AVALIAÇÃO DE DANOS GENÔMICOS EM ANFÍBIOS ANUROS DO CERRADO GOIANO*

MACKS WENDHELL GONÇALVES, **WANESSA FERNANDES CARVALHO**, RODRIGO RONCATO PEREIRA, **DANIELA DE MELO E SILVA**, ROGÉRIO PEREIRA BASTOS, **APARECIDO DIVINO DA CRUZ**

Resumo: *os anfíbios atuam como componentes de muitas comunidades ecológicas, consumindo uma infinidade de insetos, quanto por servir como presas para outros animais, podendo também ser utilizados como indicadores de qualidade ambiental. Devido à sua sensibilidade às mudanças do habitat e a sua necessidade da água no período larval, os anfíbios têm sido considerados como bioindicadores dos ecossistemas aquáticos e terrestres.*

Palavras-chave: *Anuros. Ensaio cometa. Bioindicadores. Genotoxicidade ambiental.*

Segundo Trueb (1994) os anfíbios são animais vertebrados, ectodérmicos, apresentam ampla distribuição geográfica e estão divididos em três grupos distintos: as salamandras (Caudata) com 502 espécies, distribuídas, no hemisfério norte; as cobras-cegas (Gymnophiona) com 165 espécies, caracterizadas pela ausência de membros; e os anuros (Anura) com 4.873 espécies, conhecidas como sapos, rãs e pererecas, constituindo o principal grupo de anfíbios encontrados no Brasil.

Rossa-Feres e Jim (2001) relatam que o Brasil apresenta a maior diversidade de anfíbios do mundo, e que a maioria dos estudos relacionados à anfibiofauna foram desenvolvidos no litoral brasileiro.

Segundo Blaustein e Kiesecker (2002), os anuros compreendem os sapos, rãs e pererecas, apresentam uma fase larval aquática e outra terrestre, são desprovidos de cauda com membros posteriores modificados para o salto, a maioria são encontradas em ambientes aquáticos e úmidos, apresentam pele permeável e estão concentrados principalmente nas florestas tropicais, podendo ser encontrados em todos os continentes com exceção da Antártida.

De acordo com Gibbons *et al.* (2002) espécies de anfíbios estão vulneráveis há ameaças globais como a devastação desordenada, desflorestamento e poluição por resíduos de agriculturas. Os anfíbios anuros apresentam características sedentárias podendo ser mais susceptíveis às atividades de impacto ambiental, por esse motivo tem sido comum a inclusão dessas espécies em programas de monitoramento ambiental. Entretanto são frequentemente ignorados ou recebem pouca atenção em tais programas e apesar, dos anfíbios serem considerados bons bioindicadores da qualidade ambiental, poucos estudos são realizados.

Segundo Relya (2002) as características que tornam os anfíbios bons indicadores ambientais são pele permeável, ovos sem casca, ciclo de vida com duas fases. Além disso, são importantes componentes de muitas comunidades ecológicas, sejam consumindo uma infinidade de insetos ou servindo de presas para outros animais. Assim, por causa de suas características ecológicas e fisiológicas, os efeitos acumulativos de agrotóxicos, a princípio, devem ser mais intensos.

O Bioma Cerrado, segundo Colli *et al.* (2002), contém uma rica herpetofauna apresentando 113 espécies de anuros, 2 de cecílias, 170 de escamados (107 de serpentes, 47 de lagartos e 16 de anfisbênias), 10 de Quelônios e 5 de Crocodilianos. Dentre essa diversidade muitos estão ameaçados de extinção.

Para Grandinetti (2003) as ações antrópicas resultam em uma série de modificações no meio ambiente como, a eliminação parcial ou completa de hábitat afetando a diversidade e a distribuição dos anuros.

Lewinsohn e Prado (2003) apontavam para cerca de 600 espécies de anuros no Brasil. Já segundo Iucn *et al.* (2004), 731 dessas espécies já foram listadas e tiveram seu "*status*" avaliado. Para a SBH (2004) o Brasil ocupava o topo do quadro mundial em diversidade de anfíbios com 765 espécies distribuídas em 3 ordens, 13 famílias e 98 gêneros.

Dentre os Biomas brasileiros Toledo *et al.* (2007), cita que o Cerrado possui o segundo maior bioma com o maior número de espécies de anfíbios do mundo com 141 espécies, onde 41 são endêmicas devendo ser reforçado com isso a importância da conservação desse bioma.

A maior diversidade de anfíbios do planeta está concentrada no Brasil, com mais de 800 espécies descritas sendo 60% endêmicas sendo que esses números tende a aumentar devido as constantes publicações (SBH, 2008; FROST, 2008).

