

---

## **ANÁLISES MUTAGÊNICAS**

---

### **DE ANUROS EM ÁREAS**

---

### **DE MINERAÇÃO**

---

### **DE NÍQUEL \***

---

MACKS WENDHEL GONÇALVES, HUGO HENRIQUE PÁDUA DE OLIVEIRA, CAIO CESAR NEVES SOUSA, WANESSA FERNANDES CARVALHO, FAUSTO NOMURA, NATHAN MEDEIROS MACIEL, APARECIDO DIVINO DA CRUZ, DANIELA DE MELO E SILVA, ROGÉRIO PEREIRA BASTOS

*Resumo: o Biomonitoramento pode ser definido como o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças no ambiente, geralmente causadas por ações humanas. Neste artigo utilizamos anfíbios anuros como bioindicadores de qualidade ambiental e o teste de micronúcleo como biomarcador. Esta análise é útil para indicar a sensibilidade dos organismos a agentes genotóxicos ambientais.*

*Palavras-chave: Micronúcleos. Anfíbios anuros. Bioindicadores. Biomarcadores.*

**N**o Brasil, a mineração de níquel, ouro, ferro e de outros metais de interesse comercial têm contribuído com a liberação de metais pesados, que são uma das principais formas de contaminação do solo e das águas. O estado de Goiás possui 74% das reservas de níquel brasileiras, constituindo em um dos pilares do desenvolvimento industrial, extrativista, mineral e da siderurgia nacional (GARNIER

et al., 2006). O aumento nas concentrações desses rejeitos no solo e nos efluentes em zonas de mineração causam sérios impactos ambientais e podem causar alterações celulares nos organismos a eles expostos (GUILHERME *et al.*, 2005).

A anurofauna do Brasil é de fato surpreendente, cerca de 847 espécies distribuídas nos mais diversos habitats. A ordem anura é representada pelos sapos, rãs e pererecas (DUELLMAN; TRUEB, 1994; SBH, 2010).

Desde a industrialização do País, animais silvestres são ameaçados por atividades agrícolas e metalúrgicas. Existem evidências de que o aumento dessas atividades está relacionado com o declínio dos anfíbios, o que é um fator preocupante, pois esses animais desempenham um importante papel ecológico no controle de populações de insetos e outros invertebrados (BELFIORI; ANDERSON, 2001; ETEROVICK, SAZIMA 2004).

Nas últimas duas décadas têm sido comum a inclusão de espécies silvestres em programas de monitoramento ambiental (BEISWENGER, 1988). Como anfíbios apresentam características sedentárias, poderiam ser mais susceptíveis às atividades de impacto e, portanto, seriam melhores indicadores de qualidade ambiental (SZARO, 1988). Entretanto, recebem pouca atenção em tais programas e, apesar de serem considerados bons bioindicadores da qualidade ambiental, poucos estudos têm sido realizados.

Esses animais são sensíveis a modificações do habitat, a poluentes e a modificações climáticas globais (PHILLIPS, 1990). Assim, por causa de suas características ecológicas e fisiológicas, os efeitos acumulativos de agentes mutagênicos a princípio, devem ser mais intensos (VITT *et al.*, 1990; RELYEA, 2000). Entretanto, anfíbios são frequentemente ignorados ou recebem pouca atenção em tais programas.

Para se avaliar os efeitos de agentes mutagênicos e genotóxicos, análises citogenéticas como, ensaio do micronúcleo tem se mostrado bastante promissor devido ao seu baixo custo e alta sensibilidade (RUSSO *et al.*, 2004). Micronúcleos (MN) são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular (BOM-

BAIL *et al.*, 2001). O ensaio detecta eventos de danos diretamente ligados aos cromossomos e seus componentes, como os defeitos no fuso celular e outros componentes envolvidos na formação do fuso, conhecidos como mecanismos aneugênicos (ALBERTINI *et al.*, 2001).

Alguns critérios devem ser levados em consideração ao aplicarmos o ensaio com micronúcleos. O diâmetro do MN deve ser menor que um terço do núcleo; o MN não deve ser refratário e sua coloração não deve ser mais escura que a do núcleo; e o micronúcleo não deve tocar o núcleo (CARRASCO *et al.*, 1990).

