e têm sido utilizadas para verificar os efeitos do benzo-[alfa]-pireno (BαP). O BαP é um agente carcinogênico e tóxico, com capacidade de acumular/reter em tecidos pigmentados, levando a uma diminuição no seu conteúdo de melanina. Estudos têm demonstrado que a distribuição e a meia-vida do BαP, são influenciados por sua via de exposição, o que afeta seus efeitos adversos no organismo. O Objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos do BαP sobre as células pigmentares de *Physalaemus nattereri* e se esses efeitos são influenciados pela via de exposição. Para isso foram utilizados 24 espécimes, os quais receberam o BαP (tratado) ou óleo mineral (controle) por uma via oral ou injetável. Nossos resultados demonstraram que a pigmentação interna de *P. nattereri* sofre uma variação, sendo influenciada pela via de exposição. Trabalhos têm demonstrado que o metabolismo do BαP é capaz de gerar radicais livres, que regulam negativamente a melanogênese, diminuindo a melanina nos tecidos; bem como metabólitos secundários, que causam diferentes efeitos adversos ao organismo. Considerando isso, acreditamos que a via de exposição influência na distribuição desses radicais livres e metabólitos secundários, o que provoca a alteração na pigmentação dos melanócitos e melanomacrófagos.

Palavras-chave: Anfíbios, Fígado, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, Pigmentação Visceral, Testículos.

INTRODUÇÃO:

Os anuros representam a classe com maior diversidade de espécies dentre os anfíbios, apresentando 6806 espécies (Frost, 2017). Entretanto, desde a década de 1980 tem sido relatado o declínio populacional dos anuros (Matton, 2001), sendo uma das causas a poluição de seus habitats (Blaustein *et al.,* 2003; Bruhl *et al.,* 2013). Características como: ausência de casca nos ovos, ciclo de vida com alternância de um estádio larval aquático para um adulto terrestre e elevada permeabilidade do sistema tegumentar tornam os anuros susceptíveis a contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres; dentre eles o BαP (Wilcke *et al.,* 2003; Blaustein & Bancroft, 2007; Nasr *et al.,* 2010; Gupta *et al.,* 2011; Brodeur & Candioti, 2017).

O BαP é um Hidrocarboneto Policíclico Aromático mundialmente conhecido por causar alterações morfológicas em diferentes sistemas de vertebrados (Sadinski *et al.,* 1995; Shimizu *et al.,* 2000; Jeng *et al.,* 2013). Estas alterações sofrem influência da via de exposição do BαP (Lemaire *et al.,* 1992a) e são ocasionadas após sua metabolização pelo organismo, onde são gerando metabólitos responsáveis por causar efeitos: carcinogênicos, citotóxicos, mutagênicos e toxicidade reprodutiva (Gelboin, 1980; Quaroni & Isselbacher, 1981; Lemaire *et al.,* 1990; Shimizu *et al.,* 2000; Jeng *et al.,* 2013). Estudos demonstraram que o BαP tem a capacidade de acumular/reter em tecidos contendo melanina (Roberto *et al.,* 1996), além de reduzir a área de melanina desses tecidos (De Oliveira *et al.,* 2017; Fanali *et al.,* 2017, 2018).

Tecidos contendo melanina são freqüentemente observados em anuros (Moresco & Oliveira, 2009; Franco-Belussi *et al.,* 2012). Esses tecidos são constituídos por dois tipos de células pigmentares: os melanócitos e os melanomacrófagos que apresentam a capacidade de sintetizar e armazenar melanina endogenamente (Roberts, 1975; Purrello *et al.,* 2001; Colombo *et al.,* 2011; Franco-Belussi *et al.,* 2013; Videira *et al.,* 2013). Os

melanócitos são células pigmentares derivadas da crista neural ectodérmica e são encontrados em membranas de revestimento e órgãos não hematopoiéticos, como por exemplo: coração, intestino, mesentério, nervos, peritônio parietal, pulmões e nos rins (Zuasti *et al.,* 1998; Moresco & Oliveira, 2009; Colombo *et al.,* 2011; Franco-Belussi & Oliveira, 2011; Franco-Belussi *et al.,* 2017). Os melanomacrófagos, por sua vez, são derivados de células-tronco hematopoiéticas, sendo encontrados no baço e no fígado (Roberts, 1975; Agius, 1980). Ambas as células pigmentares apresentam função relacionada com a própria melanina, que atua na neutralização de agentes bacterianos e como *scavenge* de radicais livres (Wolk *et al.,* 1985; Sichel, 1988). Os melanomacrófagos ainda apresentam atividade fagocítica (Christiansen *et al.,* 1996) e atuam na detoxificação de xenobióticos (Sichel, 1988; Fenoglio *et al.,* 2005; Pérez-Iglesias *et al.,* 2016).

O presente estudo propõe analisar os efeitos do BαP sobre as células pigmentares de *Physalaemus nattereri* e se esses efeitos são influenciados pela via de exposição do BαP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animal experimental:

24 exemplares machos de *Physalaemus nattereri* (Peso: 7,8 ± 0,6g SE) foram coletados na região de São José do Rio Preto (Coordenadas: 20º49’12’’ S, 49º22’44’’ O), durante o período reprodutivo em fevereiro de 2016. Os espécimes foram mantidos em um laboratório com regime de temperatura (27 ± 0,5ºC) e de luminosidade naturais, por nove dias. Os espécimes foram mantidos em caixas plásticas (dimensões: 25x16x13 cm), contendo terra e água.

Experimento com BαP:

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP – CSJRP (nº. 145/2016). Os espécimes do grupo tratamento (n=12) receberam uma única dose (3mg/kg) de BαP diluído em 0,02mL de óleo mineral (Farmax), administrado por via oral (n=6) e via injetável (n=6). Essa concentração foi estabelecida com base no levantamento da literatura (Padros *et al*., 2003; Barakat *et al*., 2011; Fanali *et al*., 2017). Para o grupo controle (n=12) os animais receberam apenas 0,02mL de óleo mineral, administrado da mesma forma.

Ao término do tempo experimental de três dias, os espécimes foram eutanasiados em dose letal de benzocaína (5g/L) e dissecados. Fragmentos do fígado e dos testículos foram coletados e fixados em solução de karnovisky (0,1M tampão fosfato Sörensen, tampão fosfato pH 7.2 com 5% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) a 4ºC por 24h. Posteriormente os órgãos foram lavados em água destilada, desidratados em série alcoólica crescente, sendo incluídos em historresina (Leica historesin embedding kit). Cortes histológicos de 2µm foram obtidos em um micrótomo rotativo (Leica RM2255).

Após a dissecação os espécimes foram fixados em formol 10% por 24h, sendo mantidos em álcool 70%, como materiais testemunho, junto ao Laboratório de Anatomia Comparada (IBILCE/UNESP) para análise da pigmentação na superfície dos órgãos.

Quantificação da área de melanina:

Cortes histológicos do fígado e do testículo foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 4000B) em objetiva de 20x. 25 campos histológicos, por animal, foram analisados no programa Image-Pro Plus

versão 6.0, onde foi realizada a quantificação da área de melanina por diferença de intensidade de coloração.