FAMÍLIA HYLIDAE

Rossa-Feres *et al.* (1994) citam que os anuros da família Hylidae ocorrem em todo o Mundo, apresentam um grande número de espécies podendo ser encontradas com grandes variações quanto sua morfologia externa, coloração e reprodução, na maioria são arborícolas e de hábitos noturnos, apresentam discos adesivos bem desenvolvidos nas pontas dos dedos utilizados para fixação nos galhos e troncos e seu tamanho varia de 1,7 a 14,0 cm.

Segundo Kwet (1999) a família Hylidae é constituída por aproximadamente 870 espécies no planeta e 418 no Brasil sendo que todas são agrupadas nas subfamílias

Pelodryadinae, Phyllomedusinae e Hylinae com ampla distribuição nas Américas, Austrália, Nova Guiné e Eurásia.

Para Giovanelli (2004), *Dendropsophus minutus* (PETERS, 1872) é uma espécie muito comum, apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo do norte da América do Sul até o Uruguai e Missiones na Argentina, da costa atlântica aos territórios do leste Boliviano, são noturnos, os machos ativos apresentam vocalizações de alta intensidade, que facilitam a sua localização, reproduzem em corpos d'água sem correnteza e pode ser considerada como uma espécie com ampla plasticidade na ocupação de micro hábitats.

Para Caramaschi (1980) a espécie *Phyllomedusa azurea* (COPE, 1862) possui porte médio quando comparada com outras espécies do mesmo gênero, é caracterizada como arborícola, saltadora, são observados caminhando lentamente sobre galhos e folhas em busca de alimento ou locais para repouso e deposita seus ovos na vegetação que margeia corpos d'água.

Segundo Frost (2007) a espécie *Hypsiboas albopunctatus* (SPIX, 1824) ocorre nas regiões central, sul e sudeste do Brasil, nordeste da Argentina, leste da Bolívia, Paraguai e norte do Uruguai. Segundo Uetanabaro *et al.* (2008) essa espécie é arborícola e de hábito noturno, podendo ser encontradas em brejos, matas de galeria ou veredas, sua reprodução é contínua e não apresenta uma plasticidade fenotípica e uma tolerância a diversos ambientes.

Uetanabaro *et al.* (2008) citam que *Scinax fuscovarius* (LUTZ, 1925) é arborícola, de hábito noturno o tamanho varia de 4,7 - 5,0 cm, possui o dorso amarelo ou castanho-escuro, com linhas estreitas escuras formando dois "V" invertidos, o amplexo é axilar e a reprodução ocorre na estação chuvosa no período de setembro a março, podendo ser encontrada no Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, Leste da Bolívia, Paraguai e Norte da Argentina.

FAMÍLIA LEIUPERIDAE

Lima *et al.* (2006) citam que os representantes da família Leiuperidae estão incluídos sete gêneros e 77 espécies. Entre essas há representantes com tamanhos diminutos como *Pseudopaludicola* sp. com menos de 2 cm e grandes que podem medir até 4,5 cm como *Eupemphix nattereri*.

Para Uetanabaro *et al.* (2008) a maioria das espécies de Leiuperidae são representadas por rãs, que desovam em ninhos de espuma, onde ficam os girinos recém-eclodidos, podendo ser encontradas na região do Pantanal e Planalto Central, no sudeste do México, América Central até o Sul da América do Sul. Já *Pseudopaludicola saltica* (COPE, 1887) pode ser encontrada em áreas de Cerrado do centro-oeste e sudeste do Brasil, nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e também no Distrito Federal. É uma espécie pequena variando de 15,8 mm - 16,5 mm, podendo ocorrer em áreas abertas e altitudes elevadas (até 1200 m).

FAMÍLIA LEPTODACTYLIDAE

Lima *et al.* (2006) relatam que os representantes da família Leptodactylidae ocorre da América do Sul até o sul da América do Norte. É a maior família de anuros com qua-

tro gêneros e 90 espécies. O tamanho varia de 2 – 25 cm, são conhecidas popularmente como rãs, são aquáticas, algumas são arborícolas.

A espécie *Leptodactylus latrans* (STEFFEN, 1815) está distribuída por toda a América do Sul, grande parte do território compreendido nos domínios da Mata Atlântica (UETANABARO *et al.,* 2008). É uma rã de grande porte, alimentam-se de invertebrados e pequenos anfíbios, é caracterizada pelo padrão de ocelos negros distribuídos irregularmente pelo dorso, apresenta coloração olivácea permitindo camuflar-se no ambiente reprodutivo.

Para Amphibiaweb (2008) a espécie *Leptodactylus leptodactyloides* (ANDERSON, 1945) é popularmente conhecida como rã vala, reproduzem em lagos temporários, as quais os ovos geralmente são encontrados em ninhos de espuma e os girinos em ambiente de água parada e estão distribuídos pelo Equador, Bolívia, Colômbia, Brasil, Guianas, Peru, Suriname e Venezuela.