Um fator importante é que o ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas, se estas não levarem à perda cromossômica na anáfase, bem como também não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não forem capazes de originar fragmentos acêntricos (BUSS *et al.*, 2003).

Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência de micronúcleos em anfíbios anuros coletados em áreas de mineração de Níquel, comparando os resultados com exemplares de anuros coletados em áreas naturais

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de Estudo, Locais e Períodos de Coleta

As coletas foram realizadas no polo mineiro-metalúrgico de Niquelândia-Barro Alto, limitada pelas latitudes 14°20' S e 15°00' S e longitudes 48°00' W e 48°30' W (Figura 1), cujas extrações iniciaram-se a partir de 1980.

O período da coleta foi outubro de 2009 a janeiro de 2010, mediante a autorização do IBAMA, licença de nº 13042-2 de 2008. Os turnos noturnos de observação iniciados a partir do pôr do sol e terminados entre 01:00-02:00h e realizadas com lanternas de luz branca.



Figura 1: Local de coleta dos anfíbios anuros na reserva da Mineradora Anglo-American-CODEMIN, região de Niquelândia-Barro Alto, GO.

### Bioindicadores Utilizados

Os organismos utilizados para esse estudo foram anfíbios anuros. Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos umedecidos a fim de evitar choques mecânicos, desidratação e stress. Mantidos vivos os animais foram conduzidos até o Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para a realização dos estudos citogenéticos. A relação de espécies estudadas e número de indivíduos está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Relação das espécies de anfíbios anuros e números de indivíduos utilizados para estudos de alterações eritrocitárias nucleares.

Espécies	Número de indivíduos
<i>Chiasmocleis albopunctata</i>	1
<i>Dendropsophus soaresi</i>	4
<i>Elachistocleis ovalis</i>	1
<i>Leptodactylus leptodactyloides</i>	2
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	2
<i>Leptodactylus sp.</i>	1
<i>Odontophrynus sp.</i>	1
<i>Phylomedusa azurea</i>	2
<i>Physalaemus centralis</i>	2
<i>Proceratophrys goyana</i>	5
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	1
<i>Rhinella schneideri</i>	2
<i>Scinax fuscovarius</i>	5
<i>Scinax similis</i>	2
<i>Trachycephalus venulosus</i>	1
Total	32

### Teste dos Micronúcleos

Os anuros adultos foram anestesiados por aproximadamente 2 minutos em solução de benzocaína a 5%. Após a verificação do processo de sedação os animais foram colocados em outro recipiente com a mesma solução anestésica para o aprofundamento da sedação por, no mínimo, mais 30 minutos até a morte. Amostras de sangue foram obtidas com o auxílio de uma seringa heparinizada através de punções cardíacas com a utilização de estereomicroscópios (Zeiss). Após a extração do sangue este foi armazenado em ependorffs. Para animais de pequeno porte foram obtidos suspensões celulares pelo rompimento do fígado, baço e fêmures em solução tampão de PBS (pH 7,4). Dois esfregaços de sangue e/ou suspensão para cada animal foram preparadas com a utilização de lâminas novas e limpas, sendo que cada lâmina já

fixada em metanol por 3 minutos, sendo secas ao ar livre por um período de no mínimo 12 horas.

Após esta secagem procedeu-se a fixação que foi feita com a imersão das lâminas em etanol absoluto por 20 minutos. As lâminas foram então coradas com Giemsa a 10% diluída em tampão fosfato, com pH 6,8, por 10 minutos ao abrigo da luz. Decorrido este tempo as lâminas foram lavadas suavemente com o auxílio de uma pisseta para a retirada do excesso de Giemsa e deixada à temperatura ambiente para secar. Após a secagem as lâminas foram acondicionadas e guardadas em caixas próprias, para serem analisadas posteriormente. A frequência de micronúcleos foi determinada em 1000 eritrócitos para cada girino através da objetiva de 100X.

### Análises Estatísticas

A frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares foram determinadas em 1000 eritrócitos para cada indivíduo com a objetiva de 100X. A partir da análise das lâminas, foram observadas quatro tipos de alterações eritrocitárias: células segmentadas (n=1), células binucleadas (n=1), células reniformes (n=1) e micronúcleos como sugere Wilks em testes não paramétricos (Kruskall-Wallis).