Para verificar a influência da via de exposição sobre os efeitos do BαP utilizamos o teste Two-Way ANOVA, realizado no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

Quantificação da pigmentação na superfície dos órgãos:

Para a quantificação da pigmentação na superfície dos órgãos utilizamos o protocolo estabelecido por Franco-Belussi et al. (2017), que utiliza dados categóricos (0, 1, 2 e 3) para quantificar a intensidade de coloração de diferentes órgãos e tecidos. A categoria 0 é referente a ausência de pigmentação, enquanto a categoria 3 a pigmentação total do órgão/tecido. Nesse trabalho realizamos a análise do: coração, pericárdio e vasos da base do coração, peritônio parietal lumbo-sacral, plexo nervoso lombar, pulmões, rins e testículos.

Para analisarmos a variação da pigmentação nos diferentes órgãos e tecidos e a influência da via de exposição utilizamos o teste G para dados categóricos com múltiplas categorias, código fornecido por Peter Hurd (Disponível em: http://www.psych.ualberta.ca/~phurd/cruft/g.test.r). A análise foi realizada no programa R versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2010).

RESULTADOS

Pigmentação hepática:

A exposição ao BαP provocou uma variação na área de melanina dos melanomacrófagos. Esta variação apresentou-se como um aumento para a via oral (Gavagem Controle: 1173,1 ± 379,3 μm^2 SE; Gavagem Tratamento: 1515,9 ± 394,4

μm^2 - $F_{(1,298)}$= 14,66; P<0,01) e uma diminuição na via injetável (Injetável Controle: 860,5 ± 251,3 μm^2; Injetável Tratamento: 604,8 ± 211,7 μm^2 - $F_{(1,297)}$=6,27; *P*<0,01); ocorrendo uma diferença entre as vias de exposição ($F_{(1,596)}$= 110,197; *P*<0,01) (Figura 1 e 2).

Pigmentação testicular:

O BαP diminui a área de melanina dos melanócitos testiculares. Esta diminuição ocorreu tanto para a via oral (Gavagem Controle: 1429,9 ± 541,2 μm^2 SE; Gavagem Tratamento: 1190,9 ± 616,4 μm^2 - $F_{(1,298)}$= 26,25; *P*<0,01) como para a via injetável (Injetável Controle: 1264,9 ± 315 μm^2; Injetável Tratamento: 856,6 ± 189,1 μm^2 - $F_{(1,298)}$= 6,609; *P*<0,01); sendo que a via de exposição influenciou nos efeitos do BαP ($F_{(1,596)}$= 8,135; *P*<0,01) (Figura 3 e 4).

Pigmentação visceral:

O BαP aumenta a pigmentação do peritônio parietal (G= 24.96; Df= 9; *P*= 0,003) e dos pulmões (G= 12.41; Df= 9; *P*= 0,019), quando exposto por via oral e injetável; enquanto que a pigmentação do testículo (G= 19.66; Df= 9; *P*= 0,02) diminui na via oral e aumenta na injetável, sendo o único órgão influenciado pela via de exposição do BαP (Figura 5).

Os demais órgãos: coração (G= 13.35; Df= 9; *P*= 0,1), pericárdio (G= 10.07; Df= 9; *P*= 0,34), plexo nervoso (G= 14.53; Df= 9; *P*= 0,1) e rins (G= 11.46; Df= 9; *P*= 0,24) não apresentaram variação em sua pigmentação devido ao BαP (Figura 6).

DISCUSSÃO:

Efeitos do BαP nos melanócitos testiculares e melanomacrófagos hepáticos:

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a influência da via de exposição sobre os efeitos adversos do BαP sobre as células pigmentares de *P. nattereri*. Estudos recentes demonstraram a capacidade do BαP em provocar alterações na pigmentação interna de anuros, especialmente no fígado e nos testículos (Regnault *et al.,* 2014; De Oliveira *et al.,* 2017; Fanali *et al.,* 2017, 2018). No entanto o mecanismo pelo qual o BαP altera a pigmentação nesses órgãos é pouco conhecido, sendo atribuído a alterações fisiológicas das células pigmentares e dos órgãos em que elas se encontram (Regnaul *et al.,* 2014; Fanali *et al.,* 2017, 2018).

Após três dias de exposição, a área de melanina dos melanomacrófagos hepáticos apresentou um aumento e uma diminuição. Esses resultados são similares aos descritos por De Oliveira et al. (2017) e por Fanali et al. (2017, 2018), que observaram a mesma resposta pigmentar em diferentes espécies de anuros (*Hypsiboas albopunctatus*, *Leptodactylus fuscus* e *Physalaemus cuvieri*). Nesses trabalhos a variação da área de melanina foi influenciada pela concentração e pelo tempo de exposição ao BαP. Em nosso trabalho a via de exposição foi à responsável por influenciar a pigmentação dos melanomacrófagos; sendo evidenciado pela diminuição na via injetável e pelo aumento na via oral. Regnault et al. (2014) também observou uma diminuição na área pigmentar dos melanomacrófagos de *Xenopus tropicalis*. O pesquisador atribuiu essa diminuição a uma possível desregulação no metabolismo de lipídios, que por consequência induziu um estresse oxidativo e uma apoptose dos hepatócitos. A via de exposição do BαP também influenciou na pigmentação dos melanócitos testiculares de *P. nattereri*, onde foi observada uma diminuição na via injetável e na oral; sendo mais acentuada na via injetável. Essa diminuição também é descrita por De Oliveira et al. (2017) para as espécies *P. cuvieri* e *P. nattereri*. Isto pode estar relacionado com uma interferência síntese da melanina pelas células pigmentares.

É estabelecido que o BαP deve ser metabolizado para desempenhar seus efeitos adversos (Gelboin, 1980). Lemaire et al. (1990), utilizando o peixe *Dicentrarchus labrax* demonstrou que múltiplos órgãos tem a capacidade de metabolizar o BαP; sendo esse metabolismo influenciado pela via de exposição (Lemaire *et al.*,1990, 1992b), uma vez que a via altera a distribuição do BαP, e de seus metabólitos, pelo organismo (Monreau & Bouchard, 2015). Isso demonstra que a distribuição, tempo de metabolismo e a quantidade de metabólitos gerados no organismo são dependentes da via de exposição, o que influência diretamente nos seus efeitos adversos, como visto em nossos resultados.

