

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE**  
**CAMPUS SOROCABA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO**  
**AMBIENTAL**

FELIPE AUGUSTO PINTO VIDAL

**OS EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE LÍTIO E DA SUPLEMENTAÇÃO  
COM SELÊNIO SOBRE A METAMORFOSE DE GIRINOS DE RÃS-TOURO,**  
*Lithobates catesbeianus.*

SOROCABA

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE**  
**CAMPUS SOROCABA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO**  
**AMBIENTAL**

FELIPE AUGUSTO PINTO VIDAL

**OS EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE LÍTIO E DA SUPLEMENTAÇÃO  
COM SELÊNIO SOBRE A METAMORFOSE DE GIRINOS DE RÃS-TOURO,**  
*Lithobates catesbeianus.*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA).

**Orientação:** Profa. Dra. Monica Jones Costa

**Coorientação:** Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

SOROCABA

2019

Vidal, Felipe Augusto Pinto

Os efeitos do contaminante emergente lítio e da suplementação com selênio sobre a metamorfose de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* / Felipe Augusto Pinto Vidal. -- 2019.  
99 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Monica Jones Costa

Banca examinadora: Silvia Pierre Irazusta, Raquel Fernanda Salla Jacob

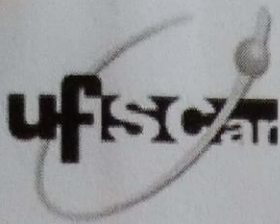
Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Anfíbios. 3. Contaminantes emergentes. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

### Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Felipe Augusto Pinto Vidal, realizada em 22/02/2019:

Prof. Dra. Monica Jones Costa  
UFSCar

Prof. Dra. Sílvia Pierre Irazusta  
CEETEPS

Prof. Dra. Raquel Fernanda Salla  
UNICAMP

**FELIPE AUGUSTO PINTO VIDAL**

**OS EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE LÍTIO E DA SUPLEMENTAÇÃO  
COM SELÊNIO SOBRE A METAMORFOSE DE GIRINOS DE RÃS-TOURO,  
*Lithobates catesbeianus*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), Sorocaba, 22 de fevereiro de 2019.

**Orientação:** Profa. Dra. Monica Jones Costa

**Coorientação:** Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

**Orientadora:**

---

Dra. Monica Jones Costa

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Examinadora:

---

Dra. Silvia Pierre Irazusta

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – FATEC SO

Examinadora:

---

Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

SOROCABA

2019

## AGRADECIMENTOS

A trajetória que percorri até a entrega dos resultados descritos no presente trabalho foi um caminho de muito aprendizado intelectual e pessoal, de forma que, não só evoluí expressivamente enquanto profissional, mas também enquanto pessoa. Ressalto que essa jornada não se consumou de maneira unilateral, nem seria capaz. Devo o mérito deste trabalho à diversas pessoas que dedicaram tempo, afeto e recursos materiais em benefício do meu projeto.

Primeiramente agradeço à Profa. Dra. Monica Jones Costa e à Profa. Cleoni dos Santos Carvalho pela orientação, pela confiança no meu trabalho, mas não só por isso, agradeço principalmente pela amizade e companheirismo que desenvolvemos durante esses anos trabalhando juntos, sempre soube o tipo de profissional que quero ser, depois de conhecer vocês eu também adquiri uma referência do tipo de ser humano que almejo ser. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla, agradeço pela generosíssima colaboração em relação às análises histológicas, por também confiar no meu trabalho e por abrir as portas do seu laboratório possibilitando o enriquecimento desta dissertação com análises morfológicas, também sou grato em grande parte pelos conselhos e ensinamentos que compartilhou comigo.

À MSc. Heidi Utsunomiya, que me ajudou com tudo o que se refere às análises bioquímicas deste trabalho, passou horas no laboratório me ensinando enquanto poderia estar descansando, não só isso, mesmo depois de oferecer semanas de ajuda, ainda se dispôs a continuar me auxiliando no que fosse necessário, se mostrou não apenas como uma profissional excelente, mas muito mais que isso, um ser humano generoso e admirável, muito obrigado Heidi a sua ajuda foi crucial.

Agradeço à Dra. Raquel Salla Jacob pelos ensinamentos que compuseram a minha formação durante meu período na UFSCar e especificamente pelas sugestões relativas às análises histológicas que compõe o presente trabalho.

Aos técnicos Dr. Fernando Urban Gamero, Dr. Leonardo Pitombo, MSc. Mônica de Almeida e Eliane Morgado pelo suporte, atenção e amizade, também à secretária Roseli Parré por sempre me orientar e fornecer todo o apoio necessário desde o início das minhas atividades no PPGBMA, o meu muito obrigado.

Aos meus professores da graduação MSc. Ruggero Zalla Neto, Dra. Priscila Randazo de Moura, MSc. Erika Neworal e MSc. Daiana Tobias Nunes que me ofereceram orientações e me encorajaram desde quando a ideia para cursar o mestrado ainda era uma semente; essa atenção que desprenderam à minha demanda não só resultou no presente trabalho, mas na minha gratidão pessoal e profissional, me espelho nessa atitude gratuita, certo de que um dia poderei encorajar outros alunos como vocês o fizeram.

À minha família que me ensinou que o investimento em estudos é sempre uma boa opção, me ofereceram suporte e incentivo desde os primeiros passos. A verdade é que sem um alicerce sólidos não podemos crescer firmes, e sem dúvida a minha família é um exemplo de união que me fez crescer sobre um solo inabalável mesmo que tudo estivesse se esfarelando nas orbitas externas. Ao nosso patriarca Ermantino Domingues Pinto e nossa matriarca Benedita Ribeiro Pinto, me ofereceram o seio paterno e materno acreditaram em mim e comemoraram cada uma das minhas conquistas. Minha mãe Rosana Vidal, que sem dúvida é a mulher mais forte que há, aguentou sozinha todas as dificuldades que uma mulher pode ter que passar, ainda sim se manteve como um exemplo do qual eu me orgulho profundamente, meus irmãos Renata, Rafael, Ana Cristina e Arthur, o seio fraternal é de fato um dos pilares deste trabalho tão importante quanto o rigor científico. À minha tia Silvana Nogueira, meu tio Carlos Nogueira, primos Patrick Nogueira e Laura Nogueira, que além do apoio familiar também me auxiliaram com questões matemáticas.

Jessica, que além de fornecer todo o afeto, ainda me ajudou nos preparos do projeto, estando comigo desde a decisão de iniciar uma tarefa complexa quanto essa, até na hora de ir para a bancada do laboratório, a sua ajuda permeia todos os campos deste trabalho, a isto sou eternamente grato.

Aos amigos Regis Soares, Filipe Soares, Raul Alves e Renan Silva pela ajuda em relação a obtenção das imagens, preparo das exposições e análises histológicas, o companheirismo de vocês tem o meu profundo agradecimento. Ao Leonardo Oliveira, que me acompanhou durante todo o projeto eu sou grato, não só a ajuda, mas também pela amizade.

Toda a estrutura que me foi fornecida; a Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Biologia, Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC), Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM), Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), Laboratório de Bioclima, Centro de Ciências de Tecnologia para a Sustentabilidade (CCTS) foram essenciais, de forma que não agradeço só às pessoas, mas também às instituições.

Fica o meu agradecimento à Empresa Refriso - Sorocaba pelo generoso fornecimento das garrafas utilizadas para o presente experimento.

Certo de que a única forma de retribuir todo esse acolhimento e companheirismo seria imprimir todo meu empenho neste trabalho, já que isso também refletiria a importância da ajuda de cada um de vocês, entrego os nossos resultados ao Centro de Ciências de Tecnologia para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



*"nos esse quasi nanos gigantum humeris insidentes[...]"*

**Bernardo de Chartres**

## RESUMO

VIDAL, F.A.P. Os efeitos do contaminante emergente lítio e da suplementação com selênio sobre a metamorfose de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *Campus Sorocaba*, Sorocaba, 2019.

A maioria dos contaminantes descartados no ambiente, como o lítio e o selênio, ainda carecem de estudos a respeito dos efeitos que podem causar sobre a natureza; e por isso são chamados de contaminantes emergentes. O presente trabalho objetivou avaliar por meio de análises morfológicas, comportamentais, bioquímicas e histológicas possíveis consequências que concentrações consideradas seguras pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) - 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de lítio e 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de selênio - podem gerar sobre a metamorfose de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Para tanto, foram realizadas exposições isoladas à cada um dos elementos, bem como um grupo exposto aos dois elementos combinados. Quando os animais foram expostos ao lítio e ao selênio combinado ao lítio, ocorreu uma diminuição do nível de atividade tanto após 7 dias, quanto após 21 dias de exposição. A análise da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) do músculo da cauda evidenciou uma redução apenas nos grupos expostos ao selênio combinado ao lítio, tanto após 7 quanto após 21 dias. A mobilização da glicose hepática estava mais elevada nos grupos expostos ao lítio e ao selênio combinado ao lítio no 7º dia. Já no 21º dia observamos uma redução da mobilização hepática de glicose no grupo exposto ao selênio isoladamente. A mobilização da glicose no tecido muscular caudal não se alterou em nenhum dos cenários. Observamos um aumento da mobilização de triglicérides em todos os grupos expostos, tanto após o 7º quanto após o 21º dia. Por sua vez, a mobilização de triglicérides no tecido muscular da cauda não foi alterada. A concentração de proteínas hepáticas e muscular caudal não mostrou diferença para nenhum grupo em nenhum período testado. As análises histológicas da glândula tireóide e da pele foram realizadas apenas nos animais expostos durante 21 dias e observamos uma diminuição na área total da glândula, uma diminuição da área dos folículos, bem como uma diminuição do número total de folículos para todos os grupos expostos. A análise de secções longitudinais da pele dos animais mostrou que para todos os grupos expostos houve espessamento da epiderme dorsal. Assim, podemos dizer que a exposição a esses elementos, mesmo em concentrações permitidas pela agência ambiental brasileira, resultou em prejuízos ao desenvolvimento normal dos girinos de *L. catesbeianus*. Dessa forma, espera-se que com os resultados obtidos, questões de importância ecológica e preservacionista

passem a ser discutidas não apenas no âmbito científico, mas também junto às agências reguladoras.

**Palavras-chave:** Biomarcadores. Ecotoxicologia Aquática. Anuros. Combinação de Poluentes. Contaminantes Emergentes.

## ABSTRACT

VIDAL, F.A.P. The effects of the emergent contaminant lithium and the selenium supplementation over the metamorphosis of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *Campus Sorocaba*, Sorocaba, 2019.

Most of the pollutants discarded into the environment, such as lithium and selenium, are still lacking in studies of the effects that they cause in nature and are therefore called emerging pollutants. The objective of this study was to evaluate the effects of concentrations considered safe by the Brazilian Environmental Council (CONAMA) (2.5 mg.L<sup>-1</sup> for lithium and 0.01 mg.L<sup>-1</sup> for selenium) over morphometric, behavioral, biochemical and histological parameters of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) during the metamorphic process. For that, we used isolated exposures of each of these elements, as well as a group exposed to the two elements combined. Our work showed that when animals were exposed to lithium and selenium plus lithium, there was a significant decrease in activity level both after 7 days of exposure and after 21 days of exposure. The analysis of the activity of the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme of the tail muscle showed a reduction only in the groups exposed to selenium plus lithium, both after 7 and after 21 days. Hepatic glucose mobilization was higher in the lithium and selenium plus lithium groups on day 7. In the 21<sup>st</sup> day, what we saw was a reduction of hepatic glucose mobilization in the group exposed to selenium. The mobilization of glucose in the tail muscle tissue did not change in any of the scenarios. We observed an increase in the mobilization of triglycerides in all groups exposed, both on the 7th and 21st days. In turn, the mobilization of triglycerides in tail muscle tissue showed no changes. Liver and caudal muscle protein levels showed no difference for any group in any of the periods tested. The histological analyzes of the thyroid tissue and skin were performed only on the 21st day, so we observed a decrease in the total area of the gland, a decrease in the area of the follicles, as well as a decrease in the total number of follicles for all exposed groups. When analyzed longitudinal sections of the animals' skin, we observed that for all groups there were thickening of the epidermis. Thus, we can say that exposure to these elements, even in concentrations allowed by the Brazilian environmental agency, showed that there may be damage to the normal development of *L. catesbeianus* tadpoles. Thus, it is hoped that with the results obtained, issues of ecological and preservationist importance will be discussed not only in the scientific area, but also in the regulatory agencies.

**Keywords:** Biomarkers. Aquatic Ecotoxicology. Anurans. Combination of Pollutants. Emerging Contaminants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Diferentes tipos de anfíbios.....	20
<b>Figura 2</b> – As diferentes fases do processo metamórfico de anfíbios anuros.....	22
<b>Figura 3</b> – Consumo global de lítio entre os anos de 2008 a 2016.....	26
<b>Figura 4</b> – Principais fontes de poluição aquática de selênio.....	28
<b>Figura 5</b> – Níveis de organização biológica e as respostas em relação a exposição a poluentes.....	31
<b>Figura 6</b> – Espécime de rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ) pós-metamórfica.....	34
<b>Figura 7</b> – A. Girino rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ).....	35
<b>Figura 8</b> – Esquema de organização do Ranário Santa Rosa.....	37
<b>Figura 9</b> – Forma da exposição individual de cada grupo experimental.....	39
<b>Figura 10</b> – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração dos biomarcadores: distância focinho cloaca (DFC) e comprimento do membro posterior normalizados (CMPN).....	41
<b>Figura 11</b> – Reação enzimática para a quantificação de glicose em amostras biológicas.....	43
<b>Figura 12</b> – Reação enzimática para a quantificação de triglicérides em amostras biológicas.....	44
<b>Figura 13</b> – Esquema de organização dos cortes na lâmina.....	45
<b>Figura 14</b> – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da área da glândula tireoide.....	46
<b>Figura 15</b> – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da área total dos folículos da glândula tireoide.....	47
<b>Figura 16</b> – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da espessura da epiderme dorsal.....	49
<b>Figura 17</b> – Pigmentação normal e pigmentação após exposição de 21 dias ao lítio e ao selênio mais lítio.....	53
<b>Figura 18</b> – O estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos animais no 7º dia de exposição.....	54
<b>Figura 19</b> – O estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos animais no 21º primeiro dia de exposição.....	55
<b>Figura 20</b> – Distância entre o focinho e a cloaca (DFC).....	56
<b>Figura 21</b> – Comprimento do membro posterior normalizado.....	57
<b>Figura 22</b> – Resultados referentes a massa úmida total dos animais expostos e do grupo controle no 7º dia e no 21º dia.....	58
<b>Figura 23</b> – Nível de Atividade (N.A).....	59
<b>Figura 24</b> – Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no músculo.....	60
<b>Figura 25</b> – Níveis de glicose hepática nos diferentes grupos.....	61
<b>Figura 26</b> – Níveis de glicose muscular.....	62
<b>Figura 27</b> – Níveis de triglicérides no tecido hepático.....	63
<b>Figura 28</b> – Níveis de triglicérides muscular caudal.....	64
<b>Figura 29</b> – Concentração de proteínas do tecido hepático.....	65
<b>Figura 30</b> – Concentração de proteínas no tecido muscular caudal.....	66
<b>Figura 31</b> – Área total da glândula tireoide.....	67
<b>Figura 32</b> – Área total dos folículos após 21 dias de exposição.....	68
<b>Figura 33</b> – Número total de folículos após 21 dias de exposição.....	69
<b>Figura 34</b> – Cortes longitudinais da glândula tireoide.....	70
<b>Figura 35</b> – Cortes longitudinais da glândula tireoide.....	71
<b>Figura 36</b> – Espessura da epiderme dorsal dos animais expostos após 21 dias.....	72
<b>Figura 37</b> – Cortes longitudinais corados com Hematoxilina.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados ecotoxicológicos produzidos utilizando-se de rã-touro como animal modelo.....	35
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros físicos e químicos da água durante a aclimação .....	37
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros físicos e químicos da água durante a exposição .....	38
<b>Tabela 4</b> – Biomarcadores analisados ao decorrer do experimento. ....	39
<b>Tabela 5</b> – Comportamento do grupo CT nos dois períodos analisados. ....	52
<b>Tabela 6</b> – Descrição do desenvolvimento dos animais segundo Gosner (1960) para os animais no sétimo dia de experimento.....	54
<b>Tabela 7</b> – Descrição do desenvolvimento dos animais segundo Gosner (1960) para os animais no vigésimo primeiro dia de experimento. ....	55
<b>Tabela 8</b> – Comportamento dos grupos expostos em relação ao grupo CT no dia 07.....	74
<b>Tabela 9</b> – Comportamento dos grupos expostos em relação ao grupo CT no dia 21.....	74
<b>Tabela 10</b> – Resumo das correlações de Pearson e Spearman obtidos através da comparação entre dados quantitativos para os biomarcadores bioquímicos. ....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ATP** – Adenosina trifosfato

**ACTH** – Hormônio adrenocorticotrópico

**CMPN** – Comprimento do membro posterior normalizado

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

**CRH** – Hormônio liberador de corticotrofinas

**DDT** – Diclorodifeniltricloroetano

**DFC** – Distância entre o focinho e a cloaca

**HHT** – Hipotálamo-hipófise-tireoide

**HT** – Hormônios tireóideos

**LDH** – Lactato desidrogenase

**NADH+ H<sup>+</sup>** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

**NAD<sup>+</sup>** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

**OECD** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**PCB** – Bifenilas policloradas

**SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>** – Selenito

**SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>** – Selenato

**T3** – Triiodotironina

**T4** – Tiroxina

**TRH** – Hormônio liberador de tireotrofinas

**TSH** – Hormônio tireotrófico



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>20</b>
3.1 ANFÍBIOS .....	20
3.2. ECOTOXICOLOGIA .....	23
3.3 LÍTIOS .....	25
3.4 SELÊNIO .....	27
3.5 BIOMARCADORES .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 O ANIMAL MODELO .....	33
<b>4.1.1 Uso de <i>Lithobates catesbeianus</i> como animal modelo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1.2 Obtenção dos animais e aclimação</b> .....	<b>36</b>
4.2 Delineamento experimental dos ensaios ecotoxicológicos .....	37
4.3 Biomarcadores.....	40
<b>4.3.1 Estadiamento segundo Gosner (1960)</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3.2 Biomarcadores morfométricos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3.3 Determinação da massa úmida</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.4 Determinação do nível de atividade</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.5 Biomarcadores bioquímicos</b> .....	<b>42</b>
4.3.5.1 Concentração de proteínas hepática e muscular caudal.....	42
4.3.5.2 Concentração de glicose hepática e muscular caudal.....	43
4.3.5.3 Concentração de triglicéride hepático e muscular caudal .....	43
4.3.5.4 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) .....	44
<b>4.3.6 Análise histológica da glândula tireoide</b> .....	<b>45</b>
4.3.6.1 Determinação da área da glândula tireoide .....	46
4.3.6.2 Determinação da área dos folículos tireóideos.....	47
4.3.6.3 Determinação quantidade total de folículos tireóideos.....	48
4.3.6.4 Análise da espessura da epiderme do tecido dorsal.....	48
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	49
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1 COMPORTAMENTO DO GRUPO CONTROLE (CT) .....	51
5.2 COMPORTAMENTO DO GRUPO CONTROLE (CT) COMPARADO AOS GRUPOS EXPOSTOS .....	52
<b>5.2.1 Mortalidade</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.2 Desenvolvimento metamórfico segundo o estadiamento de Gosner (1960)</b> .....	<b>53</b>
<b>5.2.3 Distância entre o focinho e a cloaca (DFC) e comprimento do membro posterior normalizado (CMPN)</b> .....	<b>56</b>

5.2.4 Massa úmida total .....	57
5.2.5 Nível de atividade (NA) .....	58
5.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	59
5.3.1 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no tecido muscular caudal .....	59
5.3.2 Quantificação da concentração de glicose hepática e muscular caudal .....	60
5.3.4 Quantificação da concentração de triglicérides hepático e muscular caudal .....	62
5.3.5 Quantificação da concentração de proteínas hepáticas e muscular caudal.....	64
5.4 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS .....	66
5.4.1 Análise histológica da glândula tireoide.....	66
5.4.2 Análise da espessura da epiderme dorsal.....	71
5.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES .....	75
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
6.1 BIOMARCADORES DE DESENVOLVIMENTO E DE ATIVIDADE .....	76
6.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	77
6.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS .....	79
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A classe denominada Amphibia vem habitando o nosso planeta há cerca de 350 milhões de anos (DUELLMAN; TRUEB, 1994), contudo, nos últimos 30 anos temos observado um drástico declínio na população destes animais (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005). Aproximadamente 70% das espécies de anfíbios têm apresentado esse padrão de diminuição em suas populações (HAYES, *et al.*, 2010), sendo as regiões tropicais como a Região Mesoamérica, Madagascar e o Brasil os locais onde estes animais apresentam maior risco de extinção (ALROY, 2015). Dentre as causas apontadas para esse declínio estão, isoladas ou associadamente, o aquecimento global, a fragmentação ou degradação do habitat, propagação de fungos patógenos (ALROY, 2015; SALLA *et al.*, 2015; SODHI, *et al.*, 2008), exploração das espécies para fins comerciais (POWELL; INCHAUSTEGUI, 2009; SODHI *et al.*, 2008), alterações climáticas e a poluição (COLLINS; STORFER, 2003; DAL-MEDICO *et al.*, 2014).

Em relação à poluição, podemos dizer que todos os dias uma enorme carga destes poluentes atinge o ambiente. Grande parte destes compostos são substâncias utilizadas no dia a dia da população levando à falsa crença de que não exercem efeitos nocivos nos locais aonde serão despejados. Essa nova classe de poluentes é denominada contaminantes emergentes (BOLONG *et al.*, 2009; GAGNÉ *et al.*, 2006). Dentre esses compostos incluem-se os fármacos (BOLONG *et al.*, 2009), que chegam ao ambiente geralmente após situações de pós-consumo, ou seja, medicamentos que uma vez consumidos são excretados (alterados ou na forma inalterada) através das fezes ou urina e acabam sendo despejados no sistema de esgoto, que na maioria das vezes não foi projetado para a remoção efetiva dos mesmos (SANTOS *et al.*, 2010; ZORITA *et al.*, 2009). Contudo, outras situações como o escoamento de resíduos agrícolas e urbanos, bem como o descarte inadequado de resíduos tóxicos diretamente nos corpos d'água resulta na contaminação por outras moléculas diversas como cosméticos, detergentes, agroquímicos, entre outros (BOLONG *et al.*, 2009; GAGNÉ *et al.*, 2006; HOOK *et al.*, 2014; MARANHO *et al.*, 2015).

É fato que o ambiente aquático acaba sendo o destino final de boa parte desses poluentes; contudo, o estabelecimento de uma legislação adequada para o manejo destas águas é dificultado pela insuficiência de estudos a respeito dos efeitos que essas substâncias causam nos organismos expostos (SANTOS *et al.*, 2010). A legislação brasileira, por meio da resolução 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (DOU nº

053, de 18/03/2005) dispõe sobre a classificação dos corpos d'água, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes. O artigo 4º inciso II define as águas de classe 1 como sendo aquelas que são destinadas ao consumo humano, recreação, irrigação de frutas e hortaliças, bem como para **proteção de comunidades aquáticas**. Para a qualidade aceitável dessas águas, o CONAMA considera ambientalmente segura uma concentração de lítio de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> e de selênio de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).

Tanto o lítio quanto o selênio são utilizados em diversas atividades industriais, desde a indústria de produção de vidros e pigmentos até a indústria da química fina para a produção de medicamentos (GRUBER *et al.*, 2011; LIDE, 2005; LIU *et al.*, 2012, p. 325; USGS, 2018; YOUNG *et al.*, 2010, p. 15), assim constituindo diversas fontes potenciais de contaminação. Contudo, apesar destes elementos serem muito bem conhecidos e suas aplicações muito bem estabelecidas, a maior parte da literatura sobre a toxicidade desses compostos se limita à toxicologia médica, utilizando mamíferos como modelos animais. O lítio, amplamente prescrito para disfunções psiquiátricas (BRUNTON *et al.*, 2010, p. 299; RUGIERO *et al.*, 1994), tem sido relacionado à distúrbios cardíacos (MAMIYA *et al.*, 2005; MOHANDAS; RAJMOHAN, 2007) e do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (eixo HHT) (BOEVING *et al.*, 2005; FRANKENFELD *et al.*, 2002; GERMAIN, 1987; GIUSTI *et al.*, 2012; KUSHCHAYEVA *et al.*, 2014; MARKOU *et al.*, 2001; MELTZER, 2014, p. 504; MOHANDAS; RAJMOHAN, 2007), além de indução do estresse oxidativo (KIEŁCZYKOWSKA *et al.*, 2015a; KIEŁCZYKOWSKA *et al.*, 2015b). Não obstante, informações relativas à exposição de anfíbios a esse metal ainda são escassas (LANCTOT *et al.*, 2017; SCIENCES; ROAD, 2003).

O selênio já foi amplamente estudado em populações humanas, geralmente com o intuito de avaliar os efeitos da privação deste elemento sobre doenças cardíacas (CUI *et al.*, 2012; DUNTAS; BENVENGA, 2015; LEI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 1985; OSTER; PRELLWITS, 1990; YANG *et al.*, 1983) e à sua ação antioxidante (PAPPAS *et al.*, 2008; ROTRUCK *et al.*, 1973). Há muito tem se estudado a relação desse elemento com a glândula tireoide (DUNTAS *et al.*, 2003; DICKSON; TOMLINSON, 1967; GARTNER *et al.*, 2002; OLIVIERI *et al.*, 1995; SCHOMBURG *et al.*, 2006). Contudo, como ocorre com o lítio, a maior parte desses estudos foi realizada em humanos ou outros mamíferos. Os estudos realizados com anfíbios que envolveram o selênio estudaram a transferência deste elemento por via vertical e sua toxicidade quando associado a metais (LANCTOT *et al.*, 2017; SCIENCES; ROAD, 2003).