## RESULTADOS

Para as análises mutagênicas foram observadas as alterações eritrocíticas nucleares (AENs). Além de micronúcleos, foram observados outros tipos de anormalidades nucleares nos eritrócitos dos anfíbios anuros. Foram encontrados eritrócitos binucleados, brotos nucleares, eritrócitos segmentados e núcleos com alterações morfológicas.

Das análises mutagênicas dos 32 indivíduos pertencentes à ordem dos anuros, apenas 4 indivíduos apresentaram AENs. O resultado da avaliação dos eritrócitos destes animais está representado na Tabela 2.

Tabela 2: Relação das espécies estudadas, número de células analisadas e alterações eritrocitárias nucleares encontradas neste estudo.

Espécies	Total de células analisadas	Alterações Eritrocíticas Nucleares				
		MN	L	BN	S	K
<i>Proceratophrys goyana</i>	1000	0	0	1	0	0
<i>Proceratophrys goyana</i>	1000	1	0	0	0	0
<i>Dendropsophus soaresi</i>	1000	4	0	0	0	0
<i>Leptodactylus leptodactyloides</i>	1000	0	0	0	1	0

Legenda: MN = Micronúcleo, L = Núcleo Lobado; BN = Célula Binucleada; S = Núcleo Segmentado; K = Núcleo em Forma de Rim.

Na Figura 2 estão representados as alterações nucleares identificados em *Proceratophrys goyana*, *Leptodactylus leptodactyloides* e *Dendropsophus soaresi* e também os resultados das análises de anuros coletados em áreas naturais, os quais, não apresentaram alterações.

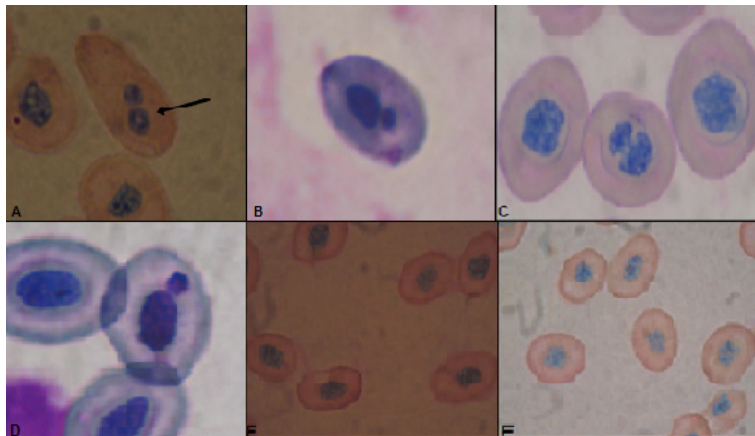


Figura 2: Células sanguíneas de anuros coradas com Giemsa em aumento de 1000x.

Legenda: A e B célula binucleada e micronucleada de *Proceratophrys goyana* respectivamente. C Núcleo segmentado de *Leptodactylus leptodactyloides*. D Eritrócito micronucleado de *Dendropsophus soaresi*. E e F representa os indivíduos coletados em áreas naturais que não apresentaram alterações eritrocíticas.

## CONCLUSÕES

A proteção dos ecossistemas depende de programas que sejam capazes de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos.

Desta forma é fundamental a realização de programas de biomonitoramento, que por definição é o uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de um determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas.

A sensibilidade de leitura e identificação das alterações nucleares por vez depende de fatores técnicos como a habilidade do citogeneticista, da qualidade dos reagentes utilizados e também da qualidade do sistema de microscopia usado.

O uso das respostas biológicas em organismos vivos como indicadores de degradação ambiental é mais vantajoso em relação às medidas físicas e químicas da água, pois estas registram apenas o momento em que foram coletadas.

Faz-se necessário, para uma maior elucidação deste trabalho o uso de mais exemplares de anuros coletados em áreas naturais para utiliza-los como controle negativo, criando assim um banco de dados com a frequência de micronúcleos.