Roberto et al. (1996) demonstraram que o BαP tem a capacidade de acumular/reter em tecidos pigmentados, além de inibir a melanogênese, levando a uma diminuição no conteúdo de melanina (Joo *et al.,* 2015). Dessa forma, para a via injetável, hipotetizamos que o BαP se espalha por todo o organismo, ficando retido em tecidos pigmentados (Roberto *et al.,* 1996), como o fígado e o testículo. Nesses órgãos ocorreria a metabolização do BαP, gerando metabólitos carcinogênicos e citotóxicos (Gelboin, 1980) que causariam a diminuição da área pigmentar em ambos os órgãos. Com relação à via oral, hipotetizamos que a distribuição do BαP fica retida principalmente ao sistema digestório, onde ocorre sua absorção e metabolização pelo intestino delgado (Autrup *et al.,* 1977; Lemaire *et al.,* 1992b), onde são gerados seus metabólitos (Gelboin, 1980). Esses metabólitos são encaminhados ao fígado, pelo sistema porta-hepática, onde induziriam uma resposta fisiológica dos melanomacrófagos contra xenobióticos externos (Pérez-Iglesias *et al.,* 2016); por consequência ocorre o aumento da área pigmentar. Como o testículo é um órgão não relacionado ao sistema digestório apenas uma pequena quantidade de metabólitos atingiria o órgão, onde causariam a diminuição da área de melanina; uma vez que não

há relatos que os melanócitos testiculares atuam na detoxificação de xenobióticos (Franco-Belussi *et al.*, 2013). No entanto essa diminuição da área pigmentar é menos acentuada do que na via injetável, uma vez que uma menor quantidade de metabólitos esta presente no órgão.

Efeitos do BαP na pigmentação visceral:

O BαP também é responsável por induzir uma variação na pigmentação visceral de *P. nattereri*, ocorrendo um aumento da pigmentação do peritônio e do pulmão em ambas as vias de exposição. Já a pigmentação na superfície dos testículos aumentou na via injetável e diminuiu na oral, demonstrando a influência da via de exposição sobre os efeitos do BαP. Essa é a primeira vez que a pigmentação na superfície dos órgãos de anuros é utilizada como um possível biomarcador morfológico para os efeitos do BαP, sendo essa pigmentação já utilizada para avaliar efeitos de outros fatores abióticos e contaminantes de anuros (Franco-Belussi *et al.*, 2013, 2018).

A resposta da pigmentação visceral do peritônio e do pulmão foi distinta da observada para os melanomacrófagos e melanócitos testiculares, o que pode estar relacionado com o tempo de meia-vida do BαP em cada órgão. Lemaire et al. (1990, 1992b) demonstrou que, dependendo da via de exposição, cada órgão apresenta um tempo de meia-vida para o BαP, variando de 0.79 dias até 12.4 dias. O peritônio e o pulmão de *P. nattereri* podem apresentar um maior tempo de meia-vida para o BαP, onde seus efeitos adversos podem estar ocorrendo com uma maior defasagem de tempo; ou podem ainda apresentarem um menor tempo de meia-vida, onde o aumento da pigmentação é uma resposta compensatória aos efeitos já desencadeados pelo BαP. No caso da pigmentação visceral do testículo, a via injetável levou a uma diminuição da sua pigmentação, sendo o mesmo observado na histologia do órgão. Já a via oral levou um aumento da pigmentação, o que foi oposto aos resultados histológicos. Isso pode estar

relacionada com uma diferença na função da pigmentação melânica na superfície dos órgãos, que atuam na proteção contra a radiação ultravioleta (Franco-Belussi *et al.*, 2016) e na resposta imune inata (Franco-Belussi *et al.*, 2018), enquanto a melanina localizada internamente no tecido pode estar relacionada na proteção das células germinativas contra radicais livres por exemplo.

CONCLUSÃO

Concluímos que o tratamento com o BαP é responsável por provocar uma variação na pigmentação hepática, testicular e visceral de *P. nattereri*. Além disso, a variação da área pigmentar sofre influência da via de exposição; onde a via injetável promove uma diminuição na área de melanina do fígado e do testículo; e um aumento na pigmentação visceral do peritônio, pulmões e testículos; e a via oral promove uma diminuição na área de melanina e na pigmentação visceral do testículo; e um aumento na pigmentação do fígado, peritônio e pulmões. Esses resultados são inéditos na literatura sendo importantes no campo da ecotoxicologia e da herpetologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology.** 191: 11-31.

AUTRUP, H.; HARRIS, C.C.; FUGARO, S.; SELKIRK, J.K. 1977. Effect of various chemicals on the metabolismo of Benzo(a)pyrene by cultured rat colon. **Chemico-Biological Interactions.** 18: 337-347.

BARAKAT, A.O.; MOSTAFA, A.; WADE, T.L.; SWEET, S.T.; El SAYED, N.B. 2011. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean costal environment of Egypt. **Marine Pollution Bulletin.** 62: 1969-1978.

BLAUSTEIN, A.R.; BANCROFT, B.A. 2007. Amphibian population declines: evolutionary considerations. **BioScience.** 57: 437- 444.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions.** 9: 123-140.

BRODEUR, J.C.; CANDIOTI, J.V. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the pampa region of Argentina. In: LARRAMENDY, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models.** Croydon: The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 163-194.

BRUHL, C.A.; SCHIMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? **Scientific Reports.** 3: 1-4.

CHRISTIANSEN, J.L.; GRZYBOWSKI, J.M; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research.** 9: 185-190.

COLOMBO, S.; BERLIM, I.; DELMAS, V.; LARUE, L. Classical and non-classical melanocytes in vertebrates. In: BOROVANSKY, J.; RILEY, P. (Ed.). **Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions.** Wiley-Blackwell, 2011. p. 21-62.

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L.Z.; SANTOS, L.R.S. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. In: LARRAMENDY, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models.** Croydon: The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 125-142.

FANALI, L.Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; OLIVEIRA, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution.** 237: 93-102.

FANALI, L.Z.; VALVERDE, B.S.L.; FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D.B.; OLIVEIRA, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. **Amphibia-Reptilia.** 38: 175-185.

FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 60: 259-268.

FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A.M.L.; OLIVEIRA, C. 2013. Responses of melanocyte and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^4, D-Phe^7-α-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. **Zoology.** 116: 316-324.

FRANCO-BELUSSI, L. FANALI, L.Z.; DE OLIVEIRA, C. 2018. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** 180: 109-117.

FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. 2011. Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). **Zoology.** 114: 298-305.

FRANCO-BELUSSI, L. PROVETE, D.B.; DE OLIVEIRA, C. 2017. Environmental correlates of internal coloration in frogs vary throughout space and lineages. **Ecology and Evolution.** 7: 9222-9233.

FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2012. Visceral pigmentation in three species of the genus *Scinax* (Anura: Hylidae): distinct morphological pattern. **The Anatomical Records.** 295: 298-306.

FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H.N.; OLIVEIRA, C. 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology.** 219: 1378-1383.

FROST, D.R. 2017. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA.Eletronic database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html
Acesso em: Novembro de 2017.

GELBOIN, H.V.; 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidase and related enzymes. **Physiological Reviews.** 60: 1107-1166.

GUPTA, S.; KUMAR, K.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, A.; JAIN, V.K. 2011. Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle samples from the atmospheric environment of Delhi, India. **Science of the total environment.** 409: 4674-4680.

JENG, H.A.; YORDT, D.; DAVIS, S.; SWANSON, J.R. 2013. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by subchronic exposure to benzo(a)pyrene via oral administration. **Environmental Toxicology.** 30: 1-8.