ENSAIO COMETA

Ostling e Johanson (1984) relatam que o ensaio cometa foi desenvolvido com o uso de células sanguíneas misturadas em gel de agarose e submetidas à uma corrida eletroforética na qual o DNA sofreu um processo de migração.

Segundo Singh *et al.* (1988) o parâmetro de análise do teste cometa também conhecido por "*Single-Cell Gel Electrophoresis"* (SCGE), detecta a quebra de fita simples e fita dupla do DNA, sendo capaz de detectar danos em células individualizadas as quais os segmentos gerados migram do núcleo para o meio extra nuclear. De acordo com o dano ocorrido na célula, podem-se observar os efeitos genotóxicos.

Para Olive *et al.* (1990) o princípio do ensaio cometa baseia-se no fato de que durante a técnica de eletroforese a célula que não apresentar danos no DNA migrará em conjunto formando um círculo. Caso a célula apresente dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos que, por sua vez, migrarão em velocidades diferentes formando uma figura típica de um "cometa".

Mitchelmore e Chipman (1998) citam que a vantagem de utilizar o ensaio cometa como detector de genotoxicidade é que ele pode ser realizado em qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais além de ser um ensaio simples, rápido, sensível e de custo relativamente baixo. Porém, uma das críticas relacionadas a essa técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica.

Segundo Belpaeme (1998) o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de agentes genotóxicos dependendo das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula e da duração da exposição, podendo ser realizado também com células do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo.

O ensaio cometa para (ABD-ALLAH *et al.,* 1999) tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, sendo destacada a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos. Em peixes essa técnica também tem sido aplicada em outros tipos de células, tais como hepatócitos, células das brânquias, células renais e células intestinais.

Para Albertini *et al.* (2000) o ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que são passíveis de correção, podendo dessa forma

ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo.

Taban *et al.* (2004) relatam que a técnica do ensaio cometa é aplicada com êxito em várias espécies de plantas, anelídeos, moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos empregados como bioindicadores em estudos de monitoramento ambiental, podendo ser considerada como uma ferramenta bastante útil na avaliação do potencial genotóxico de áreas impactadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através do ensaio cometa, os danos genômicos em anfíbios anuros coletados em diferentes áreas do Bioma Cerrado do Estado de Goiás.

MATERIAlS E MÉTODOS

Os estudos para avaliação da genotoxidade foram realizados em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em áreas do Bioma Cerrado no período de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010. A coleta dos anuros foi autorizada pelo IBAMA mediante a licença de nº 13042-2 de 2008.

Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos, mantidos vivos e conduzidos até o Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para a realização dos estudos genotóxicos. Foram coletados 24 espécimes de anuros as quais foram classificados em três famílias e seis gêneros (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies, número de indivíduos e município onde foram coletados os anfíbios anuros (Amphibia – Anura) no Bioma Cerrado no Estado de Goiás para estudos sobre danos genômicos.

Espécies	**n***	**Município**
Dendropsophus minutus	1	Serranópolis
Leptodactylus latrans	3	Serranópolis
Leptodactylus leptodactyloides	1	Rio Verde
Phyllomedusa azurea	1	Rio Verde
Leptodactylus latrans	1	Rio Verde
Pseudopaludicola saltica	1	Rio Verde
Dendropsophus minutus	4	Bela Vista
Scinax fuscovarius	3	Mineiros
Pseudopaludicola saltica	1	Mineiros
Dendropsophus minutus	1	Jataí
Hypsiboas albopunctatus	3	Jataí
Hypsiboas albopunctatus	4	Aporé

* número de indivíduos

Ensaio Cometa

No laboratório os anfíbios anuros foram anestesiados com xilocaína. O sangue foi coletado por punção cardíaca utilizando seringas heparinizadas. O ensaio cometa foi realizado conforme metodologia descrita por Hartmann *et al.* (2003), com modificações.

As lâminas foram preparadas com uma pré-cobertura de agarose "*Normal Melting"* a 1,5%. Foram coletados 10 µL de sangue de cada indivíduo e diluídos em 1ml de tampão PBS em tubo eppendorf de 2 ml. Em seguida foram retirados 10 µL desta suspensão e embebidos em 120 µL de agarose *"Low Melting Point"* a 0,5%, a qual estava em banho Maria a 37ºC. Essa mistura foi colocada em lâmina preparada com a pré-cobertura de agarose *"Normal Melting"* 1,5% e coberta com uma lamínula. As lâminas foram colocadas na geladeira a 4ºC durante dois minutos para que houvesse a solidificação do material. Após esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas então foram imersas em tampão de lise por até 24 horas.