Dessa forma, considerando-se os efeitos descritos em mamíferos relatando o tropismo desses elementos ao tecido tireóideo, o presente trabalho baseou-se na hipótese de que o lítio exerceria uma regulação negativa sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT), com efeitos colaterais sobre o metabolismo energético e que, por sua vez, a exposição ao selênio reverteria tais efeitos induzidos pela exposição ao metal alcalino em questão. Efeitos estes que refletiriam na metamorfose dos girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), uma vez que este evento é dependente da atividade da glândula tireoide e se relaciona fortemente com o metabolismo de macromoléculas energéticas (carboidratos, lipídeos e proteínas).

Uma vez que a legislação vigente promulgada pela agência de proteção ambiental brasileira considera seguras as concentrações de lítio ( $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e selênio ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para águas destinadas à proteção das vidas aquáticas (dentre outras características socialmente importantes); procuramos por meio deste trabalho pôr à prova a segurança desse cenário aceito como ideal pela agência de proteção ambiental, bem como produzir dados relativos aos efeitos ecotoxicológicos exercidos por contaminantes emergentes sobre a herpetofauna.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos que a exposição ao lítio e ao selênio - isolados e associados - em concentrações consideradas ambientalmente seguras pelo CONAMA, podem exercer sobre o processo metamórfico de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*. Para tanto, pretendeu-se especificamente:

- a. Determinar a taxa de mortalidade;
- b. Analisar um biomarcador comportamental: nível de atividade;
- c. Analisar biomarcadores morfométricos: distância entre o focinho e a cloaca e o comprimento do membro posterior;
- d. Analisar o desenvolvimento por meio de estadiamento de Gosner (1960) e a massa úmida dos animais;
- e. Avaliar biomarcadores bioquímicos relacionados ao metabolismo energético por meio da quantificação de carboidratos, lipídeos e proteínas no tecido muscular caudal e hepático, bem como a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no tecido muscular caudal;
- f. Avaliar os efeitos da exposição sobre a glândula tireoide, por meio de análises histológicas;
- g. Avaliar a toxicidade da exposição através de análises histológicas da pele.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 ANFÍBIOS

Os anfíbios são componentes notáveis da fauna vertebrada mundial, pois apresentam considerável diversidade de comportamento, fisiologia e estratégias de sobrevivência (DENVER *et al.*, 2002). Esse grupo tem mais de 7.000 espécies descritas (AMPHIBIAWEB.ORG; acesso em 12 de fevereiro de 2019). São animais que podem ser encontrados em virtualmente todos os habitats terrestres e aquáticos (DENVER *et al.*, 2002; FROST *et al.*, 2006), à exceção da Antártica, habitando desde trópicos até o Círculo Ártico, em diferentes altitudes e inclusive nos desertos (LINDER *et al.*, 2010, p. 105; VENTURINO *et al.*, 2003). A classe Amphibia (Figura 1) engloba os animais conhecidos como Gymnophiona ou Apoda (cecílias ou cobras-cegas), Caudata ou Urodela (salamandras e tritões) e Anura (sapos, rãs e pererecas) (FROST *et al.*, 2006; HADDAD, 2008, p. 287).

**Figura 1** – Diferentes tipos de anfíbios. (A) um exemplar de cobra cega (*Siphonops annulatus*), imagem gentilmente cedida por Andreas Schlueter. (B) uma salamandra (*Salamandra salamandra*), imagem gentilmente cedida por Miroslav Samardzic. (C) uma espécie de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) imagem gentilmente cedida por Raul César Alves.



**Fonte:** [www.amphibiaweb.com](http://www.amphibiaweb.com) (*S. annulatus* e *S. salamandra*), acervo pessoal (*L. catesbeianus*).

Um aspecto quase universal nesses animais é a metamorfose (NORRIS, 1983); contudo, nem todos os anfíbios metamorfoseiam em ambiente aquático, tendo-se em vista que algumas salamandras e alguns anuros depositam seus ovos na terra e os embriões se desenvolvem diretamente no ambiente terrestre (LINDER *et al.*, 2010, p. 105). Os estímulos para que se desencadeie o processo metamórfico são diversos, fatores como temperatura, atividade de predadores e estabilidade do meio em que vivem podem ser deflagradores ou postergadores de tal processo (DENVER *et al.*, 2002).

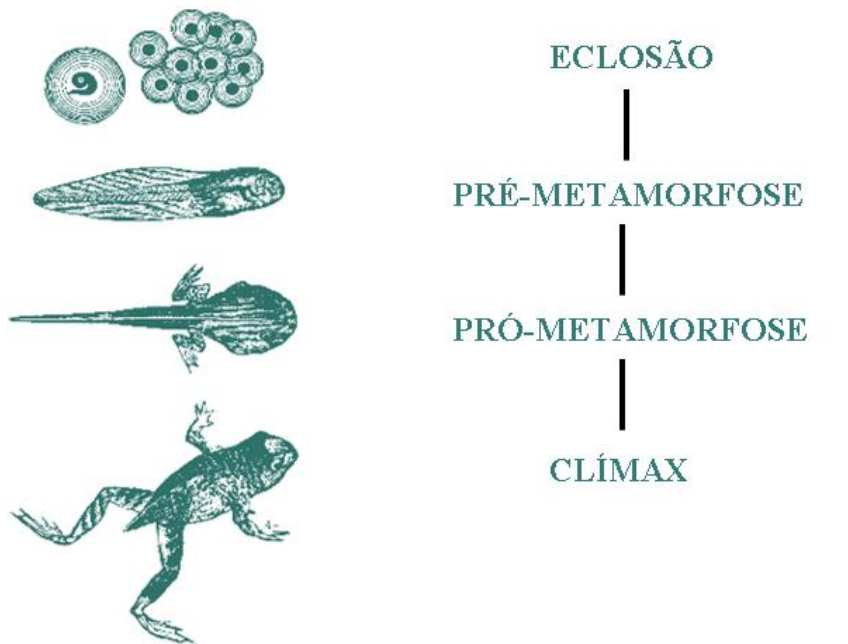
O evento metamórfico consiste em uma série de transformações marcantes no âmbito morfológico, comportamental e ecológico do animal (NORRIS, 1983). Genes expressos durante a fase larval são silenciados à medida que genes para a vida adulta são ativados, de forma que os adultos possuem características não encontradas nos girinos (NORRIS, 1983). O estágio inicial da metamorfose é caracterizado pela replicação do DNA induzido pelos hormônios tireóideos (HT) no tecido cerebral, nos membros e medula espinhal, enquanto os estágios tardios deste evento são caracterizados pelo remodelamento do intestino, reabsorção das brânquias (BROWN, 2005), formação de novas glândulas na pele e no estômago; remodelamento do esqueleto, especialmente do crânio, resultando em um indivíduo recém-metamorfoseado que representa uma miniatura do que será o animal adulto (BROWN; CAI, 2007; FURLOW; NEFF, 2006; YAOITA; BROWN, 1990). Dentre outras mudanças observadas durante esse processo estão o espessamento da pele para diminuir a perda de água por evaporação e para reduzir danos mecânicos potenciais do ambiente terrestre (LINDER *et al.*, 2010, p. 105). Para tanto, se faz necessária a ação coordenada entre diversos fatores ambientais, teciduais e endocrinológicos que irão adaptar o animal com modo de vida aquático à terrestrialidade (DEGITZ *et al.*, 2005; DENVER *et al.*, 2002; HAMMOND *et al.*, 2015).

A metamorfose é classificada em três fases distintas (Figura 2). A saber: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax metamórfico (JAYATILAKA, 1978; MIYATA; KEIKO, 2012; ZHANG *et al.*, 2006). A fase pré-metamórfica é o período de preparação para o início das mudanças estruturais, ou seja, entre a eclosão até o início das mudanças adaptativas da larva. A fase pró-metamórfica é o período que compreende o aparecimento dos membros posteriores e o dos membros anteriores (JAYATILAKA, 1978; MIYATA; KEIKO, 2012). Então ocorre o clímax, caracterizado por mudanças na cavidade bucal (ETKIN, 1963), remodelamento intestinal (CAI; BROWN, 2004; ETKIN, 1963), a reabsorção da cauda e das brânquias (ETKIN, 1963; MIYATA; KEIKO, 2012), além do desenvolvimento dos pulmões (JAYATILAKA, 1978; MIYATA; KEIKO, 2012). Nesse momento, os níveis séricos dos HTs



atingem seu pico, já que ainda não há um mecanismo de retroalimentação negativa plenamente desenvolvido (BROWN, 2005; ETKIN, 1963; YAOITA; BROWN, 1990). Após o clímax, os níveis de HT caem a um nível indetectável (BROWN, 2005), similar àquele observado antes da pró-metamorfose (ETKIN, 1963). Segundo Regards *et al.*, (1978) não é possível detectar triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) no sangue de *Lithobates catesbeianus* na fase adulta.

**Figura 2** – As diferentes fases do processo metamórfico de anfíbios anuros.



**Fonte:** Vetores obtidos em: <https://pt.vecteezy.com/vetor-gratis/tadpoles>. Adaptado pelo autor por meio do software Adobe Illustrator® versão 2015. Adobe System Corporation.

Após todos os processos de adaptação à nova fase da vida, esses animais se encontram na fase pós-metamórfica, fase esta em que são predadores por excelência, capturando presas tanto no ambiente aquático quanto no terrestre. Por outro lado, também servem como alimento para uma grande variedade de animais, como répteis, aves, mamíferos e até mesmo outros anfíbios (HADDAD, 2008), o que ilustra a importância dos anfíbios para o equilíbrio do ecossistema. Contudo, esse equilíbrio sofre negativamente com as ações deletérias resultantes de ações antrópicas sobre os compartimentos ambientais, e a ciência que se encarrega de estudar esses efeitos em todos os níveis de organização biológica é a ecotoxicologia, como veremos a seguir.

### 3.2. ECOTOXICOLOGIA

O ecossistema é continuamente sujeito à contaminação por poluentes liberados pelas zonas urbanas e industriais. Desde o século XX, toneladas desses poluentes têm sido produzidos e liberados nos compartimentos ambientais (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Esse cenário de contaminação contínua demandou o desenvolvimento de uma ciência que estudasse os efeitos que esses compostos podem exercer sobre as complexas interações no ambiente; dessa forma surge a ecotoxicologia que, segundo Truhaut (1977), é o ramo da toxicologia que se dedica a estudar os efeitos tóxicos causados por substâncias naturais ou sintéticas aos constituintes do ecossistema: animais, vegetais e microrganismos, em um contexto integral. A etimologia da palavra provém do grego pela junção do termo *eco* (casa, habitat, meio ambiente), *toxicon* (veneno) e *logos* (ciência) (CHASIN; PEDROSO, 2003, p. 9; FÉRARD, 2013, p. 379). A pioneira nos estudos de poluentes sobre os constituintes de um ecossistema foi Rachel Carson, que escreveu o livro “A Primavera Silenciosa” fruto dos seus estudos sobre os efeitos do agroquímico DDT (diclorodifeniltricloroetano) sobre as aves, publicado em setembro de 1962 (WERNER; HITZFELD, 2012). Vale dizer aqui que o DDT é um organoclorado utilizado como inseticida, cujos metabólitos podem ter um tempo de meia vida de 57,5 anos (BRUCKER-DAVIS, 1998). Dessa forma, mesmo que ele tenha sido banido em alguns países, pode ainda persistir no ambiente devido ao seu longo tempo de meia vida (BOAS *et al.*, 2012).

Contudo, a poluição ambiental não se limita às substâncias agroquímicas como organoclorados, organofosforados e piretróides (AKHTAR *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 2007). Outros contaminantes como plásticos, produtos de combustão (STEINMAUS *et al.*, 2013), surfactantes, metais, fármacos e produtos de uso pessoal também são despejados no ambiente (GAGNÉ *et al.*, 2006), onde podem exercer efeitos nocivos. Dentro do contexto ecotoxicológico, esses contaminantes são denominados xenobióticos, palavra proveniente do grego *xenos* (estranho) + *biós* (vida), que carrega o significado de substâncias estranhas aos organismos (GREÑ, 2012; PETTERSON *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que a presença de xenobióticos no ambiente, por si só, não garante que sejam deflagrados mecanismos deletérios sobre os organismos não-alvos (VAN DER OOST, *et al.*, 2003). Isso porque a toxicidade de uma substância está relacionada com suas características físicas e químicas, condições ambientais, bem como a duração e a frequência da exposição, as vias de introdução, sensibilidade dos indivíduos, além do estágio de desenvolvimento dos organismos expostos (CHASIN; PEDROSO, 2003, p. 20; SCIENCES;

ROAD, 2003). Outro fator que devemos considerar é a interação entre diferentes compostos com atividade tóxica presentes nos ambientes naturais. Esses xenobióticos podem existir na forma de complexas misturas envolvendo várias moléculas em diversas concentrações (NIKINMAA, 2014, p. 160) e o resultado que esta combinação pode exercer sobre os seres vivos também é complexa e envolve o agonismo (sinergismo e potenciação), antagonismo ou adição; a depender das interações entre os toxicantes e o organismo exposto (NIKINMAA, 2014, p. 160; MOZETO; ZAGATTO, 2006).

Nas situações em que ocorre a sinergia, o efeito de um determinado toxicante é aumentado devido à presença de um segundo toxicante ( $1 + 1 = 5$ ) (MOZETO; ZAGATTO, 2006). Dentro deste contexto sinérgico, também pode ocorrer a potenciação, que é a interação que ocorre quando um contaminante tem efeito tóxico somente na presença de outro ( $0 + 1 = 4$ ), podendo envolver a redução dos processos de eliminação ou a formação de metabólitos tóxicos devido à interação entre as espécies toxicantes (NIKINMAA, 2014, p. 160); assim, os efeitos combinados dos contaminantes são maiores do que quando administrados isoladamente. A toxicidade tardia também pode ocorrer sob esse aspecto: imaginemos um cenário em que determinada substância provoque o aumento da atividade do animal e, com isso, mobilize as suas reservas lipídicas para a corrente sanguínea, tornando biodisponível um segundo toxicante que estava armazenado e, assim, desencadeando os efeitos deletérios deste composto que estava inerte no tecido adiposo (NIKINMAA, 2014, p. 160). O antagonismo é o oposto do agonismo: as substâncias irão interagir de forma a reduzir os efeitos tóxicos umas das outras ( $2 + 3 = 4$ ) (NIKINMAA, 2014, p. 160; MOZETO; ZAGATTO, 2006), podendo ocorrer devido à competição pela ligação ao mesmo sítio de ação ou pela indução dos processos de biotransformação e excreção do outro toxicante. Outra possibilidade é o efeito aditivo, quando o resultado da exposição é o mesmo que a soma dos efeitos isolados ( $1 + 1 = 2$ ) (NIKINMAA, 2014, p. 160; MOZETO; ZAGATTO, 2006). Geralmente isso ocorre quando os toxicantes possuem o mesmo sítio de ação. Bifenilas policloradas (PCB), furanos e dioxinas possuem esse perfil de comportamento, nesse cenário o efeito combinado é igual à soma dos efeitos isolados. Essas interações devem ser consideradas quando analisamos resultados ecotoxicológicos, uma vez que em determinadas condições a interação de compostos químicos pode apresentar padrões de interações distintos (MOZETO; ZAGATTO, 2006).

A grande diversidade filogenética presente no ecossistema, a complexidade das interações entre fatores bióticos e abióticos, somados ao grande número de fatores físicos, químicos e biológicos que podem contaminar o ecossistema tornam a ecotoxicologia uma

ciência complexa (FÉRARD, 2013, p. 379). Isso porque, além de xenobióticos, outros fatores não químicos podem agir como estressores ambientais adicionais, tais como o aumento da incidência da radiação UV (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2016), doenças induzidas por patógenos (SALLA *et al.*, 2015), flutuações de temperatura (SANTOS *et al.*, 2014), hipóxia, falta de alimento devido à distúrbios no habitat, urbanização mal planejada, desmatamento, entre outros (HOOK *et al.*, 2014; MOORE *et al.*, 2004). Todos esses fatores danosos ao ambiente podem resultar em respostas adaptativas, com possível ruptura das complexas interações funcionais entre os seres que integram um ecossistema (MOORE *et al.*, 2004).

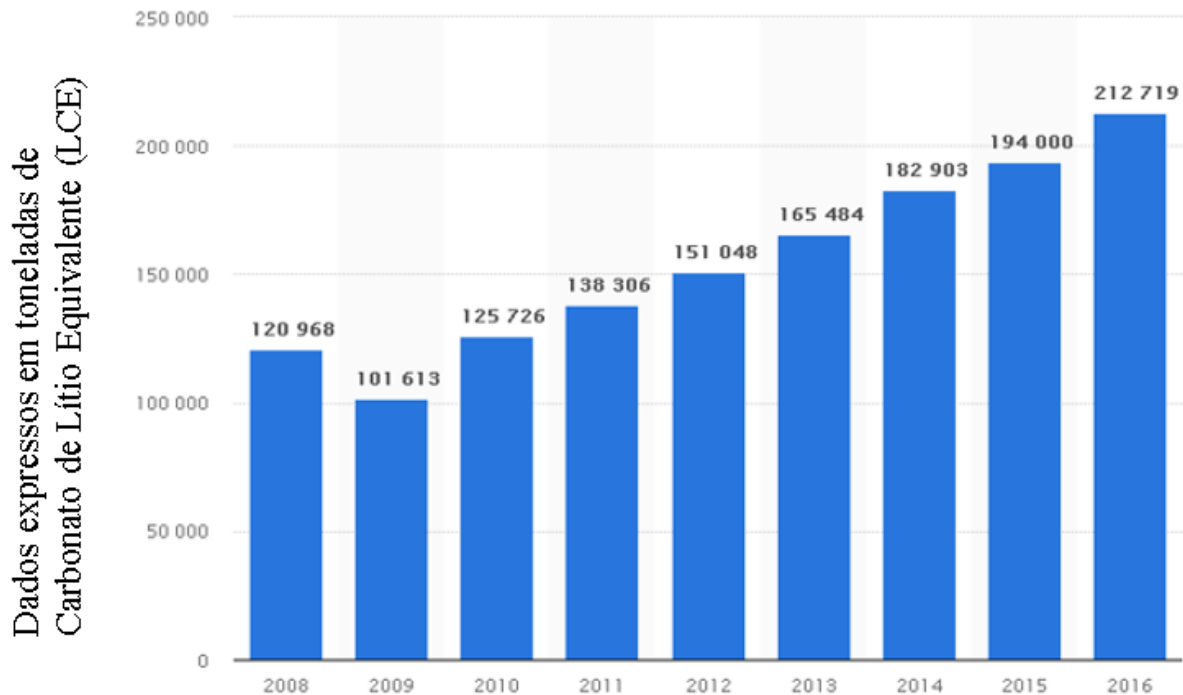
### 3.3 LÍTIO

O lítio (Li) é o mais leve dos metais, muito resistente ao calor (MOHR *et al.*, 2012), sendo um bom condutor térmico e elétrico (GRUBER *et al.*, 2011). Devido à estas características é utilizado em diversas atividades industriais, como na produção de vidro e cerâmica, graxas lubrificantes, tratamento de ar, produção de alumínio, baterias recarregáveis (USGS, 2016), produção de medicamentos, ligas especiais (GRUBER *et al.*, 2011), na indústria espacial (LIU *et al.*, 2012, p.325), entre outros. Nesse contexto, as baterias recarregáveis representam uma importante parcela da demanda por esse metal, ainda mais com a inserção no mercado de carros elétricos e híbridos (USGS, 2016). No âmbito terapêutico o carbonato e o citrato de lítio são amplamente utilizados para o tratamento de manias e dos transtornos bipolares (BRUNTON *et al.*, 2010, p. 299; LIU *et al.*, 2012, p. 325; MELTZER, 2014, p. 503). Essas condições psiquiátricas acometem de 1 a 3 % da população adulta (MELTZER, 2014, p. 501). Também é utilizado como coadjuvante aos antidepressivos no tratamento da depressão recorrente (BRUNTON *et al.*, 2010, p. 299). Após ser administrado oralmente, é absorvido completamente dentro de 6 a 8 horas e distribuído na água corporal, atingindo maiores concentrações nos rins, tireoide e nos ossos (LIU *et al.*, 2012, p. 325), não sofre metabolismo, sendo excretado quase que em sua totalidade pela urina (LIU *et al.*, 2012, p. 325; MELTZER, 2014, 505).

Essa ampla variedade de aplicações, torna elevada a presença desse metal em vários tipos de descarte. No período pós-guerra, de 1955 a 1980, a produção média desse metal era de 5 kt Li/ano; após os anos 80 a produção veio crescendo 51% ao ano, alcançando 25 kt Li/ano em 2008. No período entre 2008 e 2016 o aumento no consumo total global de lítio foi ainda

maior, tendo uma variação positiva de 75,85% no período (WWW.STATISTA.COM; acesso em 30 de outubro de 2018), como mostra a Figura 3.

**Figura 3** – Consumo global de lítio entre os anos de 2008 a 2016.



**Fonte:** <https://www.statista.com/statistics/451999/global-total-consumption-of-lithium/>.

Esse elemento pertence à família 1A da Tabela periódica; portanto, um metal alcalino, de forma que compartilha algumas semelhanças com outros cátions monovalentes como o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$ , situados na mesma família periódica (BRUNTON *et al.*, 2010, p. 299; KJØLHOLT, 2003). É altamente solúvel em água e por isso pode ser encontrado em águas residuais e em lixiviações de aterros sanitários (KJØLHOLT, 2003). Em geral, quanto maior for a polaridade de uma substância, mais facilmente ela será distribuída no meio hidrológico. Dentre os metais, os sais inorgânicos formados por metais alcalinos e alcalino terrosos apresentam maior hidrossolubilidade, diferente dos sais metálicos, como chumbo, mercúrio e alumínio, que tendem a formar ligações covalentes, apresentando baixa hidrossolubilidade (PEDROZO; KUNO, 2008, p. 199). Dessa forma, a contaminação da água subterrânea pelo lítio proveniente do descarte de resíduos produzidos pelo ser humano pode ser um fator de risco para o ambiente aquático (LIU *et al.*, 2012, p. 325).

Esse elemento é o mais tóxico para anfíbios dentre todos os metais alcalinos e alcalinos terrosos (BINET, 1892 *apud* JOHNSON 1984), podendo ser quantificado naturalmente na ordem dos microgramas por litro em ambientes aquáticos (KJØLHOLT, 2003). Contudo, a legislação brasileira considera segura uma concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de lítio para águas de classe 1 e 2 (BRASIL, 2005), ou seja, para a água destinada ao consumo humano, preservação do equilíbrio natural, **proteção de comunidades aquáticas**, atividades de recreação (natação, mergulho etc.). Contudo, mesmo quando os contaminantes e outras substâncias estão em concentrações permitidas pela legislação vigente, a ocorrência da biomagnificação pode resultar em degradação das relações biológicas dentro de um ecossistema (BUSS *et al.*, 2003).

### 3.4 SELÊNIO

O selênio (Se) possui massa atômica de 78,96, é um elemento da família dos calcogênios, estando assim relacionado com o enxofre em muitas de suas propriedades (DICKSON; TOMLINSON, 1967; LIDE, 2005; STADTMAN, 1980). Foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius (LIDE, 2005; WISNIAK, 2000). Esse elemento também é utilizado em diversas atividades industriais, como na produção de vidro, plásticos, cerâmicas (LIDE, 2005; USGS, 2018), bem como está presente na composição de diversos produtos, como células de energia solar e componentes eletrônicos (LIDE, 2005). Na indústria farmacêutica, esse mineral é utilizado em medicamentos para tratamento antifúngico, bem como em xampus anticaspa e também como suplemento nutricional (YOUNG *et al.*, 2010, p. 16; USGS, 2018). Todos esses produtos e atividades representam fontes potenciais de contaminação ambiental uma vez consumidos e descartados. Além disso, a queima do carvão, bem como o refino e a combustão do petróleo, atividades de mineração, além da agricultura e da pecuária também são possíveis meios de entrada desse elemento na natureza (USGS, 2018; YANG *et al.*, 1983; YOUNG *et al.*, 2010, p. 14) (Figura 4).

**Figura 4** – Principais fontes de poluição aquática de selênio.



**Fonte:** ADAPTADO: Maher *et al.*, (2010, p.47). Os símbolos foram cortesia da rede de integração e aplicação. Centro de Ciências Ambientais da Universidade de Maryland ([ian.umces.edu/symbols/](http://ian.umces.edu/symbols/)).

A disponibilidade de selênio provindo de fontes naturais também pode ser considerada importante e consiste na mobilização lenta a partir das rochas ou como resultado da atividade vulcânica (YOUNG, 2010, p. 7). No ambiente aquático, o selênio oriundo tanto da atividade antrópica quanto da natureza está presente nas formas selenito ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ) e selenato ( $\text{SeO}_4^{-2}$ ), sendo o selenito a forma mais hidrossolúvel (OHLENDORF, 2002, p. 470). Essas formas ficam dispostas na coluna d'água e desempenham um papel importante nos efeitos desse calcogênio sobre o ecossistema (YOUNG *et al.*, 2010, p. 16). Neste meio aquoso, as bactérias, algas e plantas convertem as formas inorgânicas em formas orgânicas, como o selênio metionina, que é mais facilmente incorporado ao organismo após a alimentação (YOUNG *et al.*, 2010, p. 16). A fina camada particulada composta de matéria orgânica pode conter quantidades variadas de selênio orgânico e inorgânico. O consumo dessa matéria por consumidores primários, principalmente invertebrados, é a primeira porta de entrada desse minério na cadeia alimentar aquática; outra forma de assimilação é através da transferência vertical (YOUNG *et al.*, 2010, p. 16).