JOO, D.H.; CHA, H.J.; KIM, K.; JUNG, M.; KO, J.M.; AN, I.S.; LEE, S.N.; JANG, H.H.; BAE, S.; ROH, N.K.; AHN, K.J.; AN, S. 2015. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. **Molecular & Cellular Toxicology.** 11: 349-355.

LEMAIRE, P.; BERHAUT, J.; LEMAIRE-GONY, S.; LAFAURIE, M. 1992a. Ultrastructural changes induced by benzo[a]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route. **Enviromental research.** 57: 59-72.

LEMAIRE, P.; LEMAIRE-GONY, S.; BERHAUT, J.; LAFAURIE, M. 1992b. The uptake, metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene administred by force-feeding in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 23: 244-251.

LEMAIRE, P.; MATHIEU, A.; CARRIERE, S.; DRAL, P.; GIUDICELLI, J.; LAFAURIE, M. 1990. The uptake metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 20: 223-233.

MATTOON, A. 2001. Deciphering amphibian declines. **State of World.** p. 63-82.

MOREAU, M; BOUCHARD, M. 2015. Comparison of the kinetics of various biomarkes of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. **Journal of Applied Toxicology.** 35: 781-790.

MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibians species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology.** 4: 1-8.

NASR, I.N.; ARIEF, M.H.; ABDEL-ALEEM, A.H.; MALHAT, F.M. 2010. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. **Journal of Applied Sciences Research.** 6: 13-21.

PADRÓS, J., PELLETIER, É., RIBEIRO, C.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 192: 45-55.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes response in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research.** 23: 9852-9861.

PURRELLO, M.; SCALIA, M.; CORSARO, C.; PIETRO, C.; PIRO, S.; SICHEL, G. 2001. Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in kupffer cells fron *Rana esculenta*. **Pigment Cell Research.** 14: 126-131.

QUARONI, A.; ISSELBACHER, K.J. 1981. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. **Journal of the National Cancer Institute.** 67: 1353-1362.

REGNAULT, C.; WORMS, I.A.M.; OGER-DESFEEUX, C.; MELOdeLIMA, C.; VEYRENC, S.; BAYLE, M.L.; COMBOURIEU, B.; BONIN, A.; RENAUD, J.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcription and metabolic evidence. **BMC Genomics.** 15: 1-16.

ROBERTO, A.; LARSSON, B.S.; TJALVE, H. 1996. Uptake of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. **Pharmacology & Toxicology.** 79: 92-99.

ROBERTS, R.J. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W.E.; MIGAKI, G. (Ed.) **The pathology of fishes.** The University of Wisconsen Press, 1975. p. 399-428.

SADINSKI, W.J.; LEVAY, G.; WILSON, M.C.; HOFFMAN, J.R.; BODELL, W.J.; ANDERSON, S.L. 1995. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology.** 32: 333-352.

SHIMIZU, Y.; NAKATSURU, Y.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; KUME, H.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; ISHIKAWA, T. 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **PNAS.** 97: 779-782.

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

VIDEIRA, I.F.S.; MOURA, D.F.L.; MAGINA, S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 88: 76-83.

WILCKE, W.; AMELUNG, W.; KRAUSS, M.; MARTIUS, C.; BANDEIRA, A.; GARCIA, M. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. **Organic Geochemistry.** 34: 1405-1417.

WOLKE, R.E.; GEORGE, C.J.; BLAZER, V.S. Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: HARGIS, W.J. (Ed.) **Parasitologyand Pathology of Marine Organisms of the World Ocean.** U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1985. p. 93-98

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C.; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology.** 61: 305-316.

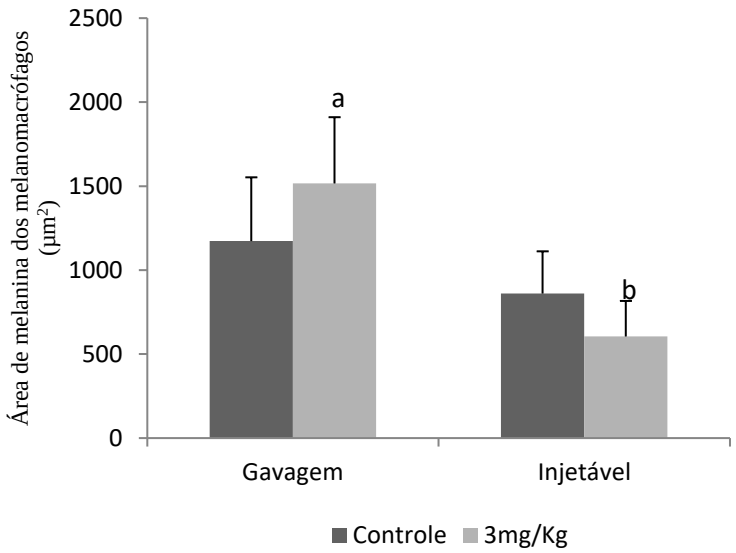

Figura 1 – Variação na área de melanina nos melanomacrófagos hepáticos. Letras diferentes ('a' e 'b') indicam variação estatisticamente significativa entre os animais do tratamento com o controle do mesmo tratamento. *P*<0,01

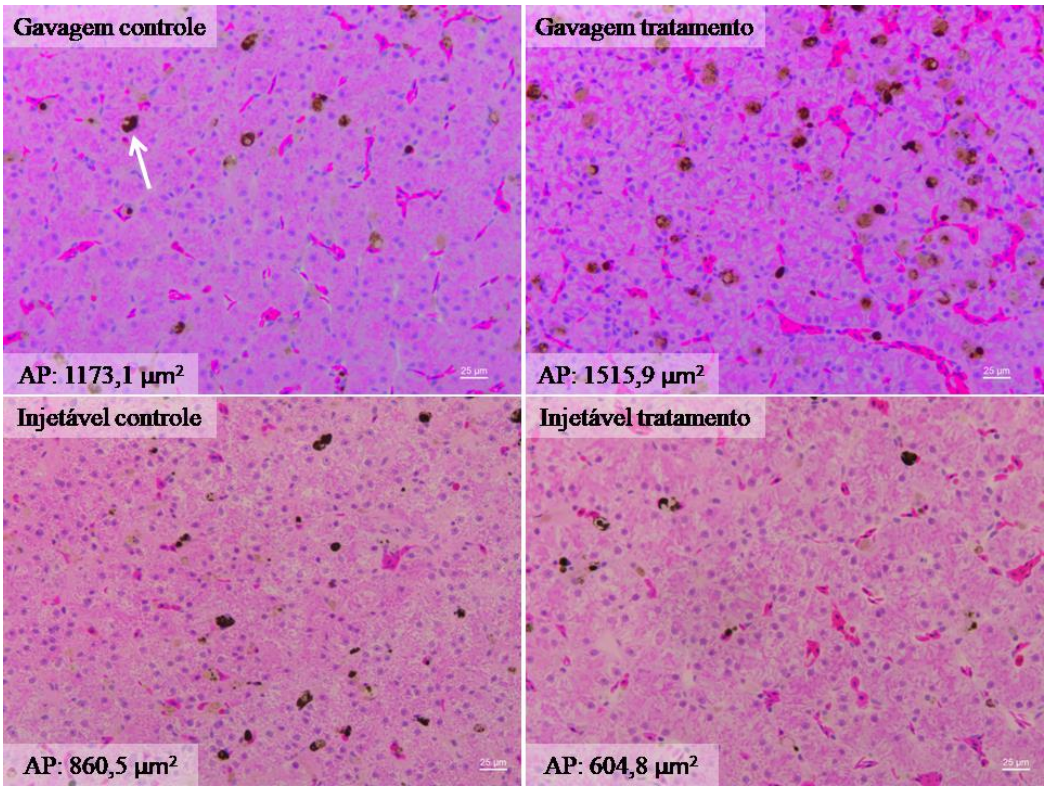

Figura 2 – Fotomicrografias do fígado demonstrando a variação média da área pigmentar (AP) dos melanomacrófagos (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina. Barras: 25µm.