Após 24 horas as lâminas foram retiradas da lise e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, incubadas em tampão alcalino deixando descansar por 30 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos, a 25 volts e 300 Amps. A neutralização foi feita com uma solução Tampão Tris a 0,4 M (pH 7,5) por três vezes, durante 5 minutos.

Após a neutralização essas lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas para secar na posição inclinada. A fixação foi feita com etanol absoluto por 5 minutos e o DNA foi corado com 20 µL da solução de brometo de etídeo a 10 ng/ul. Após a fixação a lamínula foi novamente colocada sobre a lâmina deixando descansar por aproximadamente 5 minutos. Após esse tempo essas lâminas foram analisadas sob microscopia de epifluorescência, utilizando um conjunto de filtros de excitação 515-560 nm, para fluorescência vermelha. Os núcleos das células foram visualizados utilizando a objetiva de 10X e a imagem fluorescente foi captada utilizando o "*software*" ISIS®.

Foram analisadas duas lâminas para cada anuro. Foram contados, aleatoriamente 50 células de cada lâmina totalizando 100 células por indivíduo, as quais foram visualmente classificados e agrupados em quatro *"scores"* : *"score"* 0 - sem dano, sem cauda; *"score"* 1 - dano pequeno, com cauda menor que o diâmetro da cabeça: *"score"* 2 - dano médio, com cauda maior que o diâmetro da cabeça; *"score"* 3 - dano Máximo, com cauda duas vezes maior que o diâmetro da cabeça.

Foram utilizados dois métodos para a avaliação dos danos genômicos: uma análise visual e uma análise através do programa *"Comet score"* versão 1.5.

Análise Visual

Para a análise visual foram calculados três parâmetros: porcentagem de classes de danos, índices de danos e frequência de danos a qual foi selecionado porcentagem de danos por ser o mais informativo.

A porcentagem de danos (PD) foi obtida de acordo com a ocorrência de classe de danos (*"score"* 0 a 3) em relação ao total de cometas contados, onde:

$$PD = \frac{\text{nº “}score\text{”} \cdot 100}{\text{total de cometas}}$$

Para calcular o índice de danos (IDT) soma-se os resultados dos índices de danos genômicos individuais, conforme a fórmula:

IDT = 0. (nº “*score”* 0) + 1. (nº “*score”* 1) + 2. (nº “*score”* 2) + 3. (nº “*score”* 3)

A frequência (F) de danos foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 0 a classe 3) em relação ao total de cometas analisados.

$$F = \frac{100 - \text{nº } \textit{“score”}\ 0 \cdot 100}{100}$$

Programa “*Comet Score*”

Para a análise através do programa “*Comet score*” versão 1.5 em cada cometa foram avaliados a altura do cometa, comprimento do cometa, área do cometa, área da cabeça, diâmetro do cometa, porcentagem de DNA na cabeça, comprimento da cauda, área da cauda, porcentagem de DNA na cauda, momento da cauda de Olive. Dentre os dez parâmetros avaliados foram selecionados o Comprimento do cometa.

Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados para detectar possíveis diferenças significativas, entre os *“scores”* e o comprimento do cometa, nas espécies de anfíbios anuros, coletadas nos seis municípios do estado de Goiás, foram o teste *t* pareado e a análise de variância (fator único). Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do teste Excel 2007. As médias dos *“scores”* e do comprimento do cometa foram demonstradas em gráficos para facilitar a visualização dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Visual

Pelos resultados obtidos na análise visual verificou-se que a porcentagem de danos genômicos nos 24 espécimes de anfíbios (Amphibia-Anura) analisados foram relativamente baixas.

Os anfíbios anuros coletados nos seis municípios estudados tiveram a porcentagem de danos genômicos analisada de acordo com a migração do DNA e classificadas em *“scores”* (Figura 1).