A toxicidade do selênio sobre plantas e animais é conhecida desde os anos 1930 (STADTMAN, 1974). Entre 1961 e 1964 a selenose (intoxicação por selênio) causou uma mortalidade de aproximadamente 50% em uma população de 248 pessoas em uma província chinesa (YANG *et al.*, 1983). No final da década de 70 houve um declínio marcante da população de espécies de peixes no Lago Belews, Carolina do Norte - E.U.A, resultado de altos níveis de selênio provindos do despejo de resíduos de termelétricas. Logo em seguida, em 1982,

na Reserva Kesterson, Califórnia - E.U.A, populações de peixes e de aves foram afetadas pelos altos níveis desse calcogênio fruto da drenagem provinda da agricultura, causando impactos severos no ecossistema local (YOUNG *et al.*, 2010, p. 7). O selênio é mais reativo que o enxofre, assim sendo, o organismo pode substituir um pelo outro nos casos em que o selênio está disponível em doses superiores à ordem dos microgramas, já que ambos calcogênios compartilham algumas semelhanças. Isso pode levar a problemas metabólicos que possivelmente resultariam em morte (STADMAN, 1974).

Em relação aos anfíbios, sabemos que esses animais são sensíveis à presença de selênio em todas as fases da vida (OHLENDORF, 2002, p. 470). Segundo Sciences e Road (2003), os anfíbios expostos ao selênio durante a vida larval podem acumular este elemento até a vida adulta, mobilizando assim o selênio presente na água para ambientes terrestres, bem como possibilitando a transferência deste elemento para outros níveis da cadeia alimentar. Considerando que mesmo os anfíbios podem se alimentar de outros anfíbios, essa biomagnificação se torna ainda mais considerável (JANZ *et al.*, 2010, p. 22). O resultado das interações entre os organismos vivos e os ambientes impactados podem ser avaliados por meio de ferramentas ecotoxicológicas, denominadas biomarcadores.

### 3.5 BIOMARCADORES

Os biomarcadores constituem parte importante do escopo ecotoxicológico por serem úteis na determinação e mensuração dos efeitos dos xenobióticos sobre organismos não-alvos (BLAISE; GAGNÉ, 2009). Assim, os biomarcadores são essenciais para estabelecer uma correlação entre a presença dos contaminantes no ambiente e sua ação no organismo em concentrações subletais (NRC, 1987; VENTURINO *et al.*, 2003). São imprescindíveis como indicadores da exposição a um ou mais estressores, pois refletem o nível de interação entre um sistema biológico e um agente químico, físico ou biológico (HACON, 2003, p. 265).

Há várias definições para o termo biomarcador, todas elas com o mesmo âmago, de forma que, para Henderson *et al.* (1989) um biomarcador é um sinal gerado por alguma mudança em um sistema biológico que pode ser causada por uma exposição a algum composto. Benford *et al.* (2000) definem biomarcador como um parâmetro que pode ser mensurado em uma amostra biológica, fornecendo informações sobre a exposição ou o efeito atual/potencial de um xenobiótico sobre um indivíduo ou população. Segundo Ossana *et al.* (2013), um



biomarcador é definido como qualquer resposta de um organismo-teste após exposição a algum fator ambiental, fornecendo parâmetros confiáveis indicativos da degradação ambiental.

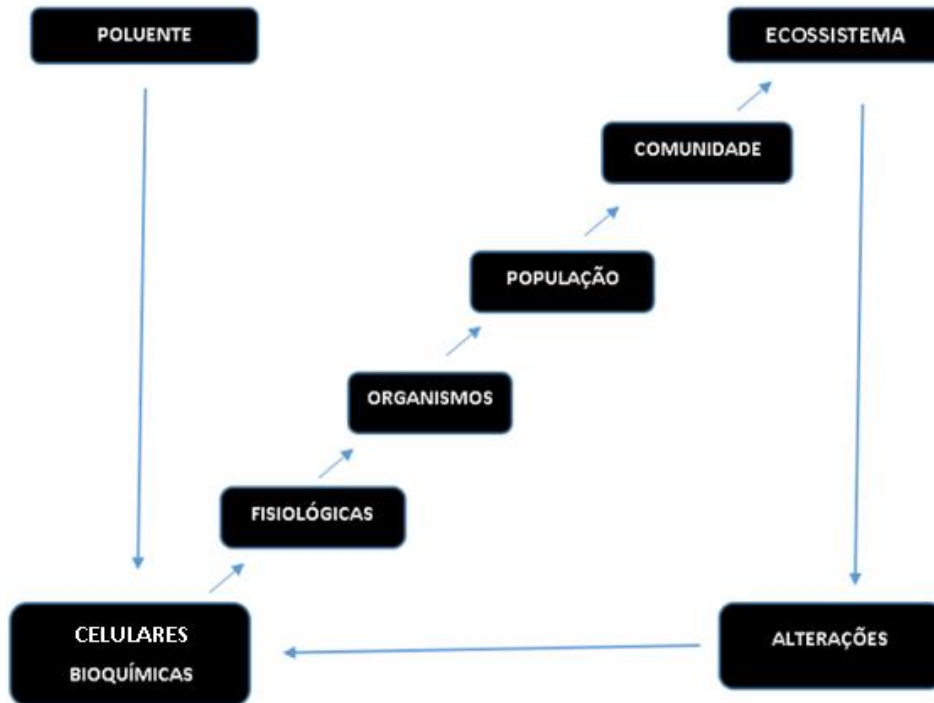
O biomarcador ideal deve responder quali-quantitativamente de acordo com a extensão da exposição. Além disso, deve ter responsividade específica a um evento (NRC, 1987). É também imprescindível que o biomarcador possa determinar uma relação dose-resposta, especialmente quando se analisa o efeito de um xenobiótico em concentrações muito baixas (NRC, 1987), ilustrando o efeito da exposição crônica de forma a relacioná-la com a progressão de uma lesão tóxica (BENFORD *et al.*, 2000). Outro biomarcador importante é aquele que avalia a bioacumulação de toxicantes e sua relação com a toxicidade (HOOK *et al.*, 2014).

Biomarcadores muito utilizados para a avaliação dos efeitos de estressores ambientais sobre anfíbios focam em aspectos como crescimento e estágio de desenvolvimento metamórfico, alterações comportamentais, alterações na expressão gênica (LINDER *et al.*, 2010, p. 105), pigmentação corpórea e/ou visceral, disfunções endócrinas etc. (VENTURINO *et al.*, 2003). Podemos dizer que biomarcadores utilizados em vertebrados são muito semelhantes; contudo, em contraste com a extensa quantidade de informações que se tem disponível para os parâmetros ecotoxicológicos em peixes, mais escassas são as informações referentes à herpetofauna (KLOAS; LINDER *et al.*, 2010, p. 105; LUTZ, 2006), a despeito do drástico declínio pelo qual os anfíbios vêm passando, especialmente ao longo dos últimos 30 anos. Vários tipos de biomarcadores são empregados em ecotoxicologia aquática, seu valor enquanto ferramenta é inquestionável e seu uso é globalizado (BLAISE *et al.*, 2016). Esses biomarcadores fornecem meios efetivos para prevenção, vigilância e alerta, a fim de avaliar a qualidade da água (BLAISE; GAGNÉ, 2009).

O profundo conhecimento de elementos da toxicologia como a toxicodinâmica e a toxicocinética é essencial quando se pretende relacionar os dados e/ou concentrações/doses dos testes ecotoxicológicos, de forma que o entendimento dos mecanismos de ação que vão do nível molecular ao ecossistema como um todo é fundamental. Na maioria das vezes, alterações moleculares nos dão uma noção prematura de possíveis alterações morfológicas, bem como do próprio mecanismo de ação dos xenobióticos (BENFORD *et al.*, 2000; FÉRARD, 2013, p. 379; HELBING, 2012). Dessa forma, quanto mais se souber sobre o mecanismo de ação do xenobiótico e sobre a fisiopatologia causada por ele, maior a nossa capacidade de escolher biomarcadores adequados (HENDERSON *et al.*, 1989). Por sua vez, a toxicocinética é vital para que haja a racional escolha do metabólito a ser considerado, tecido, amostragem e, assim, da

relevância dos resultados (BENFORD *et al.*, 2000). A Figura 5 mostra biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica, sendo os celulares e bioquímicos os que se expressam mais precocemente até os de expressão tardia como alterações em nível de comunidade e ecossistema.

**Figura 5** – Níveis de organização biológica e as respostas em relação a exposição a poluentes.



**Fonte:** Adaptado de Magalhães; Ferrão Filho (2008).

Os biomarcadores podem ser classificados pela sua capacidade de refletir a **exposição** dos organismos a estressores, ou **efeitos** adversos provindos da ação do xenobiótico; alguns deles podem também indicar a **susceptibilidade** às condições adversas desencadeadas por contaminantes; contudo, este último depende de um detalhado levantamento de informações acerca da genética de tais organismos (HACON, 2003, p.273; HOOK *et al.*, 2014). Assim, os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de exposição, de efeito e de susceptibilidade (HENDERSON *et al.*, 1989; NRC, 1987; SCHULTE; MAZZUCKELLI, 1991).

O uso de biomarcadores tem sido importante para elucidar os efeitos de uma série de contaminantes emergentes como os fármacos e produtos de cuidados pessoais, substâncias

interferentes endócrinas, organismos geneticamente modificados e nanomateriais (BLAISE; GAGNÉ, 2009). É importante enfatizar que um único biomarcador dificilmente fornecerá uma informação acerca da saúde do ecossistema, sendo necessária a integração de múltiplos biomarcadores com informações químicas e/ou toxicológicas, conferindo solidez aos dados, além de minimizar quaisquer interferências (HOOK *et al.*, 2014; OSSANA *et al.*, 2013). Dessa forma, biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade são necessários para correlacionar a presença dos contaminantes no ambiente com a sua ação no organismo, mesmo que em concentrações subletais (VENTURINO *et al.*, 2003).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 O ANIMAL MODELO

A rã-touro Americana antigamente era conhecida como *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802), e posteriormente foi reclassificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST *et al.*, 2006). É originária da América do Norte, sendo conhecida por esse nome porque o coaxar dos machos para o acasalamento parece o mugido de um touro (VIEIRA, 1993, p. 17). A introdução no Brasil ocorreu em 1935 no Rio de Janeiro trazidas do Canadá por Tom Cyriril Harrison (VIEIRA, 1993, p. 17), com a intenção de serem utilizadas na produção de carne para consumo humano. No ano de 1939 a rã-touro foi levada para o Estado de São Paulo pela Secretaria de Agricultura para o município de Pindamonhangaba (LIMA; AGOSTINHO, 1992, p. 15; VIEIRA, 1993, p. 17). Contudo, foi apenas na década de 70 que a rãicultura despertou grande interesse devido a sua rentabilidade. Na década de 80 já havia 2.000 ranários no país. Porém, a falta de gestão e estrutura resultou no fechamento de quase todos esses estabelecimentos nos anos subsequentes (LIMA; AGOSTINHO, 1992, p. 15; VIEIRA, 1993, p. 17). Dados de 2010 levantados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) contabilizaram 145 ranários distribuídos em 60 municípios em SP, RJ, MG, ES (RODRIGUES *et al.*, 2010). O Brasil é o segundo maior criador de rãs no mundo: um levantamento do IBGE de 2016 descreve a produção de 160 toneladas de carne de rã ao ano (EMBRAPA, 2015), ressaltando a importância econômica desta espécie para o nosso país.

Quando adultos, esses animais possuem cabeça achatada, mais larga do que comprida. A região das pálpebras apresenta rugas e podem ser irregulares. A pele do dorso é lisa com algumas pregas. Apresenta dedos fortes mais ou menos pontiagudos. Nas patas anteriores possuem dedos livres, enquanto nas posteriores possuem membrana interdigital formando nadadeiras. Em relação à coloração, essa espécie é verde oliva ou parda. Sua cabeça é esverdeada e seus membros possuem manchas escuras. Na fase de abate pode chegar a 2,5 kg (VIEIRA, 1993, p. 19) (Figura 6).

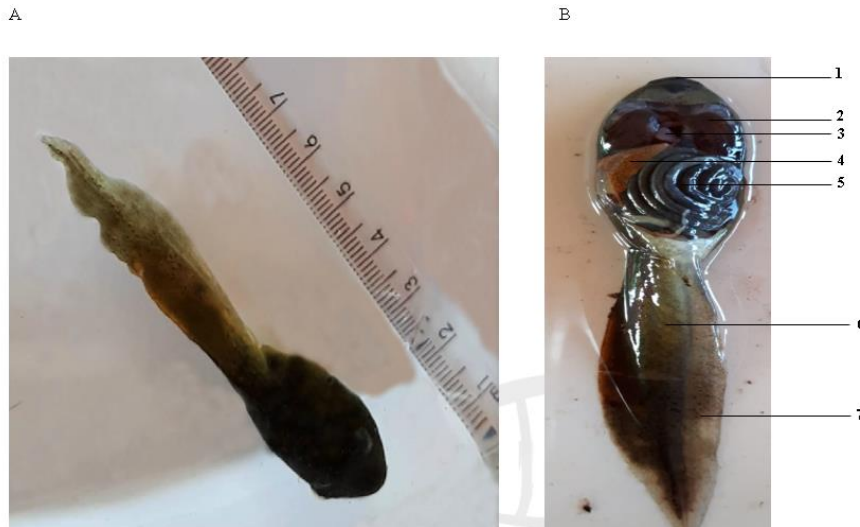
**Figura – 6** Espécime de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) pós-metamórfica. Imagem gentilmente cedida por Raul César Alves.



**Fonte:** Acervo pessoal.

Os girinos desta espécie são de cor verde oliva com manchas escuras sobre o dorso; na região ventral apresentam coloração esbranquiçada ou creme claro. Nessa fase aquática podem atingir até 17 cm de comprimento (VIEIRA, 1993, p. 18). Enquanto girinos, esses animais apresentam a cabeça e o corpo compostos por uma única estrutura, uma cauda muscular sem vértebras, além de nadadeiras ventrais e dorsais desprovidas de suporte ósseo (MCDIARMID; ALTIG, 1999). O intestino é organizado em espiral, o fígado é bem evidente entre as vísceras e o aparato oral queratinizado é adaptado para a ingestão de uma ampla variedade de alimentos (Figura 7) (MCDIARMID; ALTIG, 1999). A dieta na fase larval varia muito, podendo ser comedores de algas, detritívoros, onívoros ou carnívoros (HADDAD, 2008).

**Figura 7** – A. Girino rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner (1960) com sua coloração habitual. B. Organização interna do girino de *L. catesbeianus*. (1) Focinho (2), brânquia (3), coração (4), fígado (5), intestino (6), cauda (7), nadadeira.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.1.1 Uso de *Lithobates catesbeianus* como animal modelo

Apesar dos anfíbios terem representantes da família Gymnophiona e Urodela, os Anura ainda são os mais utilizados em pesquisas científicas, sendo a *L. catesbeianus* uma das espécies mais utilizadas como modelo experimental (BURGGREN; WARBURTON, 2007). Girinos de rãs-touro vêm sendo muito utilizados para avaliar o impacto de xenobióticos encontrados em ecossistemas aquáticos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Dados ecotoxicológicos produzidos utilizando-se de rã-touro como animal modelo.

Espécie	Toxicidade	Estressor	Referências
<i>L. catesbeianus</i>	Hepática/ Renal/ Muscular	Metais (Zn, Cu, Cd)	Carvalho et al., 2017
	Hepática	Metal (Cd)	Nogueira et al., 2017
	Hepática/Genética/Eixo HHT	Metais (Fe, Mn)	Veronez et al., 2016
	Hepática	Herbicida	Oliveira et al., 2016
	Cardíaca	Estrógeno	Salla et al., 2016
	Cardíaca	Pesticida	Costa, et al., 2015
	Cardíaca	Metal tóxico (Cd)	Dal-Medico et al., 2014
	Cardíaca	Pesticida	Costa et al., 2008
Eixo HHT	Herbicida	Helbing et al., 2006	

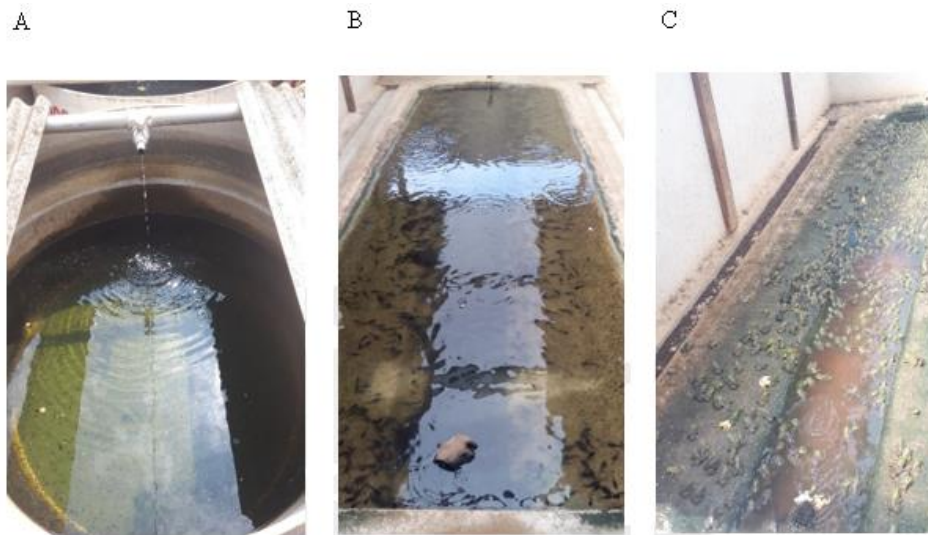
**Fonte:** Elaboração própria.

Nos girinos, características como a fisiologia básica bem conhecida e descrita, as similaridades de diversos termos fisiológicos com mamíferos, capacidade de adaptação a ambientes laboratoriais, bem como a grande diversidade de espécies existentes, conferem aos anfíbios um perfil ótimo para sua escolha como animais-modelo (BURGGREN; WARBURTON, 2007; OSSANA *et al.*, 2013). Esses seres são peculiares e interessantes para uso em ecotoxicologia, uma vez que consistem no único grupo de vertebrados em que a grande maioria dos integrantes apresenta independentemente uma vida aquática enquanto larvas e uma vida aquática/semiaquática ou terrestre enquanto jovens e adultos. Esse fato elenca grande parte dos anfíbios como modelo ideal de estudo para a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos tanto na água quanto na terra (HELBING, 2012). No âmbito do presente trabalho, a utilização dos anfíbios anuros para a avaliação dos efeitos de contaminantes sobre o eixo HHT é essencial, uma vez que estes animais são submetidos aos primeiros efeitos dos hormônios HT em uma fase da vida em que são livres e cultiváveis, diferente dos mamíferos e aves que sofrem os efeitos desses hormônios durante a fase intrauterina. Outro ponto positivo para a escolha desses seres basais é a similaridade que compartilham com aves e mamíferos em relação ao eixo HHT (OECD, 2008), o que torna os dados extrapoláveis a outras classes de vertebrados.

#### **4.1.2 Obtenção dos animais e aclimação**

Os girinos de *L. catesbeianus* utilizados no presente estudo foram adquiridos no ranário Santa Rosa, localizado no município de Santa Bárbara d'Oeste-SP (-22.781257; -47.4073489) (Figura 8). Os critérios para a escolha dos espécimes foram a ausência de padrões que indicassem doenças fúngicas visíveis por desqueratinização na região da boca e por estarem em estágios de desenvolvimento anteriores ao estágio 25 de Gosner (GOSNER, 1960). Os animais foram acondicionados em recipientes plásticos e transportados ao Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba-SP. Uma vez no LaFisC, os animais foram aclimatados durante seis dias em aquários de 60L preenchidos com água previamente decolorada, provida de aeração contínua sob fotoperíodo natural (~12h claro/escuro), temperatura constante ( $22 \pm 1$  °C) (Tabela 2) e alimentados *ad libitum* com ração Sera Goldy® previamente micronizada.

**Figura 8** – Esquema de organização do Ranário Santa Rosa. (A) Baía circular (setor de eclosão). (B e C) Baias de recria (crescimento e terminação).



**Fonte:** Elaboração própria.

**Tabela 2** – Parâmetros físicos e químicos da água durante a aclimação, valores relativos a 1 Litro de água.

Parâmetros da água durante a aclimação	
Temperatura	$22 \pm 1^{\circ}\text{C}$
pH	7
Dureza	3 dH
Amônia	0 ppm
Condutividade	$68 \pm 1,5\mu\text{S.cm}$
O <sub>2</sub> dissolvido	11 ppm

**Fonte:** Elaboração própria.

#### 4.2 Delineamento experimental dos ensaios ecotoxicológicos

A metodologia de exposição foi baseada no modelo inicialmente proposto por Nunes *et al.* (2004) (Figura 9) para peixes, com algumas adaptações que possibilitaram a aplicação desse modelo para a utilização de girinos de rãs-touro. O protocolo utilizado foi o *Amphibian Metamorphosis Assay* (OECD, 2008) para avaliação de substâncias com potencial de interferência no eixo HHT. Os girinos de *L. catesbeianus* foram individualmente medidos e avaliados quanto à presença de anormalidades. Foram incluídos no experimento somente aqueles que apresentaram padrões normais de comportamento durante o período de aclimação



e que estivessem no estágio 25 de desenvolvimento segundo a Tabela de Gosner (1960) (Anexo 1). Todos os animais foram medidos um a um com auxílio de paquímetro digital para a anotação dos dados de comprimento total referente ao início de experimento. Em seguida, foram individualmente alocados em recipientes plásticos de 13,5 x 10 cm (altura x largura), contendo 1 litro de água e forrados lateralmente por películas escuras para minimizar os distúrbios externos. Cada recipiente plástico continha uma entrada individual de ar que forneceu aeração constante durante todo o experimento. Os recipientes plásticos em questão consistiam de garrafas de polietileno de 2 litros, destinadas à embalagem de produtos para consumo humano, virgens, gentilmente fornecidas pela empresa Refriso Bebidas. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo grupo controle (CT; n = 20), grupo exposto ao lítio (LI; n = 20) a uma concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, grupo exposto ao selênio (SE; n = 20) a uma concentração de 0,01 mg.L<sup>-1</sup>, e o grupo exposto às respectivas concentrações de lítio e selênio combinadas (SE+LI; n = 20). Todos os grupos foram igualmente expostos ao iodo na concentração de 1µg.L<sup>-1</sup>, como determina o protocolo da OECD (2008). As concentrações de lítio e de selênio escolhidas correspondem àquelas consideradas ambientalmente seguras pelo CONAMA (BRASIL, 2005) para águas de classe I e II. O experimento teve duração total de 21 dias, sendo que houve uma bateria de coletas de dados no 7º dia e uma segunda bateria no 21º dia (OECD, 2008). Toda a água de cada grupo experimental era trocada a cada 72 horas e os parâmetros físicos e químicos (Tabela 3) foram testados previamente a cada troca tanto nos grupos experimentais quanto na água estoque. As condições de exposição foram as mesmas oferecidas durante a aclimação, de forma a atender os preceitos do protocolo da OECD (2008).

**Tabela 3** – Parâmetros físicos e químicos da água durante a exposição, valores relativos a 1 Litro de água.

Parâmetros da água	
Amônia	0 ppm
Cobre	0 ppm
Cloro	0 ppm
Condutividade	68±1,5µS.cm
Dureza	3 dH
O <sub>2</sub> dissolvido	11 ppm
pH	7
Temperatura	22 ± 1°C

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 9** – Forma da exposição individual de cada grupo experimental. Cada garrafa continha um animal imerso em 1 Litro de água. Baseada na metodologia descrita por Nunes *et al.* (2004).



**Fonte:** Autoria própria.

A coleta do material biológico para as análises dos biomarcadores bioquímicos, bem como o estadiamento segundo a Tabela de Gosner (1960), foi realizada em metade dos animais ( $n = 10$ ) no 7º dia após o início da exposição e novamente no 21º dia (Tabela 4) com a outra metade dos animais. Parâmetros como mortalidade e nível de atividade foram anotados diariamente.

**Tabela 4** – Biomarcadores analisados ao decorrer do experimento.

Biomarcadores	Diariamente	7º dia	21º dia
Mortalidade	*		
Comportamental (NA)	*		
Estágio de Gosner (1960)		*	*
Morfométricos		*	*
Massa úmida		*	*
Bioquímicos		*	*
Histológicos			*

**Fonte:** Elaboração própria.

Nos dias das coletas, todos os animais foram eutanasiados por concussão cefálica segundo as normas de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2001), que consiste na realização de uma fratura crânio-cervical. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 1397170117).