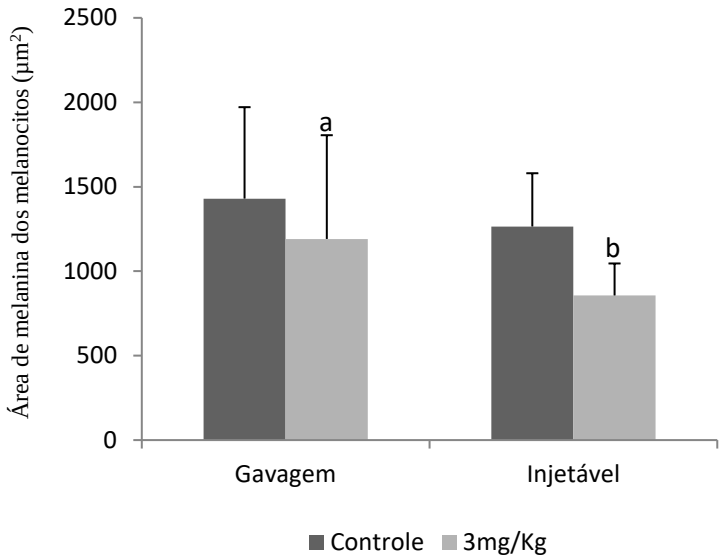

Figura 3 – Variação na área de melanina nos melanócitos testiculares. Letras diferentes ('a' e 'b') indicam variação estatisticamente significativa entre os animais do tratamento com o controle do mesmo tratamento. *P*<0,01

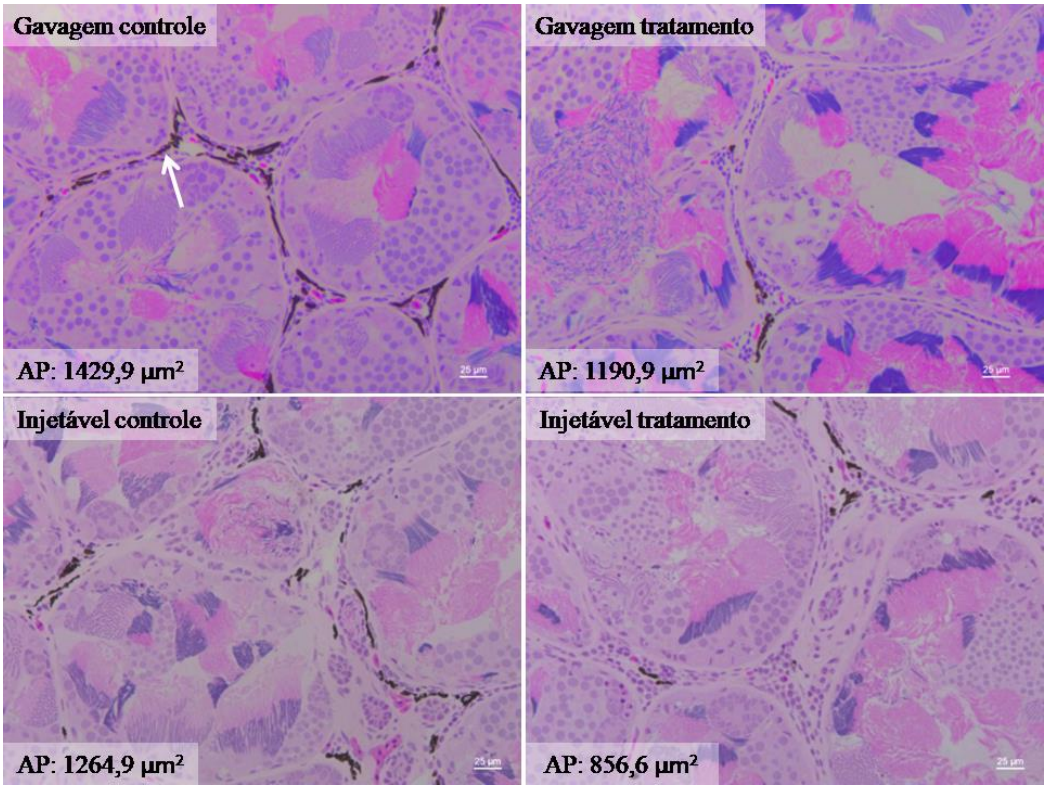

Figura 4 – Fotomicrografias do testículo demonstrando a variação média da área pigmentar (AP) dos melanócitos testiculares (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina. Barras: 25µm.