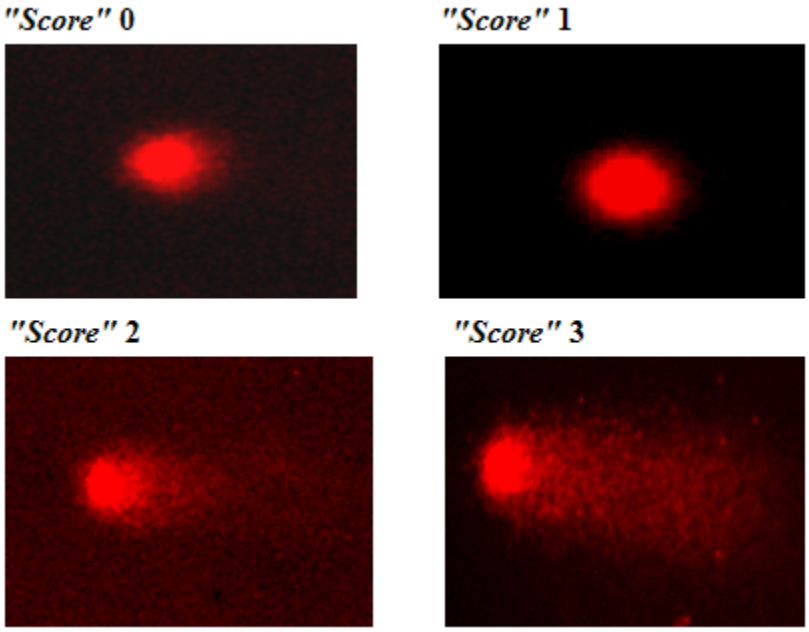

Figura 1: Categorias de cometas de acordo com a migração do DNA.

Em Serranópolis, *Dendropsophus minutus*, apresentou uma média de 85% das células classificadas com *"score"* 0 e em *Leptodactylus latrans* a média das células classificadas no *"score"* 0 foi 78,75 ± 13,6%. O indivíduo "c" de *L. latrans* apresentou 39% das células classificadas no "*score"* 1. Esses anuros foram coletados em uma área natural, ou seja, sem ação antrópica, o que provavelmente explica as baixas porcentagens de danos genômicos causadas nessas espécies (Tabela 2).

Tabela 2: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Serranópolis, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Dendropsophus minutus	85	15	0	0
Leptodactylus latrans - a	84	15	0	1
Leptodactylus latrans - b	85	15	0	0
Leptodactylus latrans - c	61	39	0	0

Dentre as quatro espécies de anfíbios anuros coletadas em Rio Verde (GO) em média 84 ± 6,7% das células analisadas foram classificadas no "*score"* 0; as células classificadas no "*score"* 1; apresentaram 8,2 ± 2,6 % de danos genômicos, o "*score"* 2; com média de 5,5 ± 3,4 % e 2,25 ± 0,96% das células analisadas apresentaram "*score"* 3 (Tabela 3). Apesar da coleta ter sido realizada em uma área não antropizada nesse município essas espécies de anuros, apresentaram uma alta porcentagem de danos comparada às de Serranópolis.

Tabela 3: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Rio Verde, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Leptodactylus latrans	93	4	2	1
Phyllomedusa azurea	84	9	4	3
Leptodactylus leptodactyloides	77	11	10	2
Pseudopaludicola saltica	82	9	6	3

Em Bela Vista (GO), *D. minutus* apresentou, em média 94 ± 6,6% das células classificadas no *"score"* 0; no "*score"* 1; a média foi de 5 ± 4,6%, no "*score"* 2; foram de 1 ± 2% e apenas 0,5 ± 1% das células apresentaram "*score"* 3. Como nos outros municípios, essa espécie apresentou uma baixa porcentagem de danos provavelmente por ter sido coletada em uma área, não antropizada, o que pode explicar os dados obtidos após a análise visual do ensaio cometa. Além disso, essa espécie segundo Giovanelli (2004) apresenta uma considerável plasticidade fenotípica, sendo capaz de habitar diversos tipos de ambientes, sem sofrer alterações significativas (Tabela 4).

Tabela 4: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Bela Vista, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Dendropsophus minutus - a	92	8	0	0
Dendropsophus minutus - b	100	0	0	0
Dendropsophus minutus - c	84	10	4	2
Dendropsophus minutus - d	100	0	0	0

Os anuros coletados no município de Mineiros (GO), apresentaram em média 96 ± 4,2% das células classificadas no *"score"* 0; no *"score"* 1; foram 2,5 ± 1,7% e em média 0,75 ± 1,5% das células analisadas foram classificadas nos *"scores"* 2 e 3. Somente *Pseudopaludicola saltica* Cope, 1887 apresentou células classificadas no *"score"* 3 (Tabela 5). As espécies de anuros foram coletadas em uma área, não antropizada, o que pode explicar os dados obtidos após a análise visual do ensaio cometa.

Tabela 5: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Mineiros, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Pseudopaludicola saltica	90	4	3	3
Scinax fuscovarius – a	100	0	0	0
Scinax fuscovarius – b	97	3	0	0
Scinax fuscovarius – c	97	3	0	0

No município de Jataí em média 76 ± 27,1% das células analisadas dos anuros coletados foram classificadas no "*score"* 0; no "*score"* 1; foram 17 ± 25,7%, no "*score"* 2; foram de 1,8 ± 2,1% e as células classificadas no *"score"* 3; apresentaram em média 5,2 ± 4,6%. A espécie *H. albopunctatus* parece ser um bom indicador de dano ambiental, em comparação com *D. minutus*, uma vez que, em média, 7% de suas células apresentaram *"score"* 3 (Tabela 6). *H. albopunctatus* segundo Frost (2007) não apresenta uma plasticidade fenotípica e uma tolerância a diversos ambientes.