### ANURAN MUTAGENIC ANALYSES IN NIQUEL MINING AREAS

*Abstract: biomonitoring can be defined as the systematic use of the responses of living organisms to evaluate changes in the environment, often caused by human actions. In this article we used anuran amphibians as bioindicators of environmental quality and the micronucleus assay as a biomarker. This analysis indicates the sensitivity of these organisms in the face of genotoxic agents dissolved in the environment.*

**Keywords:** *Micronucleus. Anuran amphibian. Bioindicators. Biomarkers.*



## Referências

- AURICH, M. A., ZANDER, P., WERNER, A., ROTH, R. 1998. Developing agricultural land use strategies appropriate to nature conservation goals and environmental protection. *Landscape and Urban Planning.*, v. 41, p. 119-127, 1998.
- ALBERTINI, D.F. et al Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 121, p. 647-653, 2001.
- BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on Genetic Patterns in Aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, v. 489, p. 97-122, 2001.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, n. 2, p. 4-7, 2003.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment os the piscine micronuclei test *in situ* biological indicator of chemical contaminats effects. *Canadian Journal of Fish. and Aquatic Science*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill, 1994.
- ETEROVICK, P.C.; SAZIMA, I. *Anfíbios da Serra do Cipó – Minas Gerais – Brasil*. PUC Minas, Belo Horizonte: Ed. da PUC Minas, 2004.
- GARNIER, J. Solid speciation and availability of chromium in ultramafic soils from Niquelândia, Brazil. *Journal of Geochemical Exploration* , v. 88, p. 206-209, 2006.
- GUILHERME, L.R.G. et al. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005.
- PHILLIPS, K. Where have all frogs and toads gone? *BioScience*, p. 422-424, 1990.
- RELYEA, R.A. Trait-mediated effects in larval anurans: reversing competition with the threat of predation. *Ecology*, v. 81, p. 2278–2289, 2000.
- RUSSO, C. et al. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology. and Environmental Safety*, v. 57, p. 168-174, 2004.
- SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 167-170.
- VITT, L. J. et al. Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience*, v. 40, n. 6, p. 418, 1990.

\* Recebido em: 08.08.2010

Aprovado em: 15.08.2010.

\*\* Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa da UFG (Funape), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG -Chamada 02), à empresa Anglo American do Brasil e à PROPE/PUCGO, pelos auxílios financeiros e concessão de bolsas de estudo a pesquisadores e discentes envolvidos nesse estudo.

**MACKS WENDHEL GONÇALVES**

Acadêmico do Biologia, Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC/CNPq.

**HUGO HENRIQUE PÁDUA DE OLIVEIRA**

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Mestrando em Biologia Celular e Molecular pela UFG. Bolsista do CNPq.

**CAIO CESAR NEVES SOUSA**

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

**WANESSA FERNANDES CARVALHO**

Bióloga pela PUC Goiás. Bolsista de Apoio Técnico do CNPq.

**FAUSTO NOMURA**

Biólogo pela Universidade Estadual Paulista de São José do Rio Preto. Doutor e Mestre em Zoologia pela UNESP- São José de Rio Preto. Professor Adjunto do Departamento de Ecologia da Universidade Federal de Goiás.

**NATHAN MEDEIROS MACIEL**

Biólogo pela Universidade de Brasília. Doutor em Biologia Animal pela UNB. Professor Adjunto do Departamento de Ecologia da Universidade Federal de Goiás.

**APARECIDO DIVINO DA CRUZ**

Biomédico pela PUCGO. Mestre e Doutor em Biologia Molecular pela UVic-Canadá. Professor Titular da PUC Goiás.

**DANIELA DE MELO E SILVA**

Biomédica pela PUC Goiás. Doutora em Biologia Animal pela UNB. Professora Assistente da PUC Goiás.

**ROGÉRIO PEREIRA BASTOS**

Biólogo pela Universidade Federal do Espírito Santo. Mestre e Doutor

em Zoologia pela Universidade Estadual Paulista de Rio Claro-SP. Professor Associado da Universidade Federal de Goiás. Bolsista II do CNPq.

**estudos**, Goiânia, v. 37, n. 9/10, p. 737-747, set./out. 2010.