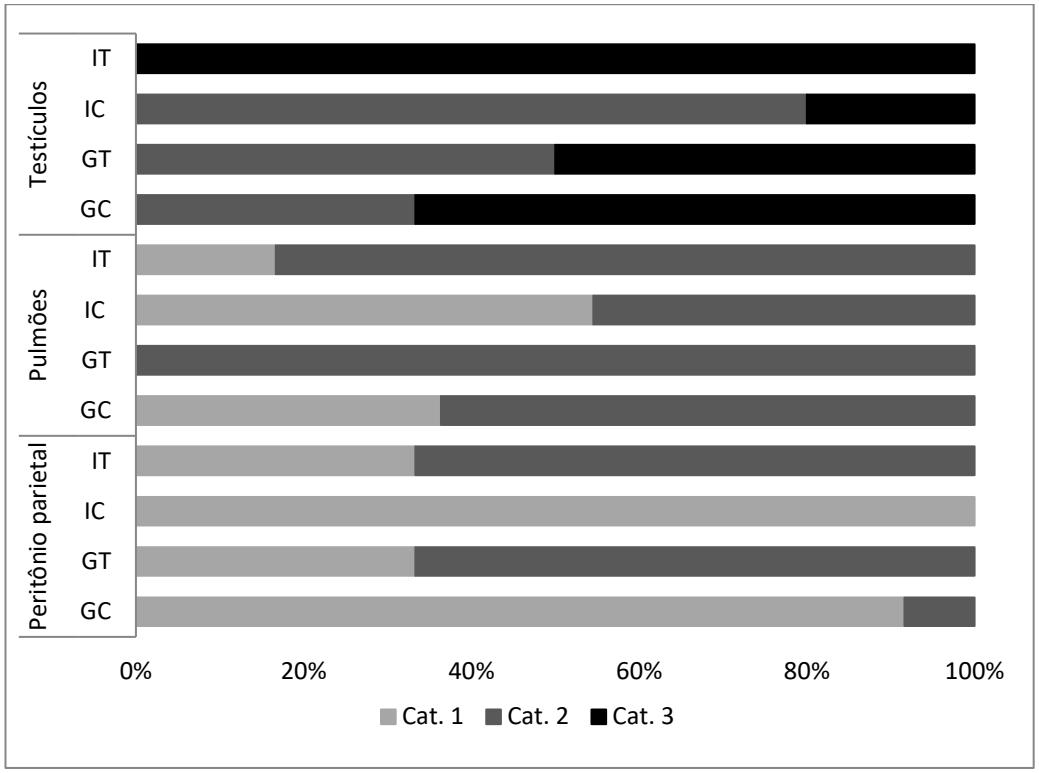

Figura 5 – Variação da pigmentação visceral de *P. nattereri*. Cat.1 – poucas células pigmentares; Cat.2 – grande quantidade de células pigmentares; Cat.3 – pigmentação total do órgão. GC – Gavagem Controle; GT – Gavagem Tratamento; IC – Injetável Controle; IT – Injetável Tratamento.

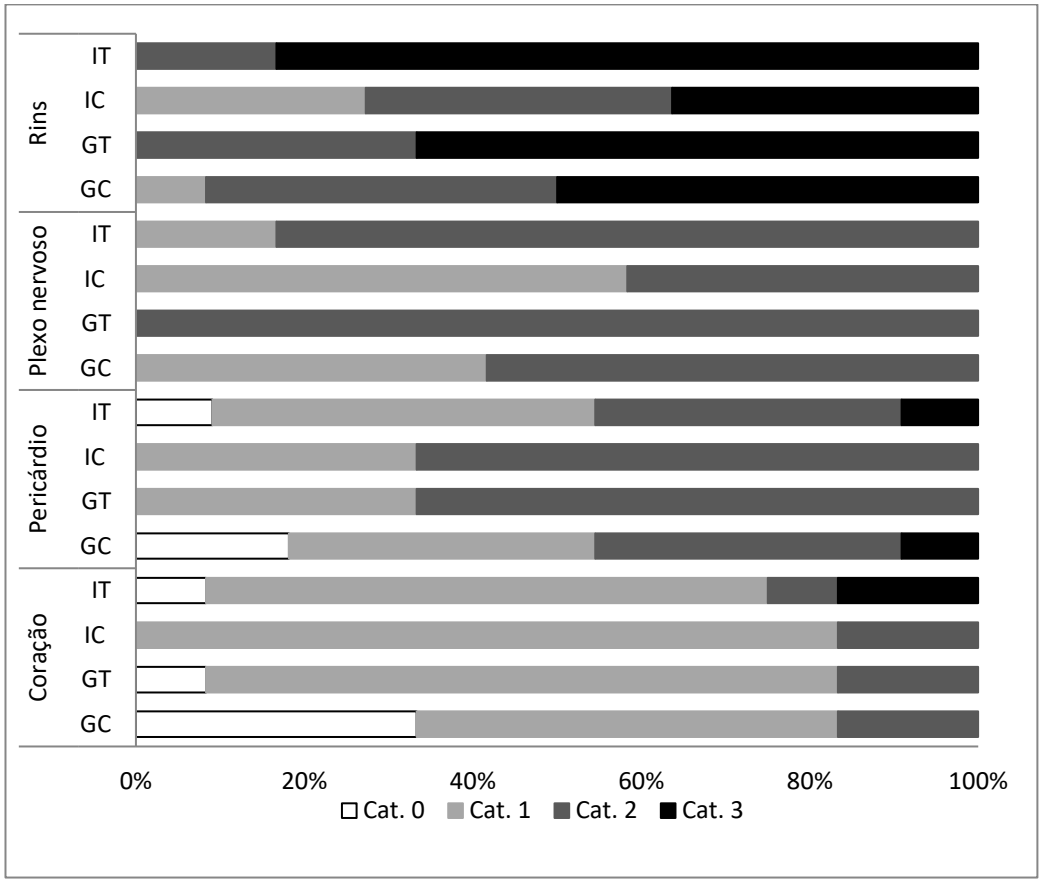

Figura 6 – Variação da pigmentação visceral de *P. nattereri*. Cat.0 – ausência de células pigmentares; Cat.1 – poucas células pigmentares; Cat.2 – grande quantidade de células pigmentares; Cat.3 – pigmentação total do órgão. GC – Gavagem Controle; GT – Gavagem Tratamento; IC – Injetável Controle; IT – Injetável Tratamento.

V – Conclusões

- Nosso estudo utiliza as células melânicas internas, o epitélio intestinal e os eritrócitos como biomarcadores morfológicos para os efeitos do BαP em anuros;
- O BαP é responsável por alterar a pigmentação interna, a espessura média do epitélio intestinal e a frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos em *P. nattereri*;
- As alterações são influenciadas pela via de exposição, demonstrando a importância da utilização de diferentes vias para se avaliar os efeitos adversos do BαP;
- Nossos resultados demonstram que o BαP não atua especificamente sobre um tipo celular/órgãos, mas que apresenta um efeito sistêmico geral, o que pode comprometer a homeostase do animal.

VI – Referências Bibliográficas:

AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology.** 191: 11-31.

ALIMBA, C.G.; BAKARE, A.A. 2016. In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. **Ecotoxicology.** 25: 310-319.

AQUINO, L.; REICHLE, S.; SILVANO, D.; SCOTT, N. 2004. *Physalaemus nattereri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T57267A11597340.
Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57267A11597340.en
Acesso em: Janeiro de 2018

ARAÚJO, M.S.; BOLNICK, D.I.; MARTINELLI, L.A.; GIARETTA, A.A.; REIS, S.F. 2009. Individual-level diet variation in four species of Brazilian frogs. **Journal of Animal Ecology.** 78: 848-856.

AUTRUP, H.; GRAFSTROM, R.C.; BRUGH, M.; LECHNER, J.F.; HAUGEN, A.; HARRIS, C.C. 1982. Comparison of Benzo(a)pyrene metabolism in bronchus, esophagus, colon, and duodenum from the same individual. **Cancer Research.** 42: 934-938.

AUTRUP, H.; HARRIS, C.C.; FUGARO, S.; SELKIRK, J.K. 1977. Effect of various chemicals on the metabolismo of Benzo(a)pyrene by cultured rat colon. **Chemico–Biological Interactions.** 18: 337-347.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2009. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).
Disponível em: https://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf
Acesso em: Dezembro de 2017

BARAKAT, A.O.; MOSTAFA, A.; WADE, T.L.; SWEET, S.T.; El SAYED, N.B. 2011. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean costal environment of Egypt. **Marine Pollution Bulletin.** 62: 1969-1978.

BLAUSTEIN, A.R.; BANCROFT, B.A. 2007. Amphibian population declines: evolutionary considerations. **BioScience.** 57: 437- 444.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions.** 9: 123-140.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. 1995. The puzzle of declining amphibisn populations. **Scientific America.** 272: 52-58.