Tabela 6: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Jataí, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Dendropsophus minutus	97	3	0	0
Hypsiboas albopunctatus - a	38	55	3	4
Hypsiboas albopunctatus - b	75	10	4	11
Hypsiboas albopunctatus - c	94	0	0	6

Em Aporé (GO) foram avaliadas quatro espécies de *H. albopunctatus*, em média 74 ± 26,3% das células analisadas com *"score"* 0; com "*score"* 1; foram observados 7,5 ± 6,8%, com "*score"* 2; foram 6,8 ± 6,7% e com *"score"* 3; foram em média 12 ± 16,8% (Tabela 7). Os anfíbios coletados neste município apresentaram maiores porcentagens de danos quando comparado com os coletados no município de Jataí, provavelmente devido a intensa atividade antrópica naquela região. Foi observado que *H. albopunctatus* apresentou maiores porcentagens de danos em comparação com as demais espécies de anuros coletadas nesse estudo.

Tabela 7: Espécies e porcentagens de danos genômicos em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados no município de Aporé, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Porcentagem de danos genômicos			
	"Score" 0	*"Score"* 1	*"Score"* 2	*"Score"* 3
Hypsiboas albopunctatus - a	40	11	12	37
Hypsiboas albopunctatus - b	100	0	0	0
Hypsiboas albopunctatus - c	88	4	2	6
Hypsiboas albopunctatus - d	67	15	13	5

Programa "*Comet score"*

Pelos resultados obtidos através do programa "*Comet score"* versão 1.5 foi possível verificar que as espécies de anfíbios anuros coletadas em Serranópolis apresentaram um comprimento médio dos cometas de 37,5 unidades arbitrárias (UA). A espécie *D. minutus* demonstrou danos maiores quando comparado aos *"scores"* classificados em porcentagem de danos (Tabela 8).

Tabela 8: Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Serranópolis, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Dendropsophus minutus	44,57
Leptodactylus latrans - b	38,97
Leptodactylus latrans - a	37,09
Leptodactylus latrans - c	29,54

* Unidades arbitrárias

No município de Rio Verde, foram coletados quatro espécies de anfíbios anuros, e a média do comprimento dos cometas foram de 43,5 UA (Tabela 9). A média do comprimento dos cometas encontrados nos anfíbios coletados em Rio Verde foi maior que os coletados no município de Serranópolis. O teste t, indicou que esses valores foram estatisticamente significativos (p=0,03), indicando que as espécies de anuros de Rio Verde apresentaram maiores extensões de lesões genômicas, em relação as espécies coletadas em Serranópolis.

Tabela 9: Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Rio Verde, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Leptodactylus latrans	54,17
Phyllomedusa azurea	42,64
Leptodactylus leptodactyloides	40,16
Pseudopaludicola saltica	37,15

* Unidades arbitrárias.

A média do comprimento dos cometas encontrados nos quatro exemplares de *Dendropsophus minutus* coletados no município de Bela Vista (GO) foi de 37,4 UA (Tabela 10). O teste t não indicou diferença estatisticamente significativa entre o comprimento dos cometas encontrados nos anuros coletados nesse município, em relação à Serranópolis (p=0,06) e Rio Verde (p=0,48).

Tabela 10. Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Bela Vista, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Dendropsophus minutus - a	46,51
Dendropsophus minutus - b	45,07
Dendropsophus minutus - c	29,92
Dendropsophus minutus - d	28,21

* Unidades Arbitrárias

No município de Mineiros (GO), a média do comprimento dos cometas encontrados para as quatro espécies de anuros coletados foi de 33,8 UA um valor mais baixo do que os encontrados em Serranópolis, Rio Verde e Bela Vista (Tabela 11).

O teste t detectou diferenças estatisticamente significativas do comprimento dos cometas entre os anuros coletados nos Serranópolis (p=0,03) e Rio Verde (p=0,002). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre esse parâmetro encontrados nos anuros coletados em Bela Vista.

Tabela 11: Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Mineiros, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Scinax fuscovarius - c	40,72
Pseudopaludicola saltica	34,58
Scinax fuscovarius - b	30,79
Scinax fuscovarius - a	29,05

UA[1] – Unidades arbitrárias.

No município de Jataí (GO), os anuros coletados apresentaram o comprimento médio dos cometas de 75,9 UA. A espécie *H. albopunctatus* foi a que apresentou maior comprimento dos cometas com 105,91 UA (Tabela 12). Como relatado na análise visual, essa espécie parece ser um bom indicador de degradação ambiental, uma vez que foi uma das poucas espécies de anfíbios anuros, que apresentou células classificadas no "*score"* 3.