### 4.3 Biomarcadores

Os biomarcadores utilizados para a avaliação dos efeitos da exposição às concentrações isoladas e combinadas de lítio ( $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e de selênio ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), foram escolhidos de forma a gerar parâmetros dos efeitos de tais exposições em níveis morfológicos externos sobre o desenvolvimento dos animais, tais como o estadiamento segundo Gosner (1960), a distância entre o focinho e a cloaca (DFC), o comprimento do membro posterior normalizado (CMPN) e a massa total. As consequências em nível interno foram analisadas por meio da análise histopatológica da glândula tireoide, da quantificação das concentrações dos macronutrientes: proteínas, lipídeos e glicose, bem como da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) muscular caudal. Parâmetros ecotoxicológicos relevantes como mortalidade, nível de atividade e análise da espessura da epiderme dorsal também foram incorporados, de forma a gerar informações adicionais sobre a ecotoxicidade da exposição às concentrações de lítio e selênio consideradas seguras pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente por meio da sua Resolução N° 357, de 17 de março de 2005.

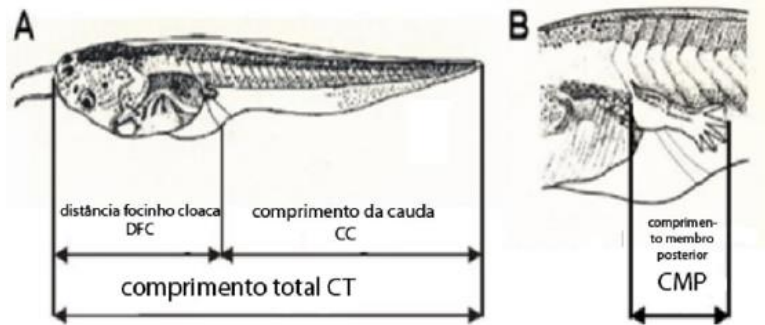
#### 4.3.1 Estadiamento segundo Gosner (1960)

O desenvolvimento dos animais foi categorizado segundo a Tabela de Gosner (1960) (Anexo 1), os estágios são diferenciados de acordo com o desenvolvimento do membro posterior esquerdo dos animais. A relação entre o diâmetro e o comprimento do membro, bem como a separação das falanges foram consideradas. Os dados foram expressos na forma de Estágio G, exemplo: 25 G para os animais que estavam no estágio 25, e assim sucessivamente.

#### 4.3.2 Biomarcadores morfométricos

Os biomarcadores morfométricos como a distância entre o focinho e a cloaca (DFC) e a relação entre o comprimento do membro posterior e a distância entre o focinho e a cloaca (comprimento do membro posterior normalizado – CMPN), foram mensurados com paquímetro digital (MTX - 316119), logo após a retirada dos animais dos contêineres de exposição, de acordo com o proposto pela OECD (2008) no protocolo intitulado “*Amphibian Metamorphosis Assay*”, de forma a permitir a análise do desenvolvimentos de caracteres externos representativos do desenvolvimento metamórfico dos animais expostos (Figura 10). Os resultados foram expressos em milímetros (mm).

**Figura 10** – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração dos biomarcadores: distância focinho cloaca (DFC) e comprimento do membro posterior normalizados (CMPN).



**Fonte:** Adaptado de OECD (2008)

#### 4.3.3 Determinação da massa úmida

Para determinarmos a massa úmida dos animais, assim que eles foram retirados dos recipientes de exposição foram transportados com o auxílio de uma placa de Petri até a balança analítica (Shimadzu, AY 220) e pesados. Os resultados foram expressos em gramas (g).

#### 4.3.4 Determinação do nível de atividade

O nível de atividade dos animais de todos os grupos experimentais foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Fraker & Smith (2004) para girinos de *Lithobates pipiens*. Brevemente, animais ativos corresponderam àqueles que apresentaram constante movimento pelo aquário, movimentos natatórios com a cauda para cima em direção ao fundo do recipiente, enquanto que os girinos inativos foram aqueles que permaneceram estacionários no fundo do aquário ou flutuaram passivamente na coluna d'água. O nível de atividade foi determinado calculando-se a proporção de animais ativos em relação ao número total de animais no aquário, estimado em % para cada grupo experimental.

### 4.3.5 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos analisados no presente estudo se basearam na quantificação da concentração de macromoléculas energéticas como as proteínas, glicose e triglicérides, tanto no músculo quanto no fígado dos girinos. Ademais, foi avaliada a atividade da enzima relacionada ao metabolismo glicídico anaeróbico, nesse caso, a lactato desidrogenase (LDH) do músculo da cauda, que é uma enzima responsável por catalisar a formação reversível de lactato a partir do piruvato com suporte coenzimático da  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido).

Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos *Campus* Sorocaba, a homogeneização foi realizada com Ultra-Turrax IkaT-10 basic, a centrifugação com centrífuga universal 320 R Hettich zentrifugen (alocado no laboratório didático de fisiologia animal e vegetal, da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba) e a leitura das microplacas como leitor de placas Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek (alocado no Laboratório de Bioclima da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba). Tais análises foram resultantes da parceria com o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM), uma vez que a Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho foi coorientadora da presente dissertação, como também do imprescindível suporte teórico e técnico da técnica MSc. Heidi Utsunomiya.

#### 4.3.5.1 Concentração de proteínas hepática e muscular caudal

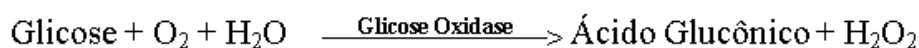
A concentração de proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976). O método baseia-se na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm. As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador Ultra-Turrax IkaT-10 basic em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,2, centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C em centrífuga universal 320 R Hettich zentrifugen. As concentrações foram determinadas através da relação entre as leituras da amostra e da curva referência obtida com albumina sérica bovina em várias

concentrações conhecidas. As absorvâncias foram determinadas em leitor Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek em comprimento de onda de 595 nm.

#### 4.3.5.2 Concentração de glicose hepática e muscular caudal

Para a quantificação da concentração de glicose nos tecidos hepático e muscular da cauda, após a homogeneização com homogeneizador Ultra-Turrax IkaT-10 basic em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,5 e centrifugação a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C em centrífuga universal 320 R Hettich zentrifugen, foi utilizado o Kit Labtest, Liquiform n°. 133. Esse método consiste na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase com a formação de ácido glucônico + peróxido de hidrogênio (Figura 11). O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4 aminoantipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra, que pode ser lida em 505 nm. Esse sistema é comercializado pela empresa Labtest Diagnósticos S.A registrado no Ministério da Saúde sob o número 10009010236 e foi adaptado no presente experimento para a leitura em microplaca de 96 poços. As concentrações de glicose foram determinadas utilizando-se uma curva padrão, feita com um reagente de concentração conhecida fornecida pelo fabricante. As absorvâncias foram determinadas em leitor Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek em comprimento de onda de 505 nm.

**Figura 11** – Reação enzimática para a quantificação de glicose em amostras biológicas.



**Fonte:** Kit Labtest para quantificação de glicose.

#### 4.3.5.3 Concentração de triglicéride hepático e muscular caudal

Para a quantificação de triglicérides nos tecidos hepático e muscular da cauda, após a homogeneização com homogeneizador Ultra-Turrax IkaT-10 basic em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,5, e centrifugação a 12.000 rpm durante 20min a 4° C em centrífuga

universal 320 R Hettich zentrifugen, foi utilizado o Kit Labtest, Liquiform n°. 87. Esse método consiste na liberação de glicerol por catálise do substrato lipídico pela lipoproteína lipase. Esse glicerol liberado no sistema é convertido em glicerol-3-fosfato pela ação da glicerolquinase. O glicerol-3-fosfato é então oxidado pela peroxidase a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, 4-aminoantipirina, 4-clorofenol e peróxido de hidrogênio são acoplados pela peroxidase que leva à produção de quinoneimina. A quinoneimina possui absorvância em 505nm e coloração vermelha proporcional à concentração de triglicérides na amostra (Figura 12). Esse sistema é comercializado pela empresa Labtest Diagnósticos S.A., registrado no Ministério da Saúde sob o número 10009010070 e foi adaptado no presente experimento para a leitura em microplaca de 96 poços. As concentrações de triglicérides foram determinadas utilizando-se uma curva padrão, feita com um reagente de concentração conhecida fornecida pelo fabricante. As absorvâncias foram determinadas em leitor Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek em comprimento de onda de 505 nm.

**Figura 12** – Reação enzimática para a quantificação de triglicérides em amostras biológicas.

Princípio da reação de quantificação de triglicérides:

Triglicérides  $\xrightarrow{\text{Lipoproteína Lipase}}$  Glicerol + ácidos graxos

Glicerol + ATP  $\xrightarrow{\text{Glicerol Quinase} + \text{Mg}^{++}}$  Glicerol-3- fosfato + ADP

Glicerol-3-Fosfato + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{Glicerol-3-Fosfato Oxidase}}$  Dihidroxiacetona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 Aminoantipirina + 4-Clorofenol  $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$  Quinoneimina + 4 H<sub>2</sub>O

**Fonte:** Kit Labtest para quantificação de triglicérides.

#### 4.3.5.4 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

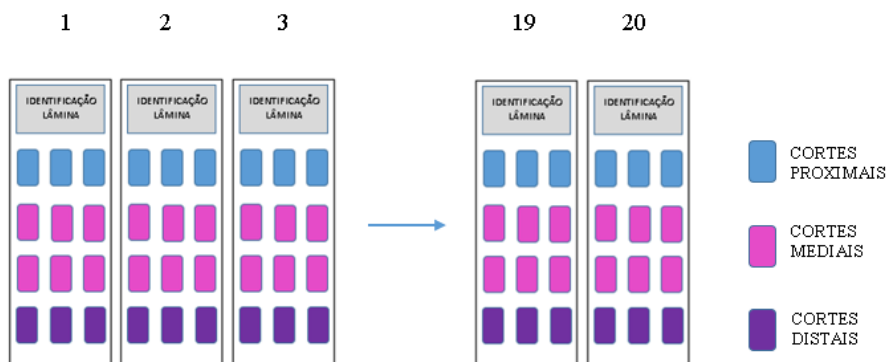
A atividade da LDH foi determinada de acordo com o método descrito por Bergmeyer (1974), com algumas modificações. O tecido muscular da cauda foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) em homogeneizador Ultra-Turrax IkaT-10 basic. O homogenado foi centrifugado a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C em centrífuga universal 320 R Hettich zentrifugen, e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas para a determinação da concentração de proteína. Em seguida o meio de reação foi preparado em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 contendo piruvato de sódio

1mM e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH+H<sup>+</sup>) 0,14mM ao qual foi adicionado alíquotas do homogeneizado. A leitura cinética foi realizada a cada 40 segundos, totalizando oito leituras que forneceram o perfil de decaimento do NADH+H<sup>+</sup> e surgimento do NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado) observado através de leituras em espectrofotômetro de microplaca Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek em comprimento de onda de 340nm. A atividade da enzima foi expressa em Unidade Internacional de Enzima (UI) por mg de proteína total da amostra (UI.mg de proteína) utilizando-se o coeficiente de extinção do NADH = 6,22 cm<sup>-1</sup> μmol<sup>-1</sup>. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade necessária de enzima para oxidar ou reduzir 1 mol de coenzimas por mol de substrato metabolizado por minuto.

#### 4.3.6 Análise histológica da glândula tireoide

As amostras referentes à glândula tireoide foram dissecadas apenas no 21º dia e fixadas em solução não tamponada de paraformaldeído 4%. Após desidratação com concentrações crescentes de soluções alcoólicas (15%; 30%; 50%; 70%; 85%; 90%; 100%), o material obtido foi embebido e embocado em resina plástica de acordo com as orientações do fabricante (Leica; lote R8, Alemanha). O material embocado foi seccionado em micrótomo Leica RM 2255 (alocado no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba), os cortes foram realizados sob a espessura de 3μm. Foram confeccionadas 20 lâminas por animal (n = 3 indivíduos) de cada grupo, sendo que cada lâmina continha em média 12 cortes com todos os planos de corte do material, de forma que cada lâmina possuía a totalidade da glândula (Figura 13).

**Figura 13** - Esquema de organização dos cortes na lâmina.



**Fonte:** Elaboração própria

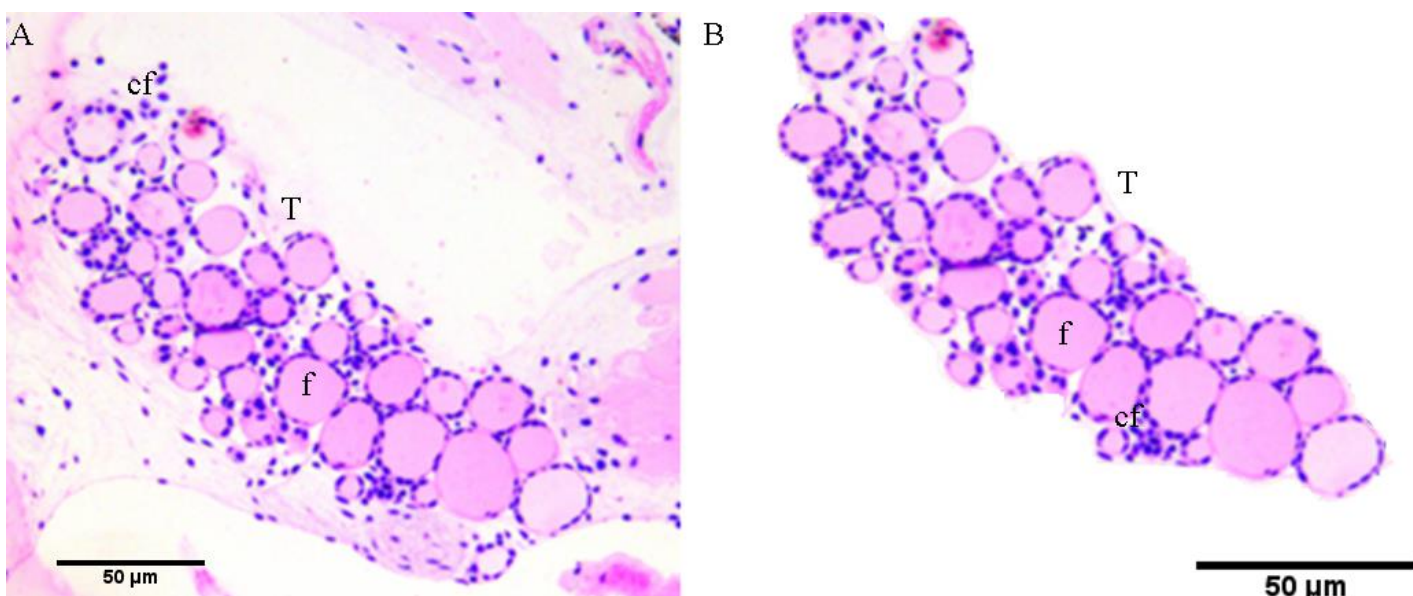


A glândula foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e analisada em microscopia de luz. As imagens foram obtidas com fotomicroscópio Leica DM 4000 B LED, com auxílio do software Leica Application Suite (version 4.5.0; Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA) (alocado no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Carlos, *Campus Sorocaba*).

#### 4.3.6.1 Determinação da área da glândula tireoide

Trinta imagens representativas da secção medial da glândula tireoide de cada grupo foram obtidas através do fotomicroscópio Leica DM 4000 B LED com auxílio do software Leica Application Suite (version 4.5.0; Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Em seguida, estas imagens foram analisadas por meio do software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) de forma a fornecer a análise da área total da glândula em  $\mu\text{m}^2$  (Figura 14).

**Figura 14** – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da área da glândula tireoide. T (tireoide); (cf) células foliculares; (f) folículos. (A) figura representativa da foto a ser analisada, nesta fase além da tireoide, também vemos os diversos tecidos que compõe a região onde se situa a glândula. (B) Foto representativa da imagem que foi analisada pelo software Image J, nesta imagem consta apenas a glândula, de forma a medirmos a área total da tireoide.

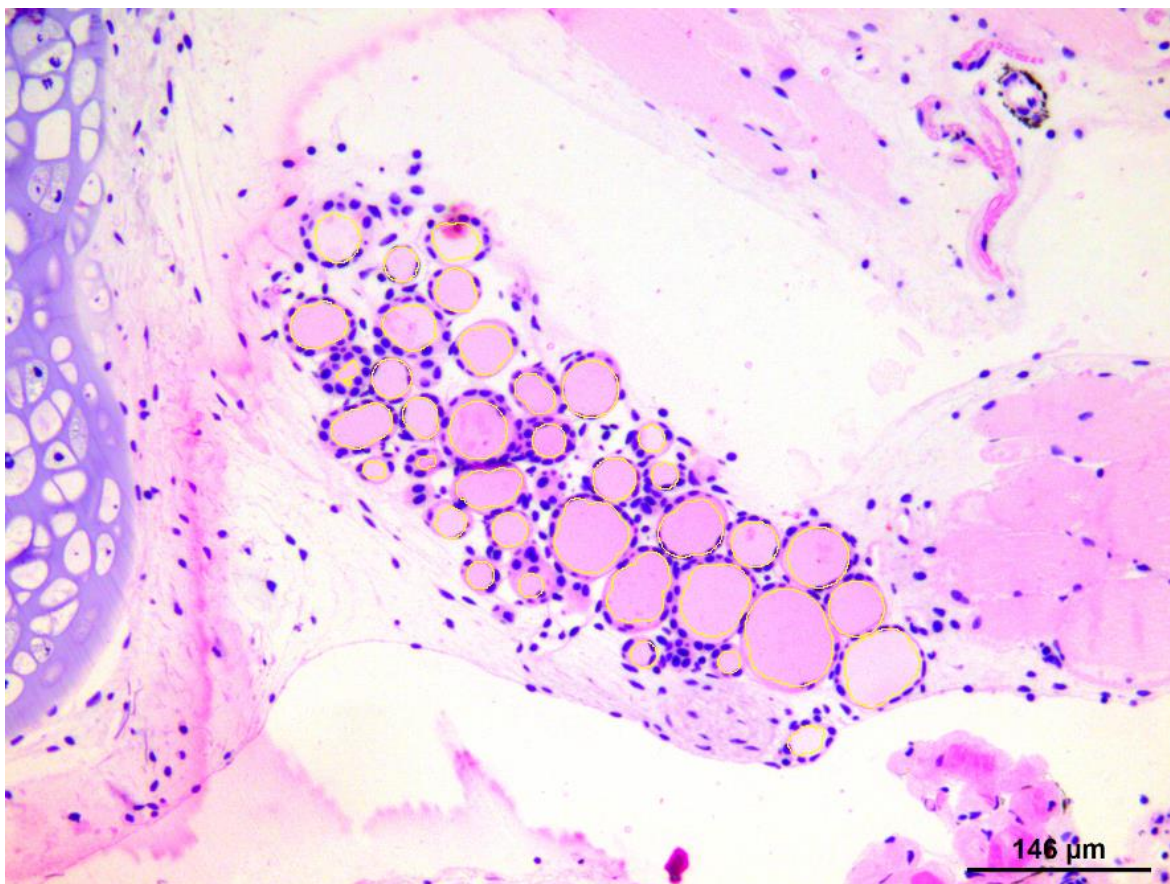


**Fonte:** Autoria própria

#### 4.3.6.2 Determinação da área dos folículos tireóideos

200 imagens de cada grupo foram analisadas (Figura 15) de forma a nos fornecer a área total dos folículos. Essa abordagem foi escolhida a fim de eliminar a influência da profundidade do corte e obter um panorama fiel da influência das exposições sobre a área dos folículos. As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) para a análise da área total dos folículos ( $\mu\text{m}^2$ ).

**Figura 15** – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da área total dos folículos da glândula tireoide. As marcações em amarelo representam a utilização da ferramenta do software ImageJ.



**Fonte:** Autoria própria

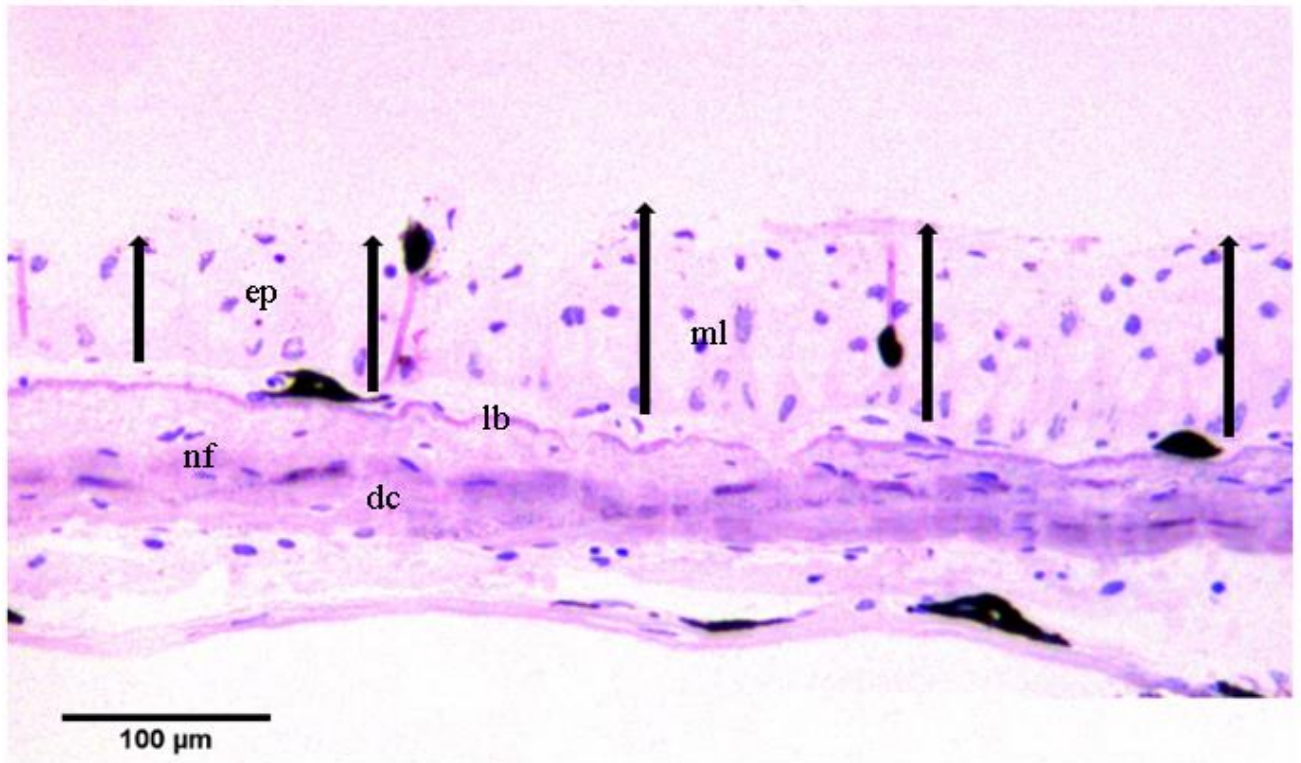
#### **4.3.6.3 Determinação quantidade total de folículos tireóideos**

Para a quantificação da quantidade de folículos todas as imagens que foram analisadas em relação a área total dos folículos tiveram o número de folículos totais contabilizados em números absolutos, de forma a fornecer dados para o cálculo da média, assim os resultados foram apresentados como média do número de folículos por grupo  $\pm$  o desvio padrão.

#### **4.3.6.4 Análise da espessura da epiderme do tecido dorsal**

As amostras do tecido referente a pele dorsal foram coletadas apenas no 21º dia e fixadas em solução não tamponada de paraformaldeído 4%, após desidratação com álcoois em concentrações crescentes, foi fixado em historesina Leica (Lote R8) e em seguida cortado em micrótomo Leica RM 2255 em sentido longitudinal na espessura de 2 $\mu$ m. Foram confeccionadas 5 lâminas por animal (n=3) de cada grupo, sendo que cada lâmina continha em média 12 cortes. A pele foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e analisada em microscopia de luz, as imagens foram obtidas com fotomicroscópio Leica DM 4000 B LED com auxílio do software *Leica Application Suite* (versão 4.5.0; Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). Dados contínuos foram tratados estatisticamente, procedeu-se também a descrição de achados qualitativos. Sessenta imagens foram analisadas para cada animal (n = 3) de forma a dar-nos os valores em  $\mu$ m da espessura da epiderme dorsal de cada animal (Figura 16). Cada uma das imagens foi analisada em 5 pontos com distancia aproximada de 100  $\mu$ m seguindo a metodologia de Rissoli *et al.* (2016) adaptada de Bueno-Guimarães *et al.* (2001).

**Figura 16** – Ilustração da metodologia utilizada para a mensuração da espessura da epiderme dorsal. (ep) epiderme; (nf) núcleo do fibroblasto; (dc) derme compacta; (lb) lâmina basal; (ml) melanócito.



Fonte: Autoria própria

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e checados para a homocedasticidade por meio do teste de Brown-Forsythe. Os dados que não apresentaram uma distribuição normal passaram por transformação logarítmica ou transformação em arco-seno da raiz quadrada, o que fosse mais adequado. Todos os dados que, com ou sem transformação foram tidos como normais e homocedásticos, foram analisados por meio do teste paramétrico de análise da variância em duas vias (ANOVA Two-Way), sendo consideradas as variáveis tempo e exposição. O pós-teste utilizado foi o teste de Benferroni. Para os dados que não atenderam à homocedasticidade e/ou a normalidade o teste não paramétrico utilizado foi o Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância ( $\alpha$ ) adotado foi de 0,05.