BRODEUR, J.C.; CANDIOTI, J.V. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the pampa region of Argentina. In: LARRAMENDY, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-**

traditional terrestrial models. Croydon: The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 163-194.

BRUHL, C.A.; SCHIMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? **Scientific Reports.** 3: 1-4.

CABAGNA, M.C.; LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P.M.; ATTADEMO, A.M.; ALE, E. 2006. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological & Environmental Chemistry.** 88: 729-737.

ÇAKICI, O. 2014. Carbaryl-induced histopathologic alterations in the digestive tract of the Levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). **Toxicologic Pathology.** 42: 1032-1040.

ÇAKICI, O. 2016. Histopathological study of toxic effects of carbaryl on digestive tract of *Bufotes variabilis* (Anura: Bufonidae). **Environmental Science and Pollution Research.** 23: 13432-13437.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 47: 2123-2136.

CARUSO, M.S.F.; ALABURDA, J. 2008. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** 67: 1-27.

CARVALHO, T.; BECKER, C.G.; TOLEDO, L.F. 2017. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society of London B.** 284:20162254

CAVRET, S.; FEIDT, C. 2005. Intestinal metabolismo of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. **Environmental Research.** 98: 22-32.

CHRISTIANSEN, J.L.; GRZYBOWSKI, J.M; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research.** 9: 185-190.

CLAVER, J.A.; QUAGLIA, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine.** 18: 87-97.

COLLINS, J.P.; STORFER, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions.** 9: 89-98.

COLOMBO, S.; BERLIM, I.; DELMAS, V.; LARUE, L. Classical and non-classical melanocytes in vertebrates. BOROVANSKY, J.; RILEY, P. (Ed.). **Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions.** Wiley-Blackwell, 2011. p. 21-62.

COSTA, C.; CATANIA, S.; DE PASQUALE, R.; STANCANELLI, R.; SCRIBANO, G.M.; MELCHINI, A. 2010. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. **Toxicology.** 271: 83-86.

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L.Z.; SANTOS, L.R.S. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. In: LARRAMENDY, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models.** Croydon: The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 125-142.

DEGARADY, C.J.; HALBROOK, R.S. 2006. Using anurans as bioindicators of PCB contaminated streams. **Journal of Herpetology.** 40: 127-130.

DELIS, P.; MUSHINSKY, H.R.; MCCOY, E.D. 1996. Decline of some west-central Florida anuran populations in response to habitat degradation. **Biodiversity and Conservation.** 5: 1579-1595.

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.K.; MENDO, S.; SOARES, A.M.V.M. 2010. Biomarkes as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** 152: 338-345.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L.1994. **Biology of amphibians**. McGraw-Hill Book Company, Toronto. p. 670.

FAIR, R.H.; FORTNER, A.R. 1987. Effect of ingested Benzo[a]pyrene and cadmium on tissue accumulation, hydroxylase activitiy, and intestinal morphology of the black sea bass, *Centropristis striata*. **Environmental research.** 42: 185-195.

FANALI, L.Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; OLIVEIRA, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution.** 237: 93-102.

FANALI, L.Z.; VALVERDE, B.S.L.; FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D.B.; OLIVEIRA, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. **Amphibia-Reptilia.** 38: 175-185.

FENECH, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols.** 2: 1084-1104.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis.** 26: 125-132.

FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 60: 259-268.

FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A.M.L.; OLIVEIRA, C. 2013. Responses of melanocyte and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^{4}, D-Phe^{7}-α-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. **Zoology.** 116: 316-324.

FRANCO-BELUSSI, L. FANALI, L.Z.; DE OLIVEIRA, C. 2018. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** 180: 109-117.

FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G.B.; FREITAS, J.S.; OLIVEIRA, C. 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Animal Biology.** 64: 261-275.

FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. 2011. Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). **Zoology.** 114: 298-305.

FRANCO-BELUSSI, L. PROVETE, D.B.; DE OLIVEIRA, C. 2017. Environmental correlates of internal coloration in frogs vary throughout space and lineages. **Ecology and Evolution.** 7: 9222-9233.

FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2012. Visceral pigmentation in three species of the genus *Scinax* (Anura: Hylidae): distinct morphological pattern. **The Anatomical Records.** 295: 298-306.

FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H.N.; OLIVEIRA, C. 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology.** 219: 1378-1383.

FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record.** 292: 178-182.

FROST, D.R. 2017. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA.Eletronic database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html
Acesso em: Novembro de 2017.

GELBOIN, H.V.; 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidase and related enzymes. **Physiological Reviews.** 60: 1107-1166.

GUPTA, S.; KUMAR, K.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, A.; JAIN, V.K. 2011. Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle samples from the atmospheric environment of Delhi, India. **Science of the total environment.** 409: 4674-4680.

HOOGDUIJIN, M.J.; CEMELI, E.; ROSS, K.; ANDERSON, D. THODY, A.J.; WOOD, J.M. 2004. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H_2O_2-

induced DNA stand breaks through its ability to bind Ca^{2+}. **Experimental Cell Research.** 294: 60-67.

IARC, International Agency for Research on Cancer. 2013. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 103.
Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol103/index.php
Acesso em: Março de 2018.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1998. Selected non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.
Disponível em:
http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SectionNumber:12
Acesso em: Dezembro de 2017.

JAMES, M.O.; ALTMAN, A.H.; MORRIS, K.; KLEINOW, K.M.; TONG, Z. 1997. Dietary modulation of phase 1 and phase 2 activities with benzo(a)pyrene and related compounds in the intestine but not the liver of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Drug Metabolism and Disposition.** 25: 346-354.

JENG, H.A.; YORDT, D.; DAVIS, S.; SWANSON, J.R. 2013. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by subchronic exposure to benzo(a)pyrene via oral administration. **Environmental Toxicology.** 30: 1-8.

JOO, D.H.; CHA, H.J.; KIM, K.; JUNG, M.; KO, J.M.; AN, I.S.; LEE, S.N.; JANG, H.H.; BAE, S.; ROH, N.K.; AHN, K.J.; AN, S. 2015. Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. **Molecular & Cellular Toxicology.** 11: 349-355.

KARDONG, K.V. 2012. Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. 6ed. **McGraw-Hill**, New York. p. 503-544.

KRISHNAMURTHY, S.V.; MEENAKUMARI, D.; GURUSHANKARA, H.P.; VASUDEV, V. 2008. Nitrate-induced morphological anomalies in the tadpoles of *Nyctibatrachus major* and *Fejervaya limnocharis* (Anura: Ranidae). **Turkish Journal of Zoology.** 32: 239-244.

LAJMANOVICH, R.C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C.; ATTADEMO, A.M.; JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M. BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research.** 769: 7-12.

LEMAIRE, P.; BERHAUT, J.; LEMAIRE-GONY, S.; LAFAURIE, M. 1992a. Ultrastructural changes induced by benzo[a]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route. **Enviromental research.** 57: 59-72.