O teste t detectou diferenças estatisticamente significativas entre o comprimento dos cometas avaliados nos anfíbios observados nos municípios de Mineiros (p=0,03), Bela Vista (p=0,02) e Serranópolis (p=0,04). O único município no qual não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas foi o de Rio Verde (p=0,06).

Tabela 12: Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Jataí, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Hypsiboas albopunctatus – a	105,91
Hypsiboas albopunctatus – c	105,91
Dendropsophus minutus	46,88
Hypsiboas albopunctatus – b	45,19

* Unidades Arbitrárias.

Os anfíbios coletados no município de Aporé (GO), apresentaram um comprimento médio dos cometas de 58,5 UA sendo que, *H. albopunctatus* parece ser uma espécie mais sensível a danos ambientais, em comparação com as demais espécies de anfíbios anuros coletadas (Tabela 13). O teste t não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados nos municípios de Jataí e Aporé (p=0,06).

Tabela 13. Espécies e comprimento dos cometas em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados em Aporé, Goiás. Dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Espécies	Comprimento do cometa (UA*)
Hypsiboas albopunctatus - a	81,45
Hypsiboas albopunctatus - b	68,08
Hypsiboas albopunctatus - c	45,45
Hypsiboas albopunctatus - d	39,04

* Unidades Arbitrárias.

Através da análise de variância foi constatado que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores do comprimento dos cometas encontrados (p=0,1). A diferença total entre o comprimento dos cometas dos 24 espécimes de anuros coletadas nos seis municípios do Estado de Goiás foram em torno de 10%.

CONCLUSÕES

A avaliação de danos genômicos causados em anfíbios (Amphibia-Anura) coletados nos seis municípios do Estado de Goiás foram uma análise preliminar utilizando o ensaio cometa.

Os anfíbios anuros coletados em áreas antropizadas apresentaram maiores porcentagens de danos e comprimento dos cometas quando submetidos à Análise visual e pelo programa *"Comet score"*, respectivamente.

O programa *"Comet score"* parece ser mais adequado para avaliação de danos genômicos, pois este apresenta mais parâmetros a serem analisados, além de reduzir a subjetividade da Análise visual.

Para que possa ser realizada uma análise mais aprofundada, sobre danos genômicos, é necessário aumentar a quantidade de indivíduos da mesma espécie.

Vale ressaltar que estudos futuros relacionados a danos genômicos poderão ser realizados com *Hypsiboas albopunctatus*, a qual mostrou ser uma espécie mais sensível a danos ambientais.

ASSESSMENT OF DAMAGES GENOMIC IN AMPHIBIANS ANURANS OF GOIAS CERRADO

Abstract: *Amphibians act as components of many ecological communities, both by consuming a multitude of insects, as for serving as prey to other animals, and can also be used as indicators of environmental quality. Due to their sensitivity to changes in habitat and its need for water during larval amphibians have been considered as biomarkers of aquatic and terrestrial ecosystems.*

Keywords: *Frogs. Comet assay. Biomarkers. Genotoxicity environmental.*

Referências

ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R. I.; SMITH, M. J. A comparative evaluation of aflatoxin B genotoxicity in fish models using the comet assay. *Mutation Research Amsterdam*, v.[1]446, p. 181-188, 1999.

AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do Cerrado, p. 19-42. In: AGUIAR. L. M. S.; CAMARGO, A. (Eds.). *Ecologia e caracterização do Cerrado*. *Embrapa Cerrados,* Planaltina. Brasília, p. 232, 2004.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, v. 463, p. 111-172, 2000.

AMPHIBIAWEB. 2008. Information on amphibian biology and conservation. Disponível em: <http://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 17 jul. 2010.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSHI, M. Development and validation of the alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*, v. 415, p. 167-184, 1998.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, v. 13, p. 681-684, 2002.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead, In: BAILEY, R. (Eds.). *Global warming and other eco-myths*. Competitive *Enterprise Institute*. Roseville, p. 29-60, 2002.

CARAMACHI, U. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). *Nature*, v. 5, p. 5-10, 2006.

CARAMASCHI, U. *Aspectos ecológicos dos anfíbios (Amphibia, Anura) registrados na região de Botucatu, São Paulo*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1980.

CAVALCANTI, R.; JOLY, C. The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna. *Columbia University Press*, *New York*, v. 15, p. 351-367, 2002.

COLLI, G. R.; BASTOS, R. P.; ARAÚJO, A. F. B. The character and dynamics of the Cerrado Herpetofauna. In: OLIVEIRA P.S., MARQUIS, R.J. (Eds.). *The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press,* New York, p. 223-241, 2002.