Para avaliar isoladamente o efeito do tempo sobre os biomarcadores analisados, comparamos os mesmos grupos nos períodos diferentes, de forma que o grupo controle e os grupos expostos foram comparados entre si no 7<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia através de um teste T pareado bicaudal adequado para a comparação entre duas médias, o nível de significância ( $\alpha$ ) adotado também foi de 0,05. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por meio do software GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA), com exceção do teste de Brown-Forsythe que foi obtido por meio do software Microsoft Excel 2016 para Windows (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

Os dados de caráter quantitativo normalmente distribuídos foram submetidos ao teste de correlação de Pearson para a análise da correlação entre dois biomarcadores, aqueles que não apresentaram normalidade foram tratados estatisticamente com o teste de Spearman para a análise da correlação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 COMPORTAMENTO DO GRUPO CONTROLE (CT)

Os animais do grupo CT não apresentaram mortalidade durante o experimento. A distância entre o focinho e a cloaca (DFC) no sétimo dia era de  $27,86 \pm 1,54$  mm. No vigésimo primeiro dia era de  $27,11 \pm 2,18$  mm, a análise entre as médias desses dois períodos não mostrou diferença estatística ( $P = 0,4101$ ). A análise do comprimento do membro posterior normalizado (CMPN) foi de  $0,04 \pm 0,02$  mm no primeiro período e de  $0,05 \pm 0,03$  mm no segundo período, sem, contudo, apresentar diferença estatística entre as duas médias ( $P = 0,4140$ ). A massa úmida total dos animais no dia 7 era de  $3,01 \pm 0,71$ g enquanto no dia 21 era de  $2,80 \pm 0,66$  g, nesse quesito também não houve diferença ( $P = 0,5245$ ).

O nível de atividade (NA) dos animais no dia 21 foi 48 % menor do que o NA dos animais do mesmo grupo analisados no 7º dia ( $P = 0,0019$ ). A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) muscular não apresentou diferença entre os dois períodos, sendo em média  $0,97 \pm 0,18$  UI.mg<sup>-1</sup> no dia 7 e de  $1,03 \pm 0,21$  UI.mg<sup>-1</sup> no dia 21 ( $P = 0,3398$ ). Os níveis de glicose no tecido hepático tampouco diferiram ( $P = 0,1113$ ) entre os dois períodos testados ( $16,12 \pm 3,14$  mg.dL<sup>-1</sup> no dia 7 e  $20,16 \pm 3,47$  mg.dL<sup>-1</sup> no dia 21). A glicose no tecido muscular da cauda (dia 7 =  $2,07 \pm 0,40$  e dia 21 =  $2,86 \pm 0,49$ ) estava 39 % mais elevada no segundo período quando comparada ao primeiro ( $P = 0,0051$ ). Em relação aos triglicérides, tanto no tecido hepático (CT 7 =  $29,70 \pm 2,29$  mg.dL<sup>-1</sup> e CT 21 =  $28,70 \pm 2,23$  mg.dL<sup>-1</sup>) quanto no tecido muscular (CT 7 =  $7,53 \pm 1,30$  mg.dL<sup>-1</sup> e CT 21 =  $7,31 \pm 1,01$  mg.dL<sup>-1</sup>) não houve diferenças entre os dois períodos testados ( $P = 0,5769$  e  $P = 0,8474$  respectivamente). Os níveis de proteínas no tecido hepático ( $118,56 \pm 15,83$  mg.dL<sup>-1</sup> para o 7º dia e  $109,45 \pm 14,62$  mg.dL<sup>-1</sup> para o 21º dia;  $P = 0,2561$ ) e muscular ( $85,71 \pm 15,42$  mg.dL<sup>-1</sup> para o 7º dia e  $91,06 \pm 18,00$  mg.dL<sup>-1</sup> para o 21º dia;  $P = 0,6746$ ) também não apresentaram diferenças (Tabela 5).

**Tabela 5** – Comportamento do grupo CT nos dois períodos analisados. As setas indicam diferenças estatisticamente comprovadas (↑) Aumento do parâmetro. (↓) Diminuição do parâmetro ( $P < 0,05$ ). (↔) Não houve diferença ( $P > 0,05$ ).

GRUPO CONTROLE				
BIOMARCADOR	MÉDIA 7º DIA	MÉDIA 21º DIA	COMPORTAMENTO	VALOR DE P
MORTALIDADE	0	0		
DISTANCIA FOCINHO CLOACA (mm)	27,86	27,11	↔	0,4101
COMPRIMENTO MEMBRO POSTERIOR* (mm)	0,04	0,05	↔	0,4140
MASSA ÚMIDA (g)	3,01	2,80	↔	0,5245
NÍVEL ATIVIDADE	0,77	0,40	↓	0,0019
LDH MUSCULAR (UI.mg <sup>-1</sup> )	0,97	1,03	↔	0,3398
GLICOSE HEPÁTICA (mg.dL <sup>-1</sup> )	16,12	20,16	↔	0,1113
GLICOSE MUSCULAR (mg.dL <sup>-1</sup> )	2,07	2,86	↑	0,0051
TRIGLICÉRIDES HEPÁTICO (mg.dL <sup>-1</sup> )	2,29	2,23	↔	0,5769
TRIGLICÉRIDES MUSCULAR (mg.dL <sup>-1</sup> )	7,53	7,31	↔	0,8474
PROTEÍNA HEPÁTICA (mg.L <sup>-1</sup> )	118,56	109,44	↔	0,2561
PROTEÍNA MUSCULAR (mg.dL <sup>-1</sup> )	85,71	91,06	↔	0,6746

**Fonte:** Elaboração própria.

(\*) Comprimento do membro posterior normalizado pela distância focinho cloaca.

A análise histopatológica da glândula tireoide procedeu-se apenas nas amostras referentes ao vigésimo primeiro dia de exposição; conforme determina o protocolo da OECD (2008) para a análise de substâncias com potencial interação com o eixo HHT. De forma que a área total da glândula foi de  $0,01102 \pm 0,0300 \text{ mm}^2$  e a área dos folículos foi contabilizada em  $0,0340 \pm 0,0150 \text{ mm}^2$ . O número de folículos para esse grupo foi de  $19,42 \pm 9,42$  folículos. A espessura da epiderme dorsal também foi analisada apenas nos animais expostos durante 21 dias, assim os valores para o grupo controle são de  $45,0 \pm 17,0 \mu\text{m}$ .

## 5.2 COMPORTAMENTO DO GRUPO CONTROLE (CT) COMPARADO AOS GRUPOS EXPOSTOS

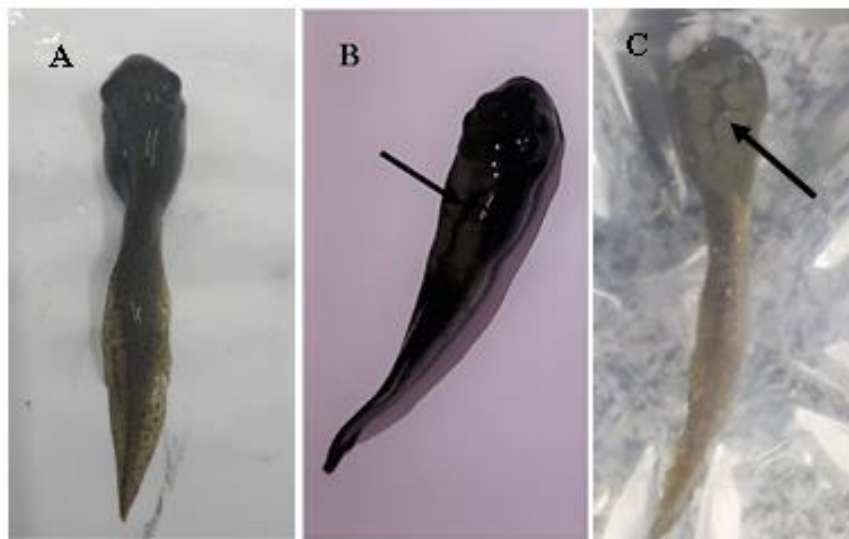
### 5.2.1 Mortalidade

Houve 10% de mortalidade tanto no grupo LI quanto no grupo SE+LI. Isso mostra que esse parâmetro apresentou uma relação com a presença do contaminante lítio, uma vez que



observamos a morte de dois animais expostos ao metal alcalino (10 % dos animais) e dois animais expostos ao selênio em combinação com o lítio (10 % dos animais), enquanto nos demais grupos não houve mortalidade. Os referidos animais apresentavam lesões estriadas no dorso (Figura 17), e a morte foi precedida por uma visível redução do nível de atividade, bem como por anorexia. Poucos dias depois de apresentarem essas respostas os animais morreram.

**Figura 17** – (A) girino do grupo controle, padrão normal com pintas uniformes no dorso; (B) girino exposto ao lítio; (C) girino exposto ao selênio em combinação com o lítio. Os girinos quando expostos apresentavam padrão estriado na pele (seta).



**Fonte** autoria própria.

### 5.2.2 Desenvolvimento metamórfico segundo o estadiamento de Gosner (1960)

Em relação ao desenvolvimento metamórfico dos animais testados no primeiro período (dia 7), foi observado para o grupo CT três girinos no estágio 25G e sete animais no estágio 26G. O grupo LI apresentou três animais no estágio 25G, cinco no estágio 26G, um no estágio 31G e um no estágio 34G. O grupo SE teve um animal no estágio 25G, três no estágio 26G e seis no estágio 31G. O grupo SE+LI apresentou cinco animais no estágio 25G e três animais no estágio 26G como mostra a Tabela 6 e Figura 18:

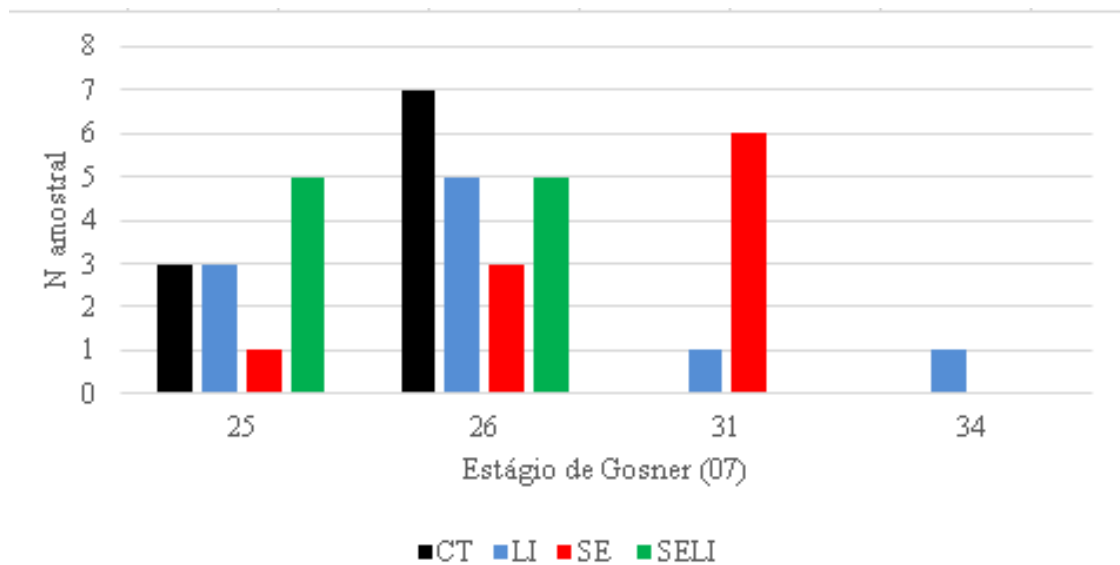


**Tabela 6** – Descrição do desenvolvimento dos animais segundo Gosner (1960) para os animais no 7º dia de experimento. Grupo controle (CT) n=10, grupo exposto ao lítio (LI) n=10, grupo exposto ao selênio (SE) n=10 e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI) n=10.

DESENVOLVIMENTO SEGUNDO GOSNER (1960) PARA O 7º DIA DE EXPOSIÇÃO				
ESTÁGIO	CT 07	LI 07	SE 07	SE+LI 07
25	3 (30%)	3 (30%)	1 (10%)	5 (50%)
26	7 (70%)	5 (50%)	3 (30%)	5 (50%)
31	0 (0%)	1 (10%)	6 (60%)	0 (0%)
34	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 18** – O estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos animais no 7º dia de exposição. Grupo controle (CT) n=10, grupo exposto ao lítio (LI) n=10, grupo exposto ao selênio (SE) n=10 e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI) n=10.



**Fonte:** Elaboração própria.

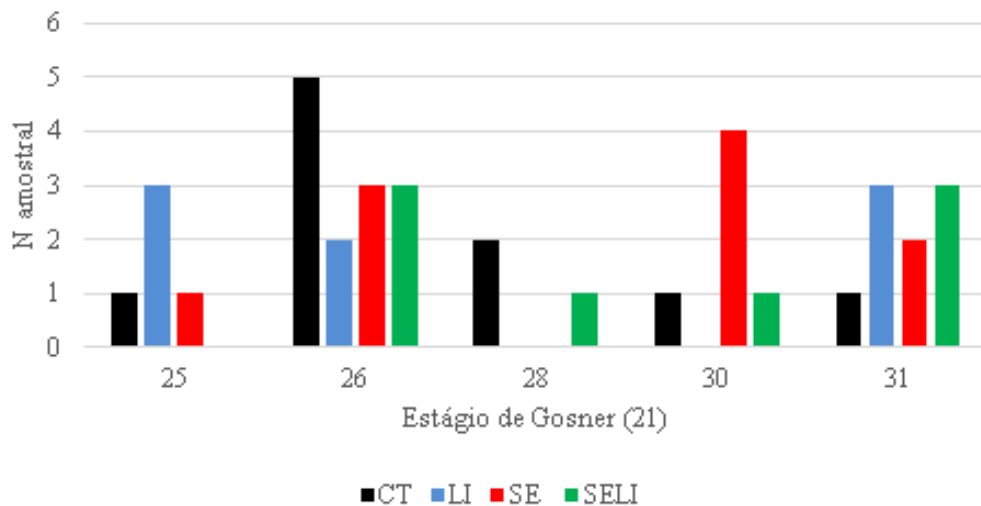
Em relação ao segundo período (dia 21), nos animais do grupo CT um girino estava no estágio 25G, cinco no estágio 26G, dois no estágio 28G, um no estágio 30G e um no estágio 31G. O grupo LI apresentou três animais no estágio 25G, dois no estágio 26G e três no estágio 31G. O grupo SE continha um animal no estágio 25G, três animais no estágio 26G, quatro no estágio 30G e dois no estágio 31G, enquanto que o grupo SE+LI continha um animal no estágio 28G, três animais no estágio 26G, um no estágio 30G e três no estágio 31G (Tabela 7 e Figura 19).

**Tabela 7** – Descrição do desenvolvimento dos animais segundo Gosner (1960) para os animais no 21º dia de experimento. Grupo controle (CT) n=10, grupo exposto ao lítio (LI) n=8, grupo exposto ao selênio (SE) n=10 e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI) n=8.

DESENVOLVIMENTO SEGUNDO GOSNER (1960) PARA O 21º DIA DE EXPOSIÇÃO				
ESTÁGIO	CT 21	LI 21	SE 21	SE+LI 21
25	1 (10%)	3 (38%)	1 (10%)	0 (0%)
26	5 (50%)	2 (25%)	3 (30%)	3 (38%)
28	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (13%)
30	1 (10%)	0 (0%)	4 (40%)	1 (13%)
31	1 (10%)	3 (38%)	2 (20%)	3 (38%)

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 19** – O estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos animais no 21º primeiro dia de exposição. Grupo controle (CT) n=10, grupo exposto ao lítio (LI) n=10, grupo exposto ao selênio (SE) n=10 e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI) n=10.



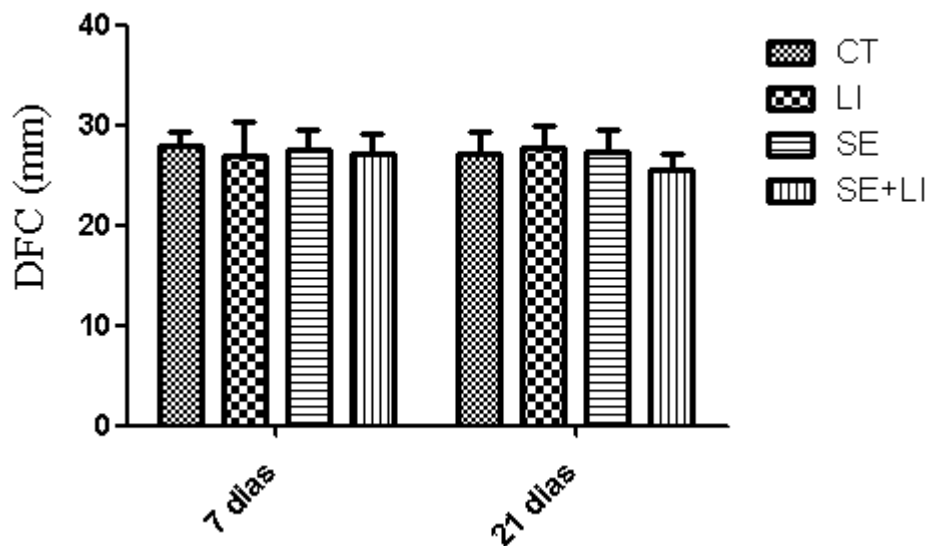
**Fonte:** Elaboração própria.

Deve-se ressaltar que todos os animais, tanto no dia 7, quanto no dia 21 estavam no período de pré-metamorfose, que segundo Denver *et al.* (2002, p. 469) varia do estágio 25 ao estágio 35 de Gosner.

### 5.2.3 Distância entre o focinho e a cloaca (DFC) e comprimento do membro posterior normalizado (CMPN).

A distância entre o focinho e a cloaca (DFC) não mostrou diferenças estatísticas em nenhum dos grupos, bem como em nenhum dos períodos. No 7º dia os animais do grupo CT apresentaram DFC de  $27,86 \pm 1,54$  mm, os animais do grupo LI  $27,00 \pm 3,35$  mm, os do grupo SE  $27,80 \pm 2,00$  mm e os do grupo SE+LI  $27,15 \pm 2,06$  mm ( $P > 0,05$ ). No 21º dia o grupo controle estava com  $27,11 \pm 2,18$  mm, o grupo LI  $27,80 \pm 2,20$  mm, os do grupo SE  $27,30 \pm 2,25$  mm e os do grupo SE+LI  $25,60 \pm 1,46$  mm ( $P > 0,05$ ) (Figura 20).

**Figura 20** – Distância entre o focinho e a cloaca (DFC). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

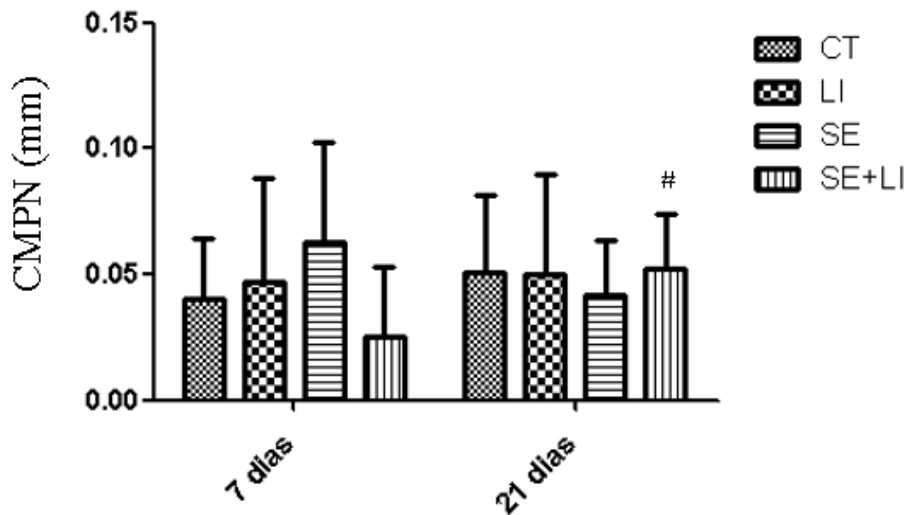


**Fonte:** Elaboração própria.

A análise do comprimento do membro posterior normalizado (CMPN) não mostrou diferenças entre os grupos quando comparados ao grupo controle nos seus respectivos períodos, assim, os resultados para o 7º dia são os que seguem: grupo CT  $0,40 \pm 0,24$  mm; grupo LI  $0,05 \pm 0,04$  mm; grupo SE  $0,06 \pm 0,04$  mm e grupo SE+LI  $0,02 \pm 0,03$  mm ( $P > 0,05$ ). Os resultados para o 21º primeiro dia são: grupo CT  $0,05 \pm 0,05$ ; grupo LI  $0,05 \pm 0,04$  mm; grupo SE  $0,04 \pm 0,02$  mm e SE+LI  $0,05 \pm 0,02$  mm ( $P > 0,05$ ).

Na comparação entre grupos homólogos nos dias 7 e 21 vimos um aumento ( $P = 0,03$ ) de 100% no comprimento do membro posterior normalizado pela distância entre o focinho e a cloaca para o grupo SE+LI (Figura 21).

**Figura 21** – Comprimento do membro posterior normalizado. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (#) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os animais de grupos homólogos são comparados em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaboração própria.

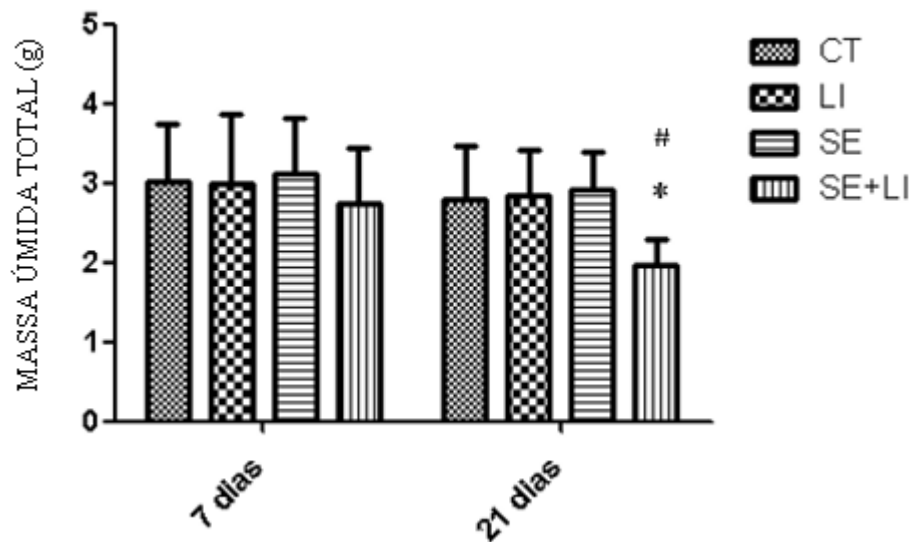
#### 5.2.4 Massa úmida total

A massa úmida total dos animais foi avaliada utilizando-se balança de precisão analítica (Shimadzu, AY220) em cada um dos dois períodos experimentais. No dia 7 não houve diferença neste parâmetro entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ): os animais do grupo CT apresentaram massa corporal média de  $3,01 \pm 0,71$  g, os animais do grupo LI  $3,00 \pm 0,86$ g, os do grupo SE  $3,12 \pm 0,70$ g e os animais do grupo SE+LI apresentaram massa corpórea média de  $2,68 \pm 0,51$  g. No dia 21 os animais do grupo CT estavam com massa corpórea de  $2,80 \pm 0,66$ g, os do grupo LI  $2,85 \pm 0,57$ g, no grupo SE a massa corporal média foi de  $2,94 \pm 0,47$  g, enquanto que os animais do grupo SE+LI apresentaram  $1,96 \pm 0,33$  g, diferindo ( $P < 0,05$ ) dos animais do grupo CT no mesmo período, apresentando uma redução de 30% na massa corporal total.

A comparação entre os grupos homólogos em períodos distintos mostrou uma diferença ( $P = 0,0035$ ) apenas para os animais do grupo SE+LI do dia 21 quando comparados com os

animais do mesmo grupo no dia 7, apresentando uma redução na massa corporal total de 27% em função do tempo de exposição (Figura 22).

**Figura 22** – Resultados referentes a massa úmida total dos animais expostos e do grupo controle no 7º dia e no 21º dia. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os grupos expostos são comparados ao grupo controle em seus respectivos períodos; (#) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os animais de grupos homólogos são comparados em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaboração própria.

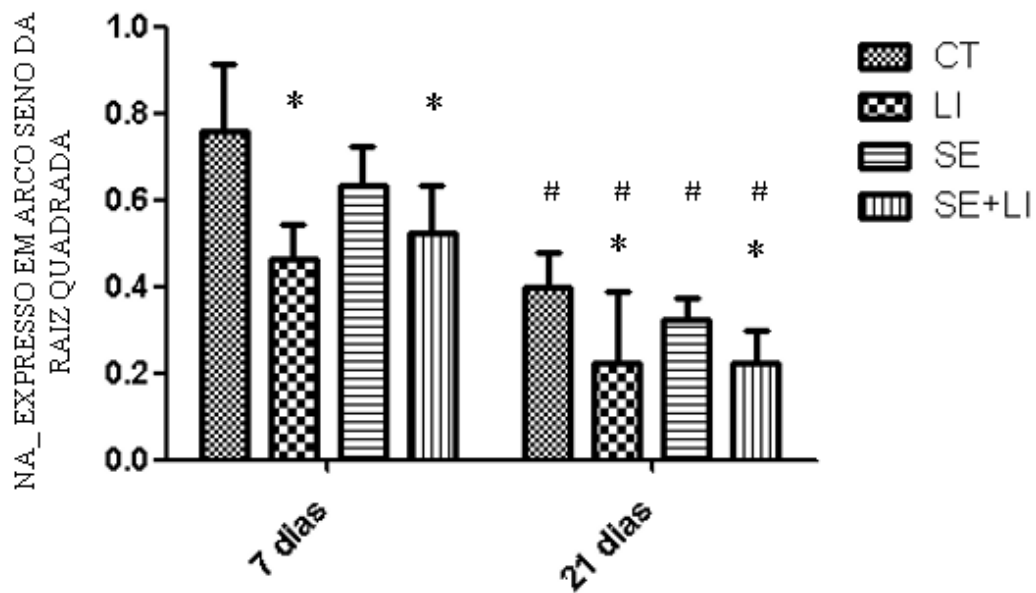
### 5.2.5 Nível de atividade (NA)

Ao final do dia 7, os animais do grupo LI estavam mais letárgicos (45%) do que os do grupo CT ( $P < 0,001$ ), bem como os animais do grupo SE+LI, que estavam 50% mais letárgicos que o controle ( $P < 0,001$ ). Em relação ao grupo SE (65%), não houve alterações nesse parâmetro em relação ao CT ( $P > 0,05$ ). No dia 21, o mesmo comportamento foi observado. Os animais do grupo LI e SE+LI apresentavam um NA 43% inferior àquela do grupo CT mostrando letargia ( $P < 0,001$ ). O grupo SE continuou com um NA equivalente ao grupo CT ( $P > 0,05$ ).