LEMAIRE, P.; LEMAIRE-GONY, S.; BERHAUT, J.; LAFAURIE, M. 1992b. The uptake, metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene administred by force-

feeding in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 23: 244-251.

LEMAIRE, P.; MATHIEU, A.; CARRIERE, S.; DRAL, P.; GIUDICELLI, J.; LAFAURIE, M. 1990. The uptake metabolism and biological half-life of benzo[a]pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 20: 223-233.

LENKOWSKI, J.R.; SANCHEZ-BRAVO, G.; MCLAUGHLIN, K.A. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. **Journal of Environmental Sciences.** 22: 1305-1308.

LENZI-MATTOS, R.; ANTONIAZZI, M.M.; HADDAD, C.F.B.; TAMBOURGI, D.V.; RODRIGUES, M.T.; JARED, C. 2005. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behavior. **Journal of Zoology.** 266: 385-394.

LIPINSKI, V.M.; SANTOS, T.G.; SCHUCH, A.P. 2016. An UV-sensitive anuran species as na indicator of environmental quality of the Southern Atlantic Rainforest. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.** 165: 174-181.

MATTOON, A. 2001. Deciphering amphibian declines. **State of World.** p. 63-82.

MILLER, K.P.; RAMOS, K.S. 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews.** 33: 1-35.

MOREAU, M; BOUCHARD, M. 2015. Comparison of the kinetics of various biomarkes of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. **Journal of Applied Toxicology.** 35: 781-790.

MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibians species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology.** 4: 1-8.

MURANLI, F.D.G.; GUNER, U. 2011. Inductuion of micronuclei and nuclear abnormalities in erithrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyalothrin. **Mutation Research.** 726: 104-108.

NASR, I.N.; ARIEF, M.H.; ABDEL-ALEEM, A.H.; MALHAT, F.M. 2010. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in aquatic environment at El Menofiya governorate, Egypt. **Journal of Applied Sciences Research.** 6: 13-21.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova.** 23: 765-773.

PADRÓS, J., PELLETIER, É., RIBEIRO, C.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 192: 45-55.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes response in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research.** 23: 9852-9861.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; RUIZ DE ARCAUTE, C.; NIKOLOFF, N.; DURY, L.; SOLONESKI, S.; NATALE, G.S.; LARRAMENDY, M.L. 2014. The genotoxi effects of the imidacloprid-based insecticide formulation glacoxan imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 104: 120-126.

PURRELLO, M.; SCALIA, M.; CORSARO, C.; PIETRO, C.; PIRO, S.; SICHEL, G. 2001. Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in kupffer cells fron *Rana esculenta*. **Pigment Cell Research.** 14: 126-131.

QUARONI, A.; ISSELBACHER, K.J. 1981. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. **Journal of the National Cancer Institute.** 67: 1353-1362.

REGNAULT, C.; WORMS, I.A.M.; OGER-DESFEEUX, C.; MELOdeLIMA, C.; VEYRENC, S.; BAYLE, M.L.; COMBOURIEU, B.; BONIN, A.; RENAUD, J.; RAVETON, M.; REYNAUD, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcription and metabolic evidence. **BMC Genomics.** 15: 1-16.

ROBERTO, A.; LARSSON, B.S.; TJALVE, H. 1996. Uptake of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. **Pharmacology & Toxicology.** 79: 92-99.

ROBERTS, R.J. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W.E.; MIGAKI, G. (Ed.) **The pathology of fishes.** The University of Wisconsen Press, 1975. p. 399-428.

SADINSKI, W.J.; LEVAY, G.; WILSON, M.C.; HOFFMAN, J.R.; BODELL, W.J.; ANDERSON, S.L. 1995. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology.** 32: 333-352.

SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R.E.; OLIVEIRA, C. 2014. Effects or thermal stress on hepatic melonamacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record.** 297: 864-875.

SAYED, A.E.D.H. 2015. Hematotoxic and biochemical effects of UVA on the Egyptian toad (*Bufo regularis*). **International Journal of Radiation Biology.** 92: 35-41.

SELKIRK, J.K. 1977. Benzo[a]pyrene carcinogenesis: a biochemical selection mechanism. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Current Issues.** 2: 1245-1258

SHIMIZU, Y.; NAKATSURU, Y.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; KUME, H.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; ISHIKAWA, T. 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **PNAS.** 97: 779-782.

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

STEVENS, C.E. AND HUME, I.D. 1995. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system.** 2nd. Ed. Cambridge University Press. 406 p.

STOHS, S.J.; GRAFSTRGM, R.C.; BURKE, M.D.; ORRENIUS, S. 1977. Benzo(a)pyrene metabolism by isolated rat intestinal epithelial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 179: 71-80.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; LISICIC, D.; COZ-RAKOVAC, R.; POPOVIC, N.T.; JADAN, M.; BENKOVIC, V.; TADIC, Z. 2010. Evaluation of micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. **Ecotoxicology.** 19: 1460-1465.

VAN VELD, P.A.; PATTON, J.S.; LEE, R.F. 1988. Effect of preexposure to dietary Benzo[a]pyrene (BP) on the first-pass metabolism of BP by the intestine of toadfish (*Opsanus tau*): in vivo studies using portal vein-catheterized fish. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 92: 255-265.

VAN VELD, P.A.; VETTER, R.D.; LEE, R.F.; PATTON, J.S. 1987. Dietary fat inhibits the intestinal metabolismo f the carcinogen benzo[a]pyrene in fish. **Journal of Lipid Research.** 28: 810-817.

VERMA, N.; PINK, M.; RETTENMEIER, A.W.; SCHMITZ-SPANKE, S. 2012. Review on the proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. **Proteomics.** 12: 1731-1755.

VIDEIRA, I.F.S.; MOURA, D.F.L.; MAGINA, S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 88: 76-83.

VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. 2014. **Herpetology: An Introdctory Biology of Amphibians and Reptilies**.4 Ed. Academic Press. p. 757.

WILCKE, W.; AMELUNG, W.; KRAUSS, M.; MARTIUS, C.; BANDEIRA, A.; GARCIA, M. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. **Organic Geochemistry.** 34: 1405-1417.

WOLKE, R.E.; GEORGE, C.J.; BLAZER, V.S. Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: HARGIS, W.J. (Ed.) **Parasitologyand Pathology of Marine Organisms of the World Ocean.** U.S.

Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1985. p. 93-98

YIN, X.; ZHU, G.; LI, X.B.; LIU, S. 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** 680: 2-6.

YOUNG, B.E.; STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; BOUCHER, T.M. 2004. Joyas que Están Desapareciendo: El Estado de los Anfibios en el Nuevo Mundo. **NatureServe**.

YUEN, B.B.H; WONG, C.K.C.; WOO, N.Y.S.; AU, D.W.T. 2007. Induction and recovery of morphofunctional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology.** 82: 181-194.

ZIERI, R.; FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S.; TABOGA, S.R.; OLIVEIRA, C. 2015. Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. **Animal Biology.** 65: 21-32.

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C.; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology.** 61: 305-316.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. 2001. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles.** 2nd. Ed. Academic Press. p. 630.