DIAS, B. F. S. Cerrados: uma caracterização. In: DIAS, B. F. S. (Eds.). *Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis.* IBAMA, Brasília, DF, p. 11-25, 1992.

FROST, D. R. *Amphibian species of the world: an online reference*. 2007. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em: 19 jul. 2010.

FROST, D. R. *Amphibian species of the world: an online reference*. 2008. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em: 19 jul. 2010.

GIBBONS, J. W. et al. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *Bioscience*, v. 50, p. 653-666, 2002.

GIOVANELLI, J. G. R. *Atividade reprodutiva de Hyla minuta na região de Itirapina, estado de São Paulo.* Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP. 2004.

GRANDINETTI, L.; JACOBI, C. M. Distribuição estacional e espacial de uma taxocenose de anuros (Amphibia) em uma área antropizada em Rio Acima – MG. *Revista*

Brasileira de Biologia, v. 8, p. 10-18, 2003.

HARTMANN, A. et al. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research*, v. 536, p. 27-38, 2003.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. 2004. Red List of Threatened Species. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 mar. 2010.

KWET, A. T. Amphibians Epipucrs. *Neotropica*, v. 12, p. 95-107, 1999.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. *Biodiversidade brasileira:* síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Ed. Contexto, 2003.

LIMA, A. P. W. E. et al. *Guia de sapos da reserve Adolpho Ducke. Amazônia Central.* Manaus: Ed. Attema, 2006.

MACHADO, R. B. et al. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado, p. 29-38. *Resumos do IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. Curitiba, PR. p. 163, 2004.

MEDEIROS, S. A. F. Agricultura Moderna e Demandas Ambientais: o caso da soja nos cerrados, p. 143-149. In: GOULART, L. M.; BRAGA, M. L. S. *Tristes Cerrados:* sociedade e biodiversidade. Brasília: Paralelo 15, 1998.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res*., v. 399, p. 135-147, 1998.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. v. 122, p. 86-94, 1990.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* v. 123, p. 291-298, 1984.

RELYA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Applic*., v. 15, p. 618-627, 2002.

RIBEIRO, J. F.; SANO, S. M.; SILVA, J. A. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. *Resumos Congresso Nacional de Botânica.* Sociedade Botânica do Brasil, p. 124-133, 1981.

ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. Distribuição Espacial e Temporal de anfíbios Anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Nature*, v. 3, n. 2, p. 136-149, 2001.

ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros da Família Hylidae na região de Botucatu, São Paulo. *Rev. bras. Biol*., v. 54, p. 323-334, 1994.

SATO, M. N.; MIRANDA, H. S. Delimitação do conceito de Cerrado. *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas.* Brasília, DF, p. 93-101, 1996.

SBH. 2004. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 06 ago. 2010.

SBH. 2008. Sociedade brasileira de Herpetologia. Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 05 ago. 2010.

SILVA, J. M. C.; SANTOS, J.M. Na alkaline single – cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol*., v. 23, p. 241-245, 2005.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitations of low levels of DNA damage in individual cells, v. 175, p. 184-191, 1988.

TABAN, I. C. et al. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research*, v. 58, p. 701-705, 2004.

TOLEDO, L. F. et al. *Guia interativo dos anfíbios anuros do Cerrado, Campo Rupestre e Pantanal.* São Paulo: Ed Neotrópica, 2007.

TRUEB, L. *Biology of Amphibians*. New York, NY: McGraw-Hill, 1994.

UETANABARO, M. et al. Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno. Campo Grande: Ed. UFMS, 2008.

* Aprovado em: 15.11.2014. Recebido em: 25.11.2014.

MACKS WENDHELL GONÇALVES
Graduando de Biologia pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás). Bolsista CNPq pelo Núcleo de Pesquisas Replicon. *E-mail*: macksplS@hotmail.com

WANESSA FERNANDES CARVALHO
Bióloga graduado pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Mestrado em andamento pelo programa de Mestrado em Genética da PUC Goiás.

RODRIGO RONCATO PEREIRA
Biólogo graduado pela PUC Goiás. Mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

DANIELA DE MELO E SILVA
Biomédica graduada pela PUC Goiás. Mestrado em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Doutorado em Biologia Animal pela Universidade de Brasília (UnB). Pesquisadora do Núcleo de Pesquisas Replicon.

ROGÉRIO PEREIRA BASTOS
Biólogo pela Universidade Federal do Espírito Santo. Mestrado e Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Professor Associado III pela UFG.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ
Biomédico graduado pela PUC Goiás. Doutorado em Biologia Molecular pela University of Victória. Professor titular do departamento de Biologia da PUC Goiás.