Quando comparamos os grupos homólogos em períodos distintos, a fim de avaliarmos a influência do tempo nas exposições de forma isolada pôde-se notar que, para o NA, os animais do grupo CT no segundo período (dia 21) estavam menos ativos ( $P = 0,0019$ ) do que no primeiro

período (dia 7). Também foi observada letargia nos demais grupos experimentais no 21º dia em relação ao 7º dia para os grupos LI ( $P = 0,0132$ ), SE ( $P = 0,01$ ) e SE+LI ( $P = 0,004$ ), como mostra a Figura 23.

**Figura 23** – Nível de Atividade (N.A). Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os grupos expostos são comparados ao grupo controle em seus respectivos períodos; (#) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os animais de grupos homólogos são comparados em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaboração própria.

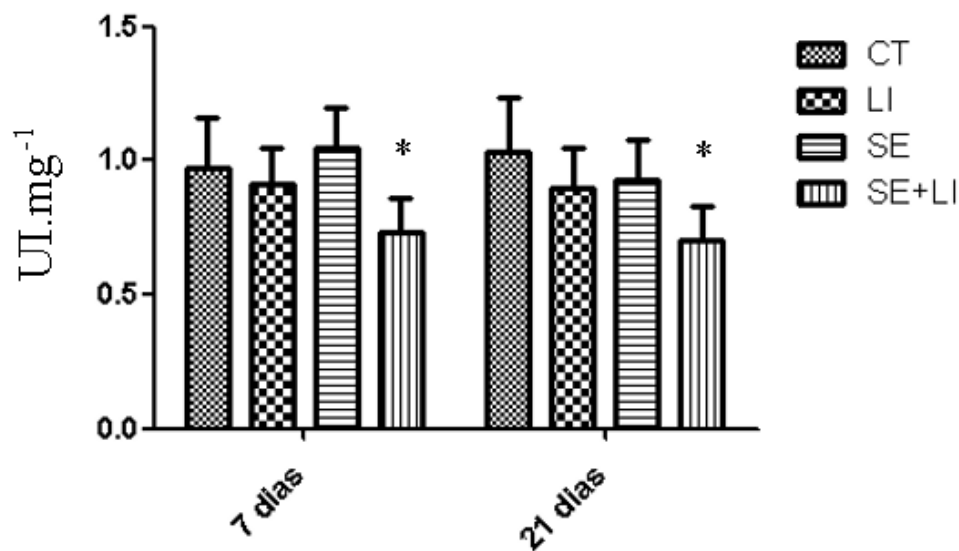
### 5.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

#### 5.3.1 Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no tecido muscular caudal

A enzima lactato desidrogenase (LDH) do musculo da cauda quando analisada no dia 7 não apresentou diferença para os grupos LI ( $0,91 \pm 0,13 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) e SE ( $1,04 \pm 0,15 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) quando comparados ao grupo CT ( $0,97 \pm 0,18 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) ( $P > 0,05$ ); contudo, o grupo SE+LI mostrou redução significativa na atividade desta enzima ( $0,73 \pm 0,13 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) ( $P < 0,01$ ). As análises do dia 21 mostraram que esse padrão se repetiu, ou seja, houve redução da atividade da enzima para o grupo SE+LI ( $0,70 \pm 0,12 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) em relação ao CT ( $1,03 \pm 0,21 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) ( $P < 0,001$ ), enquanto os grupos LI ( $0,90 \pm 0,15 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) e SE ( $0,92 \pm 0,15 \text{ UI.mg}^{-1}$ ) não

diferiram do CT ( $P > 0,05$ ). Ademais, quando comparamos os grupos homólogos nos períodos distintos não foram observadas diferenças na atividade da LDH ( $P > 0,05$ ) (Figura 24).

**Figura 24** – Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no músculo caudal. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indicam diferença estatística entre o grupo exposto e o grupo controle. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

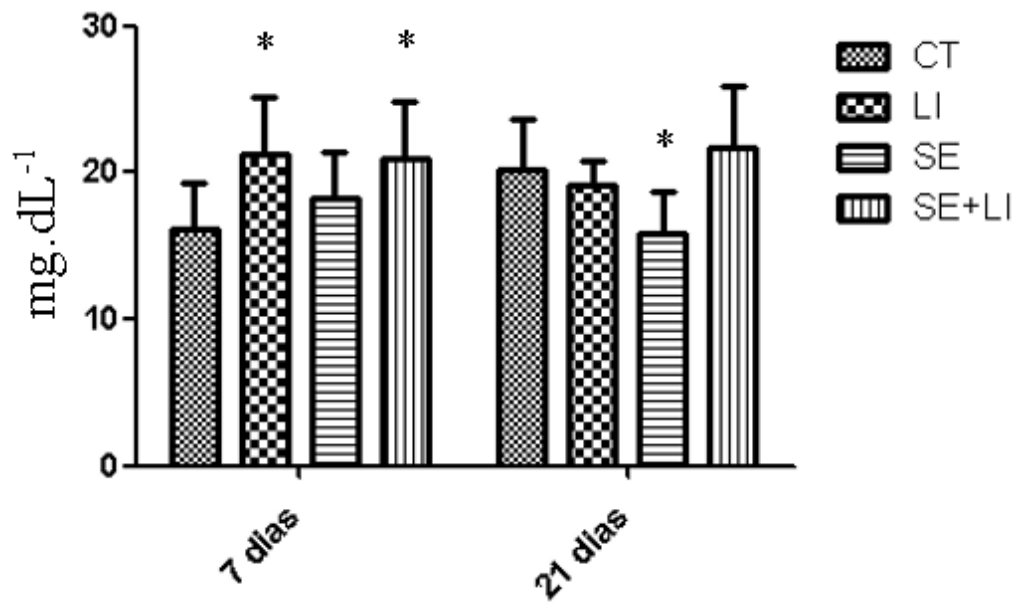


Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.2 Quantificação da concentração de glicose hepática e muscular caudal

No tecido hepático, pôde-se notar que no dia 7 os níveis de glicose do grupo LI ( $21,30 \pm 3,90 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) estavam mais elevados que os observados para o grupo CT ( $16,12 \pm 3,14 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) ( $P < 0,01$ ), assim como para o grupo SE+LI ( $21,00 \pm 3,85 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) ( $P < 0,05$ ). Contudo, para o segundo período, apenas o grupo SE ( $15,80 \pm 2,96 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) mostrou uma redução na glicose em relação ao CT ( $20,16 \pm 3,47 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) ( $P < 0,05$ ) no tecido hepático (Figura 25).

**Figura 25** – Níveis de glicose hepática nos diferentes grupos. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indicam diferença estatística entre o grupo exposto e o grupo controle. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Fonte:** Elaboração própria.

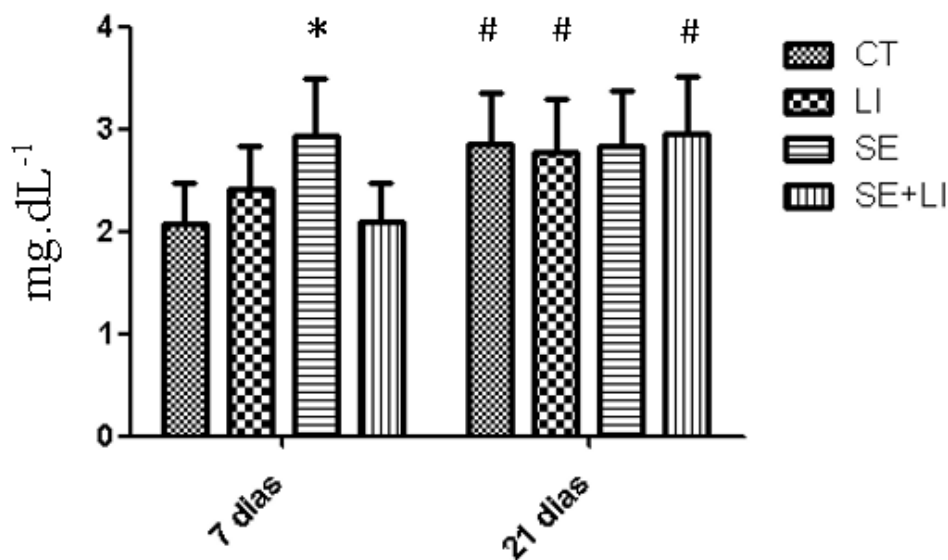
Os níveis de glicose no tecido muscular da cauda no dia 7 foram aumentados ( $P < 0,01$ ) no grupo SE ( $2,93 \pm 0,56$  mg.dL<sup>-1</sup>) quando comparado ao grupo CT ( $2,07 \pm 0,40$  mg.dL<sup>-1</sup>), enquanto os grupos LI ( $2,41 \pm 0,42$  mg.dL<sup>-1</sup>) e SE+LI ( $2,10 \pm 0,40$  mg.dL<sup>-1</sup>) não diferiram do CT ( $P > 0,05$ ). Em contraste, no 21º dia de exposição nenhum dos grupos diferiu do CT ( $P > 0,05$ ) com relação aos níveis de glicose no músculo da cauda (CT =  $2,86 \pm 0,49$ ; LI =  $2,77 \pm 0,51$ ; SE =  $2,83 \pm 0,53$  e SE+LI =  $2,95 \pm 0,56$  mg. dL<sup>-1</sup>).

Além disso, quando comparamos os grupos homólogos em períodos distintos, pôde-se evidenciar que os níveis de glicose na musculatura caudal aumentaram ao 21º dia em relação ao 7º dia para o grupo CT ( $2,07 \pm 0,40$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 7º vs.  $2,86 \pm 0,49$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 21º;  $P = 0,005$ ), LI ( $2,41 \pm 0,42$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 7º vs.  $2,77 \pm 0,51$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 21º;  $P = 0,04$ ) e SE+LI ( $2,10 \pm 0,40$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 7º vs.  $2,95 \pm 0,56$  mg.dL<sup>-1</sup> ao 21º;  $P = 0,03$ ). Apenas o grupo SE não mostrou



diferença nesse parâmetro entre os dois períodos experimentais ( $2,93 \pm 0,56 \text{ mg.dL}^{-1}$  ao 7º vs.  $2,83 \pm 0,53 \text{ mg.dL}^{-1}$  ao 21º;  $P > 0,05$ ) (Figura 26).

**Figura 26** – Níveis de glicose muscular caudal. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os grupos expostos são comparados ao grupo controle em seus respectivos períodos; (#) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os animais de grupos homólogos são comparados em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



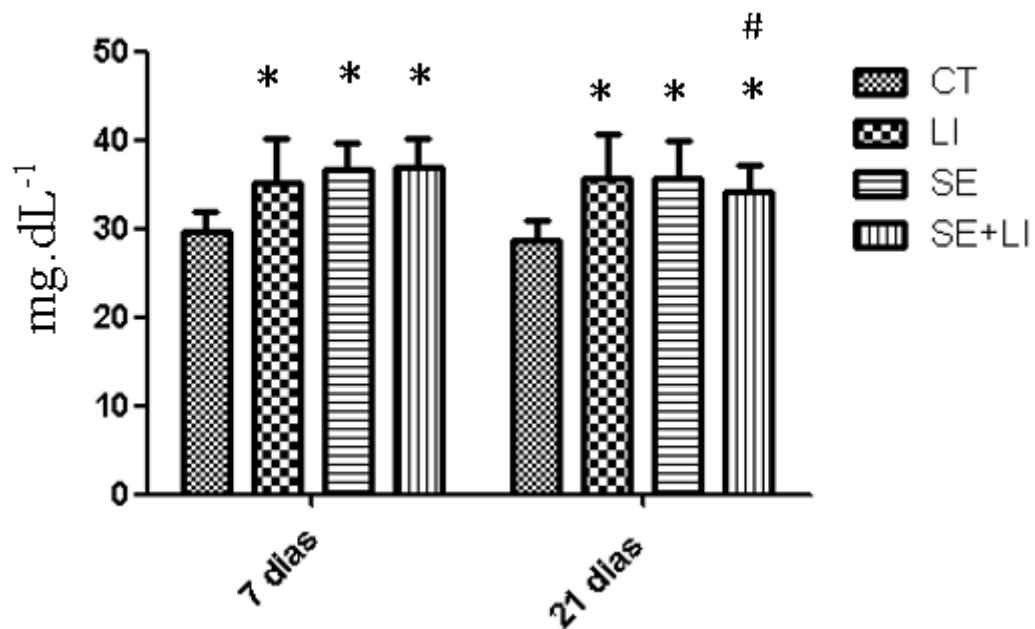
Fonte: Elaboração própria.

#### 5.3.4 Quantificação da concentração de triglicérides hepático e muscular caudal

Em relação às análises no tecido hepático, a concentração de triglicérides no dia 7 foi maior em todos os grupos expostos quando comparados ao grupo CT ( $29,70 \pm 2,29 \text{ mg.dL}^{-1}$ ), sendo LI ( $35,20 \pm 5,00 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,01$ ), SE ( $36,70 \pm 2,90 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ) e SE+LI ( $36,90 \pm 3,25 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ). Para o dia 21, foi observado o mesmo padrão descrito para o 7º dia, com valores inferiores para o CT ( $28,70 \pm 2,23 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) em relação aos demais grupos experimentais LI ( $35,75 \pm 5,00 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ), SE ( $35,60 \pm 4,34 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ) e SE+LI ( $34,21 \pm 2,90 \text{ mg.dL}^{-1}$ ;  $P < 0,01$ ). Adicionalmente, a comparação entre grupos homólogos nos diferentes períodos mostrou que a única diferença observada nos níveis de

triglicérides no fígado foi para o grupo SE+LI, que apresentou uma redução ( $P = 0,029$ ) ao 21º dia ( $34,21 \pm 2,90 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) em relação ao 7º dia ( $36,90 \pm 3,25 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) (Figura 27).

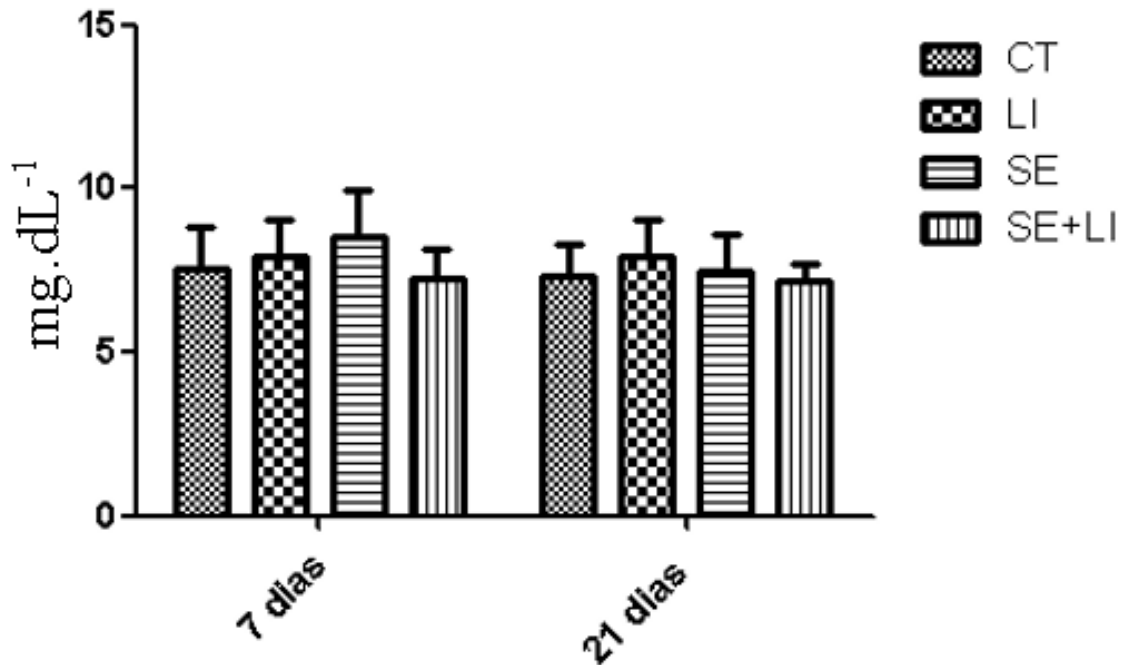
**Figura 27** – Níveis de triglicérides no tecido hepático. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os grupos expostos são comparados ao grupo controle em seus respectivos períodos; (#) indica diferença estatisticamente relevante ( $P < 0,05$ ) quando os animais de grupos homólogos são comparados em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Fonte:** Elaboração própria.

Os níveis de triglicérides no músculo da cauda não diferiram entre os grupos experimentais em nenhum dos cenários analisados, ou seja, na comparação entre os grupos expostos com o grupo controle no dia 7 (CT =  $7,53 \pm 1,30 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; LI =  $7,91 \pm 1,12 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; SE =  $8,53 \pm 1,40 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; SE+LI =  $7,26 \pm 0,90 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) ou no dia 21 (CT =  $7,31 \pm 1,01 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; LI =  $7,93 \pm 1,01 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; SE =  $7,47 \pm 1,08 \text{ mg.dL}^{-1}$ ; SE+LI =  $7,51 \pm 0,55 \text{ mg.dL}^{-1}$ ), tampouco os grupos homólogos em períodos distintos não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) (Figura 28).

**Figura 28** – Níveis de triglicérides muscular caudal. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). Não houve diferença estatística em nenhum dos cenários analisados. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



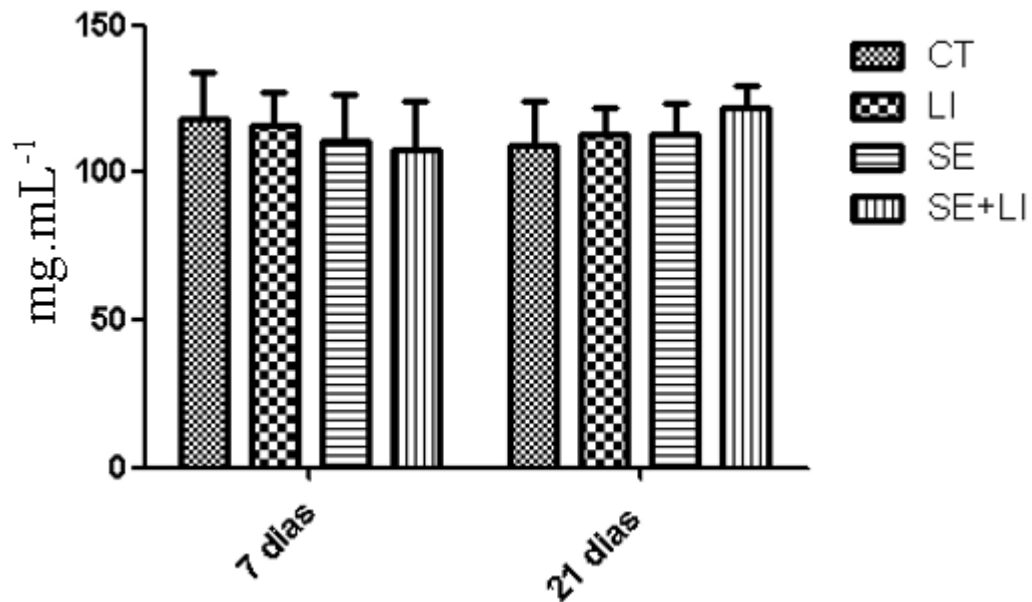
Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.5 Quantificação da concentração de proteínas hepáticas e muscular caudal.

Os níveis de proteína no fígado não se alteraram em nenhum dos cenários testados ( $P > 0,05$ ). Dia 07 (CT =  $118,56 \pm 15,19$  mg.mL<sup>-1</sup>; LI =  $116,33 \pm 11,08$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE =  $111,00 \pm 15,63$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE+LI =  $108,05 \pm 15,83$  mg.mL<sup>-1</sup>). Dia 21 (CT =  $109,45 \pm 14,62$  mg.mL<sup>-1</sup>; LI =  $113,36 \pm 8,61$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE =  $113,36 \pm 10,48$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE+LI =  $121,76 \pm 8,09$  mg.mL<sup>-1</sup>). A

comparação dos grupos homólogos em períodos distintos, também não evidenciou diferença ( $P > 0,05$ ), como mostra a Figura 29.

**Figura 29** – Concentração de proteínas do tecido hepático. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). Não houve diferença em nenhum cenário testado. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

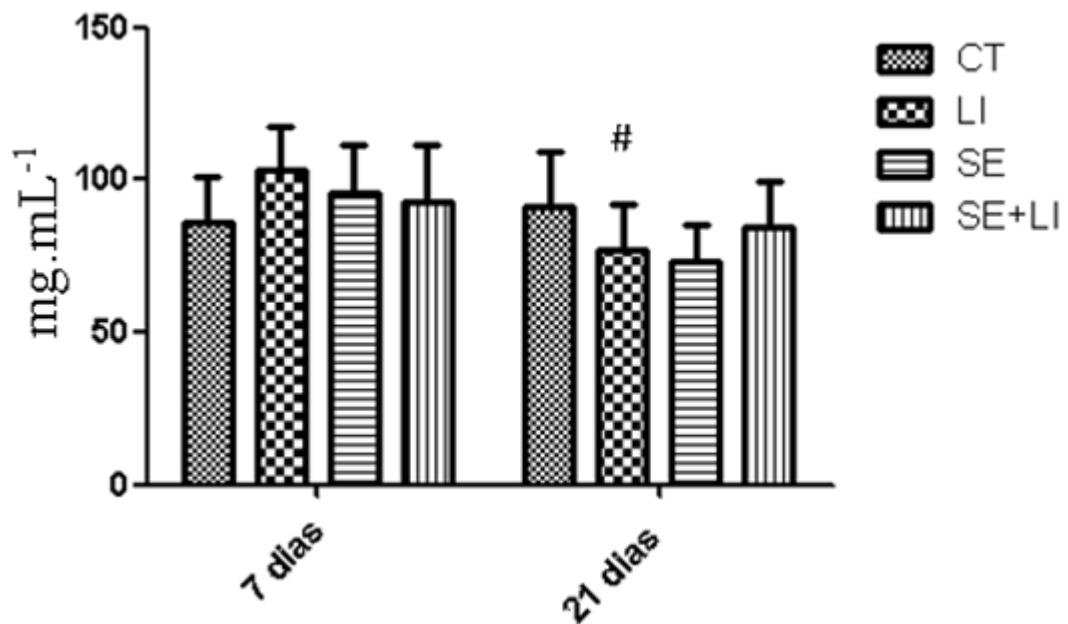


Fonte: Elaboração própria.

A concentração de proteínas no tecido muscular da cauda não apresentou diferenças nos grupos expostos quando comparados ao controle nos dois períodos de exposição. Dia 07 (CT =  $85,71 \pm 15,42$  mg.mL<sup>-1</sup>; LI =  $103,36 \pm 14,35$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE =  $95,80 \pm 16,01$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE+LI =  $93,00 \pm 18,62$  mg.mL<sup>-1</sup>). Dia 21 (CT =  $91,06 \pm 18,00$  mg.mL<sup>-1</sup>; LI =  $76,84 \pm 14,80$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE =  $73,06 \pm 12,30$  mg.mL<sup>-1</sup>; SE+LI =  $84,70 \pm 14,95$  mg.mL<sup>-1</sup>).

Na comparação entre os grupos homólogos pôde-se observar que, quando comparamos o grupo LI no dia 7 ( $103,36 \pm 14,35$  mg.mL<sup>-1</sup>) com os observados no dia 21 ( $76,84 \pm 14,80$  mg.mL<sup>-1</sup>), ocorreu uma redução de 24% na concentração de proteínas no músculo da cauda ( $P = 0,038$ ) (Figura 30).

**Figura 30** – Concentração de proteínas no tecido muscular caudal. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (#) indica que houve diferença quando comparamos o mesmo grupo em períodos diferentes. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaboração própria.

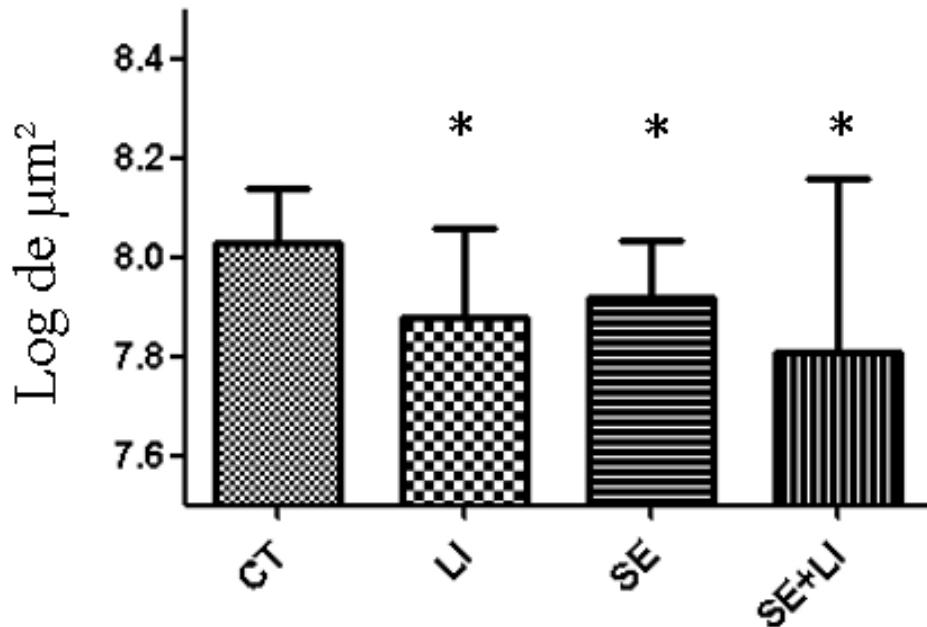
## 5.4 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

### 5.4.1 Análise histológica da glândula tireoide

A glândula tireoide foi analisada apenas no vigésimo primeiro dia em relação a área total da glândula, área total dos folículos, bem como o número de folículos. Para o grupo CT a área total da glândula compreendeu  $0,1102 \pm 0,030 \text{ mm}^2$ , o grupo LI ( $0,0812 \pm 0,0314 \text{ mm}^2$ ) demonstrou uma redução de 26% ( $P < 0,05$ ); o grupo SE ( $0,0862 \pm 0,0251 \text{ mm}^2$ ) mostrou uma

redução de 22% ( $P < 0,05$ ) e o grupo SE+LI ( $0,0874 \pm 0,0722 \text{ mm}^2$ ) uma redução de 17% ( $P < 0,05$ ) com relação ao controle (Figura 31).

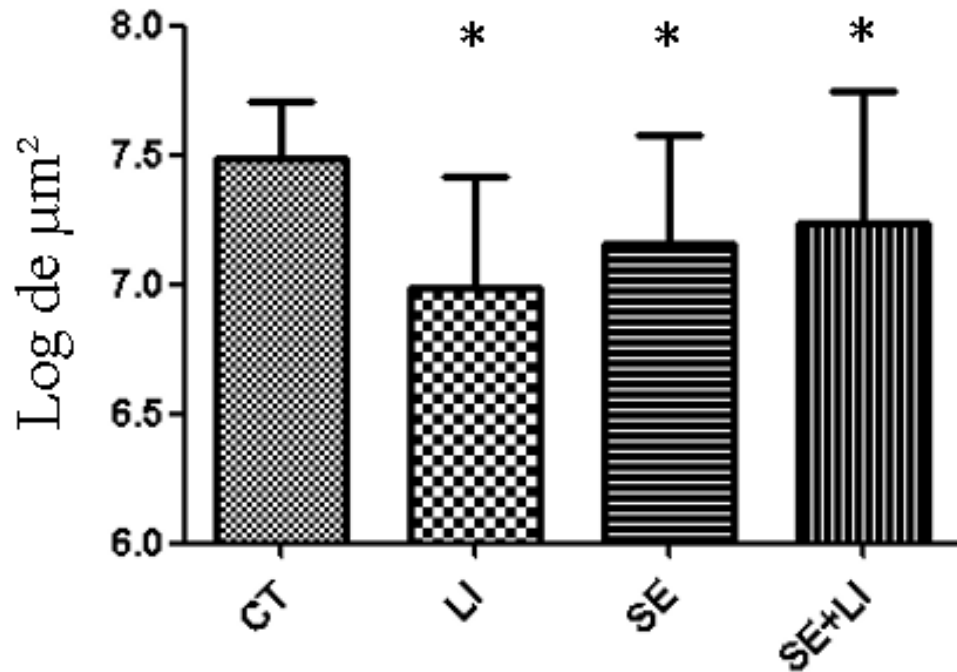
**Figura 31** – Área total da glândula tireoide. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica que houve diferença quando comparamos com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Fonte:** Elaboração própria.

A análise da área total dos folículos após 21 dias de exposição resultou em: grupo CT  $0,0340 \pm 0,0150 \text{ mm}^2$ ; o grupo LI ( $0,0153 \pm 0,0150 \text{ mm}^2$ ) apresentou uma redução de 55% ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo CT; o grupo SE ( $0,0210 \pm 0,0174 \text{ cm}^2$ ) teve redução de 38% ( $P < 0,05$ ) enquanto que o grupo SE+LI ( $0,0283 \pm 0,0294 \text{ mm}^2$ ) mostrou redução de 17% ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo CT após o decorrer do período de 21 dias (Figura 32).

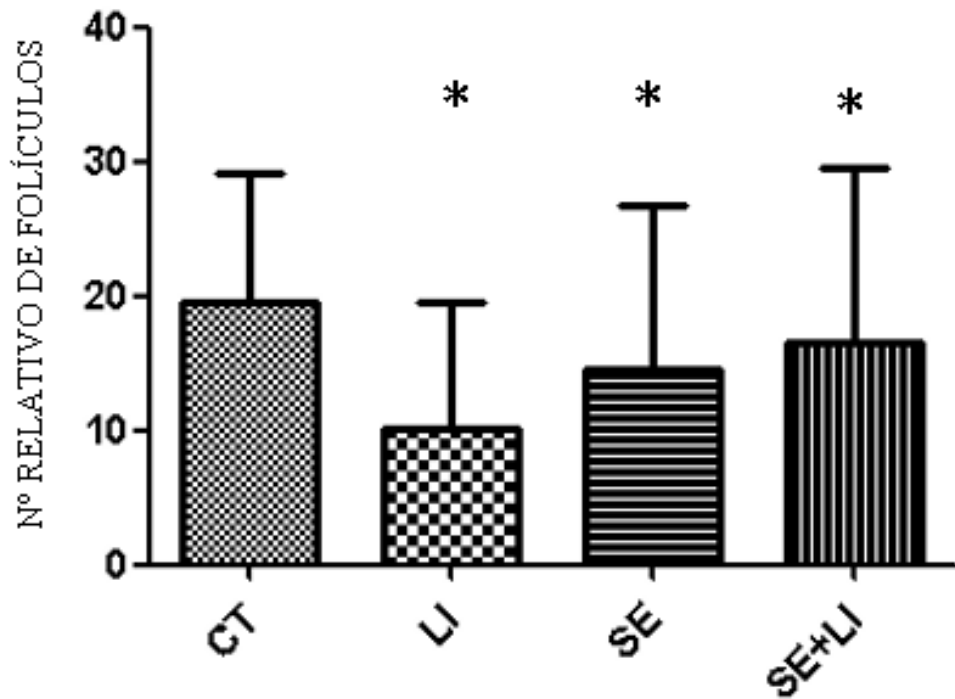
**Figura 32** – Área total dos folículos após 21 dias de exposição. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica que houve diferença quando comparamos com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Fonte:** Elaboração própria.

A quantidade total de folículos para o grupo CT foi de  $19,41 \pm 9,41$  folículos; o grupo LI ( $10,13 \pm 9,50$  folículos) mostrou uma redução de 48% ( $P < 0,05$ ) no número total de folículos; o grupo SE ( $14,52 \pm 12,22$  folículos) teve uma redução de 25% ( $P < 0,05$ ) no número dos folículos; e o grupo SE+LI ( $16,01 \pm 12,65$  folículos) uma redução de 18% ( $P < 0,05$ ) no número total de folículos após 21 dias de exposição (Figura 33).

**Figura 33** – Número de folículos após 21 dias de exposição. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica que houve diferença quando comparamos com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

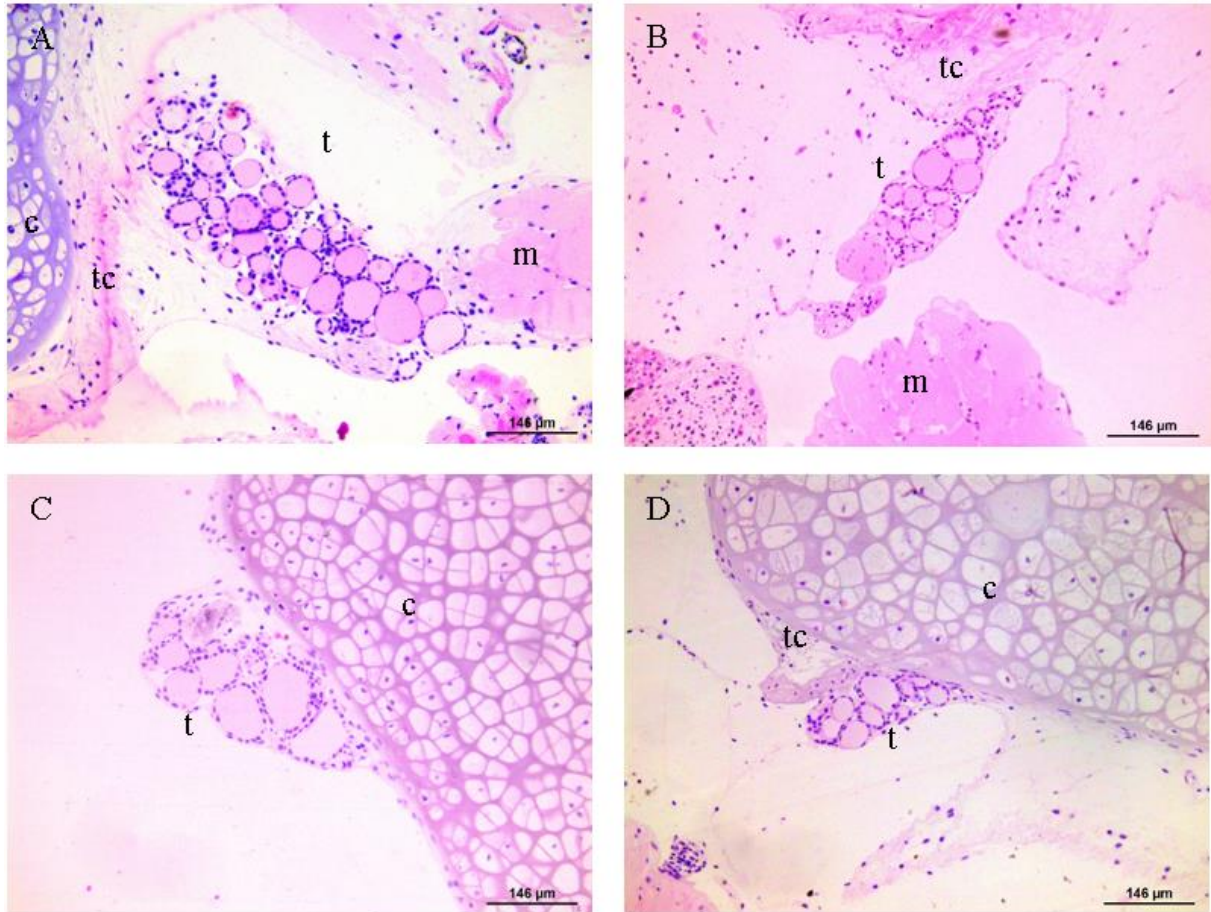


**Fonte:** Elaboração própria.

Ao analisarmos aspectos qualitativos da glândula, o que se nota é que para os grupos expostos sem exceção houve, além da diminuição da área da glândula, assimetrias na circunferência dos folículos (Figura 34).



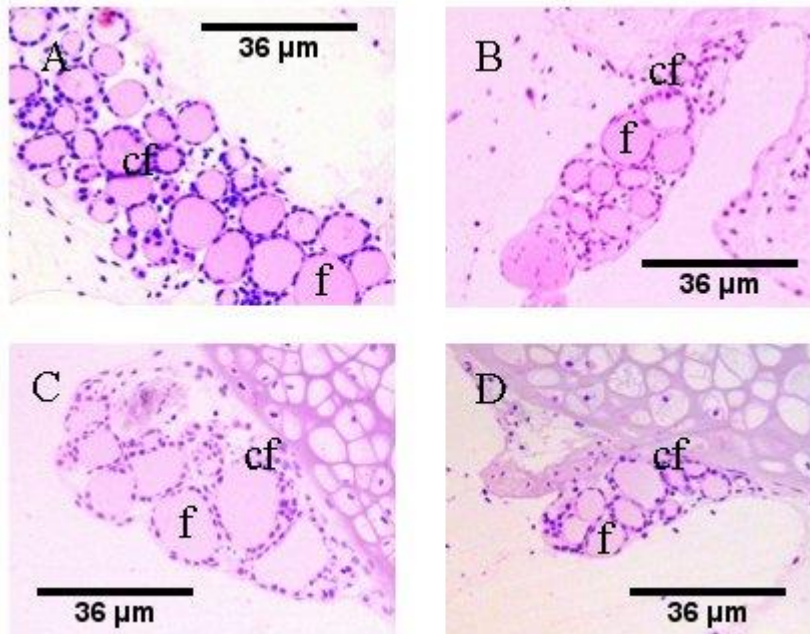
**Figura 34** – Cortes longitudinais da glândula tireoide. (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao lítio (LI), (C) grupo exposto ao selênio (SE) e (D) grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI), após 21 dias de exposição. Cartilagem (c), tecido conjuntivo (tc), tireoide (t), músculo (m).



**Fonte:** Elaboração própria.

Em relação à qualidade do coloide, para todos os grupos foram observados colóides homogêneos, heterogêneos, bem como folículos preenchidos e vazios, segundo OECD (2007, p. 37). Isso pode surgir em decorrência da forma como a peça foi cortada, sem, no entanto, indicar a ocorrência de processo histopatológico (Figura 35).

**Figura 35** – Cortes longitudinais da glândula tireoide. (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao lítio (LI), (C) grupo exposto ao selênio (SE) e (D) grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI), após 21 dias de exposição. Folículo (f), células foliculares (cf), cartilagem (c).

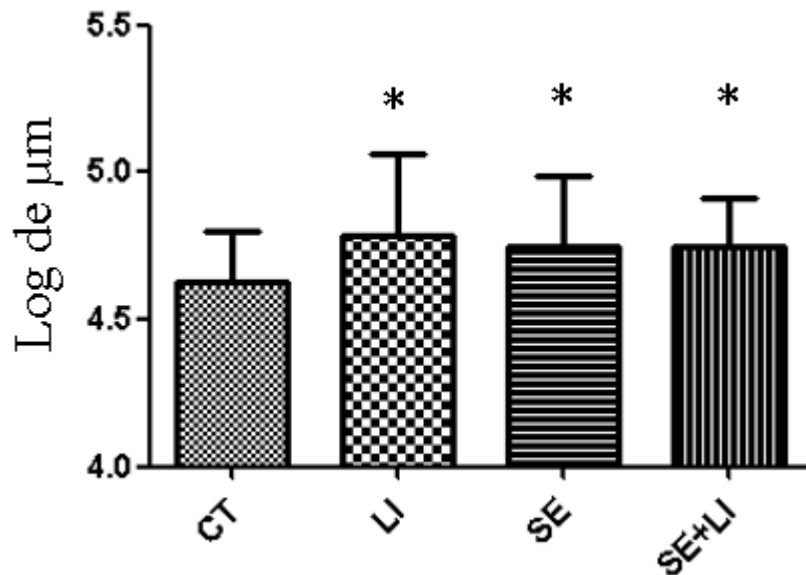


Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4.2 Análise da espessura da epiderme dorsal

A espessura da epiderme dorsal foi avaliada a fim de se comparar se haveria diferenças entre os grupos CT e os grupos expostos. Assim, para o grupo CT a espessura da camada epiderme do dorso após 21 dias de exposição foi de  $45,4 \pm 16,7 \mu\text{m}$ . O grupo LI ( $75,5 \pm 60,0 \mu\text{m}$ ) mostrou um aumento de 66% na espessura ( $P < 0,05$ ); o grupo SE ( $66,0 \pm 26,4 \mu\text{m}$ ) aumentou em 45 % a espessura da epiderme dorsal ( $P < 0,05$ ) enquanto o grupo SE+LI ( $60,0 \pm 20,1 \mu\text{m}$ ) teve aumento de 32% na espessura da epiderme do dorso (Figura 36).

**Figura 36** – Espessura da epiderme dorsal dos animais expostos após 21 dias. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). O (\*) indica que houve diferença quando comparamos com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

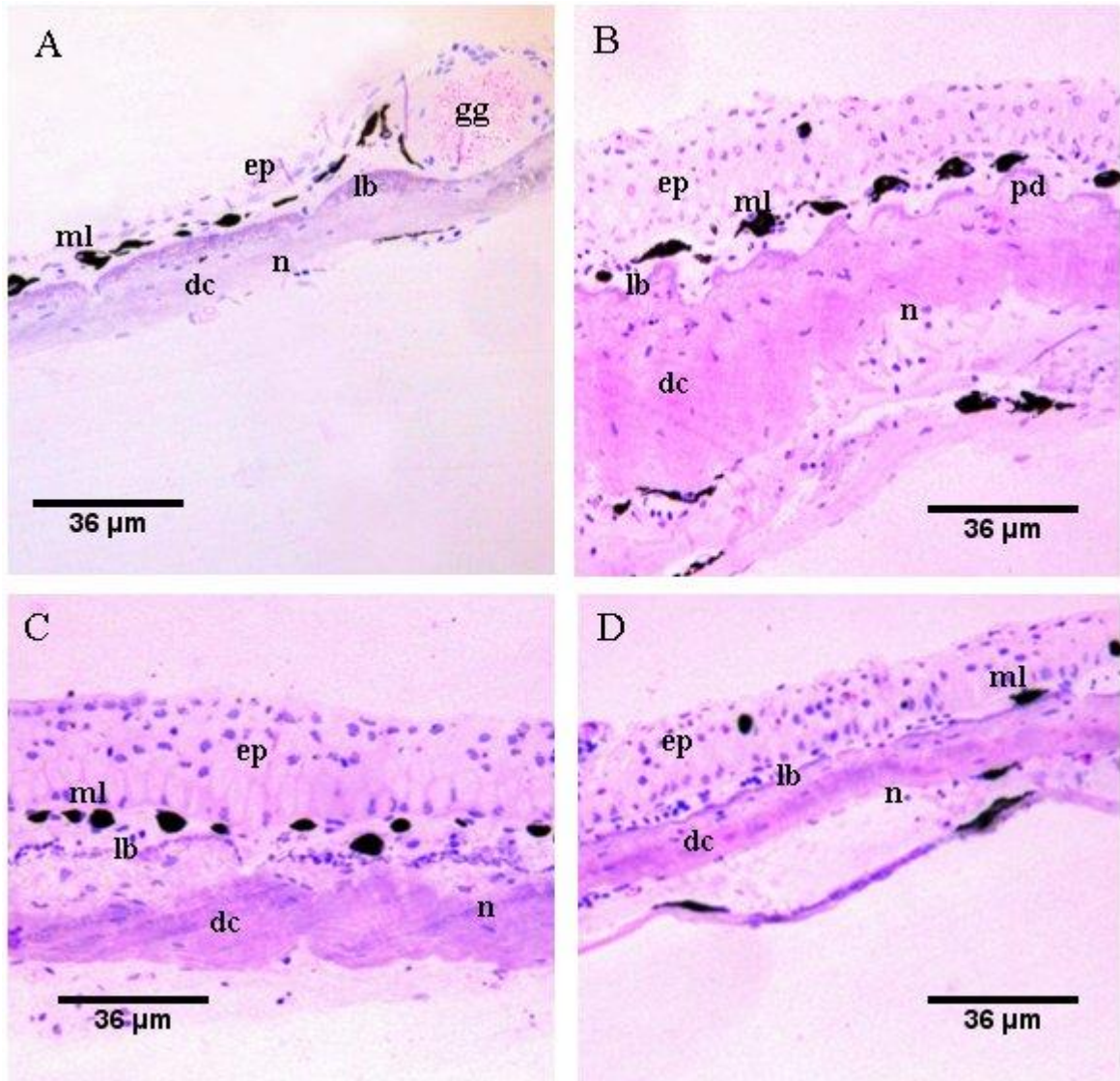


**Fonte:** Elaboração própria.

O aumento da espessura da epiderme dorsal foi marcante nos grupos expostos, a fragmentação da lâmina basal no grupo SE também é digna de nota (Figura 37). O que se nota também é uma hipertrofia somada à uma hiperplasia das células da epiderme do dorso.

**Figura 37** – Cortes longitudinais corados com Hematoxilina e Eosina (HE) da pele dorsal de *L. catesbeianus*.

(A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao lítio (LI), (C) grupo exposto ao selênio (SE) e (D) grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI) após 21 dias de exposição. Epiderme (ep), derme compacta (dc), (pd) papila dermal, glândula granular (gg), lâmina basal (lb), melanócito (ml), núcleo do fibroblasto (n).



**Fonte:** Elaboração própria.

Nas Tabelas 8 e 9 está apresentado um resumo dos resultados anteriormente mencionados, comparando os diferentes grupos expostos aos seus respectivos controles nos dias 7 e 21, respectivamente:



**Tabela 8** – Comportamento dos grupos expostos em relação ao grupo CT no dia 07. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). As setas indicam diferenças estatisticamente comprovadas (↑) aumento do parâmetro. (↓) diminuição do parâmetro ( $P < 0,05$ ). (↔) não houve diferença ( $P > 0,05$ ).

GRUPO	LI 07	SE 07	SE+LI 07
<b>BIOMARCADOR</b>			
NA	↓	↔	↓
LDH MUSCULAR	↔	↔	↓
GLICOSE HEPÁTICA	↑	↔	↑
GLICOSE MUSCULAR	↔	↑	↔
TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICO	↑	↑	↑
TRIGLICERÍDEOS MUSCULAR	↔	↔	↔
PROTEÍNA HEPÁTICA	↔	↔	↔
PROTEÍNA MUSCULAR	↔	↔	↔

**Fonte:** Elaboração própria.

**Tabela 9** – Comportamento dos grupos expostos em relação ao grupo CT no dia 21. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). As setas indicam diferenças estatisticamente comprovadas (↑) aumento do parâmetro. (↓) diminuição do parâmetro ( $P < 0,05$ ). (↔) não houve diferença ( $P > 0,05$ ).

GRUPO	LI 21	SE 21	SE+LI 21
<b>BIOMARCADOR</b>			
MORTALIDADE	10,00%	0,00%	10,00%
NA	↓	↔	↓
LDH MUSCULAR	↔	↔	↓
GLICOSE HEPÁTICA	↔	↓	↔
GLICOSE MUSCULAR	↔	↔	↔
TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICO	↑	↑	↑
TRIGLICERÍDEOS MUSCULAR	↔	↔	↔
PROTEÍNA HEPÁTICA	↔	↔	↔
PROTEÍNA MUSCULAR	↔	↔	↔
DFC	↔	↔	↔
CMPN	↔	↔	↔
ÁREA DA TIREÓIDE	↓	↓	↓
ÁREA DOS FOLÍCULOS	↓	↓	↓
Nº DE FOLÍCULOS	↓	↓	↓
ESPESSURA EPIDERME	↑	↑	↑

**Fonte:** Elaboração própria.

## 5.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES

As correlações são importantes para avaliarmos se dois biomarcadores se relacionam diretamente ou inversamente. Segundo Dancey e Reidy (2005), a intensidade de uma correlação pode ser interpretada pelo resultado de  $r$ , sendo que, resultados entre  $|0,1$  e  $0,3|$  possuem uma correlação fraca, por sua vez resultados entre  $|0,4$  e  $0,6|$  são considerados de correlação moderada e os resultados entre  $|0,7$  e  $1,0|$  são aqueles considerados como tendo uma correlação fortemente dependente um do outro. No presente trabalho consideramos dignos de nota apenas as correlações que se apresentaram como fortemente positivas, de forma que, a correlação da concentração de proteína hepática mostrou uma correlação positiva ( $r = 0,86$ ) com a concentração de proteínas no músculo da cauda para os animais do grupo SE+LI no sétimo dia, ou seja, quanto maior a concentração de proteínas no fígado também era maior a concentração de proteínas no músculo caudal dos animais expostos à combinação dos contaminantes. A correlação entre os níveis de glicose no fígado e no músculo da cauda para o grupo CT após 21 dias também mostrou uma correlação fortemente positiva, assim, quando os girinos de rãs-touro apresentavam uma concentração elevada de glicose no fígado também mostravam uma concentração elevado desse glicídio no músculo caudal ( $r = 0,77$ ). Ao correlacionarmos a glicose hepática com a LDH do músculo, vimos que no 7º. dia os animais do grupo LI mostraram uma correlação fortemente positiva ( $r = 0,72$ ), ou seja, quanto maior a quantidade de glicose no fígado, maior será a atividade da LDH no músculo (Tabela 10).

**Tabela 10** – Resumo das correlações de Pearson e Spearman obtidos através da comparação entre dados quantitativos para os biomarcadores bioquímicos. Grupo controle (CT), grupo exposto ao lítio (LI), grupo exposto ao selênio (SE) e grupo exposto ao selênio em combinação com o lítio (SE+LI). Em negrito correlações que são fortes. (\*) Dados submetidos ao teste de correlação de Spearman.

	CORRELAÇÕES							
	CT 07	CT 21	LI 07	LI 21	SE 07	SE 21	SE+LI 07	SE+LI 21
PROT. FÍG. vs PROT. MUSC.	-0,01	0,37	0,26	0,07	0,56 (*)	-0,21	<b>0,86</b>	0,54
TRIG. FÍG. vs TRIG. MUSC.	-0,12	0,25	-0,03	-0,15	0,57	0,62(*)	-0,08	0,66
GLIC. MUSC. vs GLIC. FÍG.	0,36	<b>0,77</b>	-0,09	-0,13	0,46	-0,12	0,20	0,59
GLIC.MUSC vs LDH MUSC.	-0,27	0,15	-0,05	0,19	-0,42	0,43	0,58	0,10
GLIC. FÍG vs LDH MUSC.	0,07	-0,37	<b>0,72</b>	-0,21	-0,12	0,57	0,24(*)	0,2(*)

**Fonte:** Elaboração própria.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 BIOMARCADORES DE DESENVOLVIMENTO E DE ATIVIDADE

Diversos estímulos ocorrem em um organismo que se encontra em um processo de transição para um novo modo de vida. A interação entre processos anabólicos e catabólicos, bem como a expressão e silenciamento de genes devem ser ajustados para que o animal irrompa a barreira da vida larval e adentre à vida terrestre/semi-terrestre de forma a estar apto à perpetuação de sua espécie. No presente estudo observamos alterações em parâmetros comportamentais, bioquímicos e histológicos no organismo larval que, uma vez diferente do observado para os animais do grupo controle - que expressa o padrão tido como natural - podem resultar em perturbações nas etapas subsequentes e prejuízo na sobrevivência do animal.

Em relação ao estágio de desenvolvimento, pudemos notar que os animais dos grupos expostos apresentavam características morfológicas de desenvolvimento mais adiantadas do que os animais do grupo controle, isso indica que o estresse do ambiente impactado poderia estar forçando esses animais a metamorfosearem, afim de escapar desse ambiente impróprio. A análise dos dados referentes à massa úmida total, mostrou para o grupo SE+LI uma redução significativa em comparação com o grupo CT; a diminuição da massa indica que o processo metamórfico estaria mais adiantado por motivos relacionados ao aumento da demanda energética típica do desenrolar da metamorfose (DODD; DODD, 1976, p. 500; LOMAN, 1999). Na comparação entre grupos homólogos em períodos distintos, observamos que o comprimento do membro posterior normalizado foi maior para o grupo SE+LI, o que indica um amadurecimento mais acentuado do membro posterior, apontando que tais animais estavam em fases mais adiantadas de desenvolvimento (OECD, 2008).

A exposição dos animais ao lítio, isolado e em combinação com o selênio, mostrou que a exposição ao metal alcalino diminui o nível de atividade dos girinos. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios em mamíferos (ratos) (HAFEN; WOLLNIK, 1993; SMITH, 1981; STAUNTON *et al.*, 1982) que demonstraram que o lítio tem a capacidade de diminuir o estímulo motor e a atividade espontânea dos organismos testes. O selênio não afetou esse parâmetro, tampouco protegeu os animais expostos em combinação ao lítio de reduções no nível de atividade. Nesse cenário, em que os elementos estão associados, prevaleceu o efeito negativo exercido pelo lítio sobre o NA dos girinos de rãs-touro. Esse resultado é relevante ambientalmente, uma vez que um animal que se porte de maneira letárgica pode ficar mais

susceptível à predação, bem como ter dificuldade na aquisição de alimento e na cópula, o que diminuiria sua probabilidade de sobrevivência e/ou reprodução no ambiente natural.

## 6.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Do ponto de vista bioquímico, o processo metamórfico é complexo, o organismo do animal sofre influências hormonais que impactam a mobilização ou armazenamento de carboidratos, lipídeos e proteínas (HANKE; NEUMANN 1972). Em relação ao metabolismo glicídico normal em *Rana pipens* e *L. catesbeianus* sabemos que os níveis de glicose se elevam durante a pré-metamorfose e se mantêm constantes durante a pró-metamorfose, decaindo consideravelmente nas fases próximas ao clímax metamórfico, provavelmente devido ao aumento da demanda energética neste período somada ao período em que ocorrem as mudanças no trato digestório; o que resulta em cessamento da alimentação (BILEWICZ 1938 *apud* FRIEDEN 1961, p. 25; DODD; DODD, 1976, p. 499; FARRAR, 1973; HANKE; LEIST, 1971; SMITH-GILL; CARVER, 1981, p. 506). Em relação aos níveis de lipídeos no tecido hepático, o que se sabe é que eles se mantêm constantes e altos durante a pró-metamorfose, provavelmente devido a diminuição da atividade das lipases neste período (FRIEDEN, 1961, p. 20) e decaem nas proximidades do clímax, por motivos similares ao comportamento visto para os glicídios (DODD; DODD, 1976, p. 499; RYUZAKI; OONUKI, 1990; SAWANT; VARUTE 1972; WRIGHT *et al.*, 2011). Escassos são os estudos que mostram as concentrações de lipídeos no músculo caudal. Em relação ao metabolismo proteico no fígado, sabemos que as concentrações desse composto nitrogenado se mantêm inalterados durante os períodos de pré e pró-metamorfose; contudo, em estágios mais avançados ocorre um aumento expressivo no metabolismo proteico no tecido hepático, isso se deve ao fato de que se inicia a expressão de enzimas do ciclo da ureia, a fim de preparar o animal para a transição entre o amoniotelismo para o ureotelismo (SMITH-GILL; CARVER, 1981, p. 506). Em relação ao metabolismo proteico do tecido muscular caudal, o que a literatura nos mostra é que as mudanças relativas às concentrações de proteínas no músculo da cauda ocorrem principalmente nos estágios mais avançados da pró-metamorfose e clímax (estágios posteriores ao 41 G), quando ocorrem justamente as mudanças estruturais relativas aos processos de absorção deste tecido (ATKINSON, 1981, p. 415 – 443; LITTLE *et al.*, 1973). Os resultados do presente trabalho mostraram que os níveis de proteínas não foram alterados nos tecidos muscular caudal e hepático em nenhum dos cenários testados, o



que parece se confirmar aos estudos prévios já que nossos animais se mantiveram nos estágios iniciais do processo metamórfico.

Vários autores relacionam o lítio (BOSCH *et al.*, 1986; JUNG *et al.*, 2017; ROSSETI, 1989; TABATA *et al.*, 1994; VENDSBORG; VILSTRUP, 1975) e o selênio com o metabolismo glicídico (mamíferos e anfíbios) (EZAKI, 1990; IIZUKA, 1992; JABLONSKA, 2016; PINTO *et al.*, 2011; XUAC *et al.*, 2011) de forma que ambos elementos aumentam a captação e armazenamento de glicose nos tecidos musculares esqueléticos e hepáticos. A mobilização de glicose muscular mostrou variação positiva apenas no grupo exposto a 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de selênio no primeiro período, enquanto que nos períodos subsequentes não houve alterações comparados ao controle. O motivo dessa mobilização aguda da glicose para o músculo da cauda parece se relacionar com processos de defesa que visam a saída do animal do ambiente impactado. Uma diminuição na quantidade de glicose hepática foi vista no segundo período de exposição nos animais expostos ao selênio sem, contudo, alterar os níveis de glicose muscular no período respectivo. No fígado, diferentemente do tecido muscular, foi observado um aumento dos níveis de glicose nos animais expostos ao lítio e ao selênio combinado ao lítio, mostrando que os efeitos do lítio se sobrepõem aos do selênio no que concerne ao nível de mobilização da glicose hepática. Uma vez que há uma redução do nível de atividade dos animais quando expostos ao lítio e ao selênio combinado ao lítio, eles ficaram incapazes de ativar o mecanismo de fuga do local contaminado; por isso, a estratégia de sobrevivência pareceu se concentrar nos processos de desintoxicação hepática.

Em relação ao metabolismo lipídico, o tecido muscular caudal parece não sofrer influências da exposição ao lítio e ao selênio isolados ou associados; por outro lado, o tecido hepático parece ser sensível à exposição a estes contaminantes, já que foi observado um aumento na concentração de triglicérides nesse tecido, independentemente do período de exposição. O lítio possui a capacidade de aumentar a captação e armazenamento de lipídeos pelo tecido hepático (mamíferos e anfíbios) (BOSCH *et al.*, 1986; VENDSBORG; VILSTRUP, 1975; VIJAIMOHAN *et al.*, 2010). Porém, resultados relativos à influência do selênio são deficientes em relação ao metabolismo lipídico do fígado. O comportamento desse biomarcador se enquadra no descrito para *L. catesbeianus* em estágio pró-metamórfico (DODD; DODD 1976, p. 501), o que nos leva a supor que, apesar de os animais apresentarem caracteres externos de desenvolvimento equivalentes àqueles para animais pré-metamórficos, bioquimicamente os espécimes expostos aos contaminantes já se comportavam como animais pró-metamórficos, considerando que biomarcadores bioquímicos podem responder mais precocemente que os

fisiológicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008), esse metabolismo acelerado em relação ao desenvolvimento pode significar a estratégia de fugir do ambiente impactado.

Os dados para a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) também confirmam esse efeito indutor da metamorfose que a exposição aos contaminantes combinados mostrou exercer sobre os organismos testados, uma vez que, no presente estudo foi observada uma redução da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) para os animais do grupo SE+LI em ambos os períodos, esse achado é corroborado por trabalhos prévios como de Kim *et al.* (1965) que mostraram (através de uma metodologia similar a utilizada no presente trabalho) que na cauda da rã-touro a atividade da LDH diminuía conforme se desenrolava o processo metamórfico, esse mesmo comportamento foi observado por Degroot e Cohen (1962) para a atividade de LDH hepática de rã-touro. Outros autores também descrevem reduções na maioria das enzimas glicolíticas no músculo da cauda de *Xenopus laevis* durante o desdobramento do processo de metamorfose (MARTY; WEBER, 1968 *apud* FRIEDEN; JUST, 1970, p. 26).

### 6.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

A histologia da glândula tireoide é um importante biomarcador para a avaliação dos efeitos de toxicantes sobre o eixo HHT (COADY *et al.*, 2010; GRIM *et al.*, 2009; OECD, 2008; OPITZ, 2005; OPTIZ 2006). Outros biomarcadores como DFC, CMPN, mortalidade e nível de atividade, quando em consonância com os achados histológicos/histopatológicos da glândula, nos dão suporte para a distinção entre efeitos de toxicidade generalizada e efeitos específicos sobre o eixo HHT (GRIM *et al.*, 2009). No presente estudo, os biomarcadores histológicos da glândula tireoide concordam com os achados de Coady *et al.* (2010) para substâncias que têm a capacidade de acelerar o processo metamórfico. Esse comportamento, associado aos biomarcadores morfométricos (considerados de suporte), bem como os bioquímicos, nos mostram que a exposição a concentrações de LI (2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e SE (0,01 mg.L<sup>-1</sup>), isolados e combinados, apesar de serem consideradas seguras pelo CONAMA, podem exercer efeitos diretos sobre o eixo HHT, efeitos estes que culminam no aceleração do processo metamórfico, podendo gerar consequências negativas na relação entre ambiente e espécie.

Sabemos que no decorrer do desenvolvimento do animal em direção à vida terrestre/semiterrestre, a pele deve sofrer mudanças que incluem o aumento da espessura da

epiderme a fim de proteger o animal contra danos mecânicos, bem como para evitar a perda de água para o ambiente (LINDER *et al.*, 2010, p. 105); contudo, este biomarcador, além de indicar o avanço na corrida à nova fase de vida dos animais, também pode ser utilizado como um parâmetro de ecotoxicidade (BUENO-GUIMARÃES *et al.*, 2001; RISSOLI *et al.*, 2016), uma vez que esta delicada estrutura está diretamente em contato com o ambiente impactado, sendo assim passível de gerar uma resposta que compreenda hipertrofia e hiperplasia da camada epiderme, objetivando evitar a difusão dos toxicantes provindos do meio externo como forma de preservar o meio interno dos animais (BUENO-GUIMARÃES *et al.*, 2001; RISSOLI *et al.*, 2016). O presente trabalho mostrou que para todos os grupos expostos ocorreu aumento significativo da camada epiderme da pele dorsal, o que indica toxicidade do meio de exposição e de certa forma também nos dá suporte ao afirmar que os animais foram induzidos à estágios mais avançados da metamorfose, haja vista que o espessamento da epiderme também é um sinal de amadurecimento.

Os resultados aqui obtidos mostram que quando os animais estão submetidos à ambientes expostos com concentrações de lítio e selênio – isolados e combinados – consideradas ambientalmente seguras pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), tendem a ativar mecanismos relacionados a uma resposta de estresse, direcionando suas respostas fisiológicas para o abreviamento da vida aquática como forma de abandonar o ambiente impactado pelos toxicantes. Isso ocorre porque, diferentemente dos mamíferos, o principal hormônio hipotalâmico responsável pela liberação de hormônio tireotrófico (TSH) (que conseqüentemente irá estimular a tireoide a produzir T3 e T4) não é o hormônio liberador de tireotrofinas (TRH) e sim o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) (BONETT *et al.*, 2010; DENVER, 1993; DENVER *et al.*, 2002, p. 469 – 500; DENVER, 2009; KLOAS; LUTZ, 2006), por sua vez o CRH além de estimular a liberação de TSH também estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ambos pela hipófise, resultando no estímulo à produção de HT pela tireoide somado à indução de síntese de corticosteroides pelas glândulas inter-renais (DENVER, 2009). A ação desses dois hormônios é sinérgica (HAYES, 1995), tendo em vista que vários autores sugerem que a corticosterona possui a capacidade de elevar a biodisponibilidade de HT (BONETT *et al.*, 2010; DENVER, 2009; FRIEDEN; NAILE, 1955; GALTON, 1990; HAYES, 1995; JAFFE, 1981) desempenhando um dos papéis centrais no desdobramento do processo metamórfico. Essa sinergia ligada aos hormônios corticosteroides é importante, uma vez que a habilidade em responder ao estresse de um ambiente impactado é

importante para que o animal que se encontra incapaz de fugir do meio aquático poluído possa tentar a sobrevivência em outro tipo de terreno.

Contudo, alterações no período considerado ótimo para que os anfíbios se submetam às mudanças metamórficas podem implicar em consequências diversas nos animais juvenis e adultos. De forma que, sabemos que a abreviação da metamorfose pode resultar em animais menores quando adultos, com aptidão reduzida à reprodução e à caça (DENVER, 2002, p. 469; HAYES, 1997; KLOAS; LUTZ, 2006; LOMAN, 1999; MÁRQUEZ-GARCÍA *et al.*, 2009), bem como com sistema imunológico deprimido (GERVASI; FOUFOPOULOS, 2008). Por outro lado, o alongamento do período metamórfico pode aumentar a pressão dos predadores (KLOAS; LUTZ, 2006). Esses fatores considerados por uma ótica de longo prazo podem indicar que ocorrerão impactos que põem em risco a sobrevivência da espécie, o que em seguida pode resultar em declínios em nível de população.

## 7. CONCLUSÕES

O modelo experimental adotado se mostrou adequado para a análise de biomarcadores em períodos diferentes. Isso nos permitiu analisar a capacidade de adaptação dos animais quando expostos durante 21 dias ao lítio ( $2,5 \text{ mg. L}^{-1}$ ) e selênio ( $0,01 \text{ mg, L}^{-1}$ ), de forma isolada e combinada. Ambos os contaminantes induziram mudanças nos seguintes parâmetros: mortalidade, comprimento do membro posterior normalizado, massa úmida, nível de atividade, parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético e histológicos relacionados ao desenvolvimento e ecotoxicidade. Essas mudanças podem causar interferências no processo metamórfico de forma a resultar em prejuízos às populações de anfíbios, o que levariam a distúrbios no equilíbrio ambiental. Dessa forma, é imprescindível que as atuais recomendações do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para as concentrações consideradas seguras de selênio e lítio para as águas de classe I e II sejam revisadas, basta ver que podem impactar negativamente a metamorfose de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, N. *et al.* Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. **Journal of Applied Toxicology**, [S.L], v. 16, n. 5, p. 397-400, out, 1996.
- ALROY, J. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112 (42):13003-13008. doi:10.1073/pnas.1508681112, 2015.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Med. Vet. Assoc.**, v. 218, pp. 669-696, 2001.
- AMPHIBIAWEB. Worldwide Amphibian Declines: What is the scope of the problem, what are the causes, and what can be done? Disponível em: <https://amphibiaweb.org/declines/declines.html>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2019.
- ATKINSON, B.G. Chapter 12: Biological Basis of Tissue Regression and Synthesis. *In:* GILBERT, L. L; FRIEDEN, E. Metamorphosis, a problem in developmental biology. 2 Ed. New York and London.1981. p.415 – 443.
- BEEBEE, T.J.C.; GRIFFITHS, R.A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Biol. Conserv.**, v. 125, n. 3, p. 271– 285, 2005.
- BENFORD, D.J. *et al.* Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. **ATLA Altern. to Lab. Anim**, [S.L], v. 28, p. 119–131, jan, 2000.
- BERGMAYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. **Verlag. Chemie.**, Weinheim, Germany, 1974.
- BLAISE, C.; GAGNÉ, F. Bioassays and biomarkers, two pillars of ecotoxicology: past, present and prospective uses. **Fresenius Environ. Bull**, [S.L], v. 18, p. 135–139, jan., 2009.
- BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; BURGEOT, T. Three simple biomarkers useful in conducting water quality assessments with bivalve mollusks. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Canada, mai., 2016.
- BOAS, M.; FELDT-RASMUSSEN, U.; MAIN, K.M. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S.L], v. 355, n. 2, p. 240-248, mai., 2012.
- BOEVING, A. *et al.* O uso de carbonato de lítio no tratamento da tireotoxicose induzida por amiodarona. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 991-995, dez., 2005.
- BOLONG, N. *et al.* A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, [S.L], v. 239, p. 229-246, abr., 2009.
- BONETT, R. M.; HOOPFER, E. D.; DENVER, R. J. Molecular mechanisms of corticosteroid synergy with thyroid hormone during tadpoles metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, [S.L], v. 168, p. 209-219., mar., 2010.

BOSCH, F. *et al.* Effects of lithium ions on glycogen synthase and phosphorylase in rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 261. No. 36, Issue of December 25, pp. 16927-16931, 1986.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72: p. 248-254, 1976.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 20 out. 2018, 2005.

BROWN, D. D.; Cai, L. Amphibian Metamorphosis. **Dev. Biol.**, [S.L], v. 306, n. 1, p. 20-33, jun., 2007.

BROWN, D.D. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. **Thyroid**, [S.L], v. 15, n. 8, p. 815–821, ago., 2005.

BRUCKER-DAVIS, F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. **Thyroid**, Washington, DC., v. 8, p. 827–856, set., 1998.

BRUNTON, L. *et al.* Goodman e Gilman: Manual de farmacologia e terapêutica. 12 ed. Porto Alegre: **AMGH**, 1219 p., 2010. p. 299.

BUENO-GUIMARÃES, H. M. *et al.* Tadpole epithelium test: potential use of histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. **B Environ. Contam. Tox.**, 67, 0202e0209. DOI: 10.1007/s00128-001-0111-1, 2001.

BURGGREN, W.W.; WARBURTON, S. Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology. **ILAR J.**, [S.L], v. 48, n. 3, p. 260-269., jan., 2007.

BUSS, D.F.; BAPTISTA, F.D.; NESSIMAN, J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 465-473, mar./abr., 2003.

CAI, L.; BROWN, D.D. expression of type ii iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*. **Dev. Biol.**, [S.L], v. 266, p. 87–95, jan., 2004.

CARVALHO, C.S. *et al.* Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environmental Pollution**, [S.L], v. 221, p. 445-452, fev., 2017.

CHASIN, A. A. M.; PEDROZO, M.F.M. O Estudo da Toxicologia. In: AZEDVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. As Bases Toxicológicas Da Ecotoxicologia. 1 ed. São Carlos: **Intertox**, 340 p., 2003. p 1– 25.

COADY, K. *et al.* Evaluation of the amphibian metamorphosis assay: exposure to the goitrogen methimazole and the endogenous thyroid hormone l-thyroxine. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 29, No. 4, pp. 869–880, 2010.

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

COSTA, M. J. *et al.* Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Braz. J. Biol.**, [S.L], v. 75, n. 4, p. 163-168, nov., 2015.

COSTA, M. J. *et al.* Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original. **Ecotoxicology**, [S.L], v. 13, n. 3, p. 153-163, apr., 2008.

CUI, J. *et al.* Correlation between oxidative stress and l-type calcium channel expression in the ventricular myocardia of selenium-deficient mice. **J. Int. Med. Res.**,40(5):1677-87. 2012.

DAL-MEDICO, S. E. *et al.* Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L], v. 104, p. 168–174, jun., 2014.

DANCEY, C.; REIDY, J. Estatística sem matemática para psicologia: Usando SPSS para Windows. Porto Alegre, **Artmed**. 2006.

DEGITZ, S. J. *et al.* Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. **Toxicological Sciences**, [S.L], v. 87, n. 2, p. 353–364, out., 2005.

DEGROOT, N.; COHEN, P. Studies on dehydrogenase activities during amphibian metamorphosis. **Biochim. Biophys. Acta**, 59 (1962) 588-594. 1962.

DENVER, J. Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. **Gen Comp Endocrinol.**, Jul;91(1):38-51. 1993.

DENVER, R. J.; GLENNEMEIER, K. A.; BOORSE, G. C. Endocrinology of complex life cycles: amphibians: *In* PFAFF., D.W.; ARNALD, A.P.; ETGEN, A.M.; FAHRBACH, S.E.; RUBIN, R.T. Hormones, brain and behavior. 1 ed. San Diego: **Elsevier**. 2002. p. 469 – 500.

DENVER, R. J. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. **General and Comparative Endocrinology**, 164 (2009) 20–31. 2009.

DICKSON R. C.; TOMLINSON R. H. Selenium in blood and human tissues. **Clinica Chimica Acta**, 1967;16(2):311–321. 1967.

DODD, M. H. I.; DODD, J. M. The biology of metamorphosis. *In*: Lofts, B., Ed., **Physiology of the Amphibia**, Vol. 3, Academic Press, New York, 1976. p. 499 – 503.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. Biology of amphibians. **John Hopkins Paperbacks** (Ed.). 670 p, 1994.

DUNTAS L. H.; MANTZOU E.; KOUTRAS D. A. Effects of a six-month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. **European Journal of Endocrinology**,148(4):389–393. 2003.



DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine Apr.**, 48(3):756-75. 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Pesquisa Investe em Rã, desenvolve produtos, manual e cria rede de cooperação. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/2773050/pesquisa-investe-em-ra-desenvolve-produtos-manual-e-cria-rede-de-cooperacao>. Acesso em: 23 de julho de 2018, 2015.

ETKIN, W. Metamorphosis-activating system of the frog: thyroid hormone feedback matures the neurosecretory mechanism, coordinates the phases of metamorphosis. **Science**, New York, v. 139, p. 810-814, mar., 1963.

EZAKI O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. **J. Biol. Chem.**, 265: 1124-1130. 1990.

FARRAR, E. S. Comparison of blood glucose and liver glycogen of larval and adult frogs (*Rana pipiens*). **General and Comparative Endocrinology** 21, 513-516, 1973.

FÉRARD, J-F. Ecotoxicology: Historical overview and perspectives. In: FÉRARD, J-F., BLAISE, C. **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**, p. 378-383. 2013, DOI 10.1007/978-94-007-5704-2, 2013. p. 379.

FRAKER, S.L; SMITH, G.R. direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles. **Environ. Toxicol.**, 19, 250–256. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20017>, 2004.

FRANCO-BELUSSI, L. *et al.* Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, [S.L], v. 219, p. 1378-1383, fev., 2016.

FRANKENFELD, T. G. *et al.* Thyroid and pituitary thyroxine-5'-deiodinase activity and thyrotrophin secretion in lithium-treated rats. **J. Endocrinol.**, [S.L], v. 174, n. 2, p. 331-334, ago., 2002.

FRIEDEN, E.; NAILE, B. Biochemistry of amphibian metamorphosis: i. Enhancement of induced metamorphosis by gluco-corticoids. **Science**, [S.L], v. 121, n. 3132, p. 37-39, jan., 1955.

FRIEDEN, E.; JUST, J.J. Hormonal responses in amphibian metamorphosis, Chapter 1. In: LITWACK, G. Biochemical Actions of Hormones. Vol 01. **Academic Press**, New York. USA., 566p. 1970.p. 20 – 36.

FRIEDEN, E. Biochemical adaptation and anuran metamorphosis. **Am. Zoologist.**, 1:115-149, 1961.

FROST, D. R. *et al.* The Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 297, p. 257-291, 2006.

FURLOW, D. J.; NEFF, E. S. A Developmental Switch Induced by Thyroid Hormone: *Xenopus laevis* Metamorphosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S.L], v. 7, n. 2, p. 40-47, mar. 2006.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, [S.L], v. 64, p. 329–336, jul., 2006.

GALTON, V. A. Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. **Endocrinology**, [S.L], v. 127, p. 2997–3002, dez., 1990.

GARTNER R. *et al.* Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 87(4):1687–1691. doi: 10.1210/jcem.87.4.8421. 2002.

GERMAIN, D. L. S. Regulatory effect of lithium on thyroxine metabolism in murine neural and anterior pituitary tissue. **Endocrinology**, [S.L], v. 120, n. 4, p. 1430-1438, abr., 1987.

GERVASI, S.; S.; FOUFOPOULOS, J. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. **Functional Ecology**, 22, 100–108. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2007.01340.x, 2008.

GIUSTI, C. F. *et al.* Endocrine disturbances related to the use of lithium. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S.L], v. 56, n. 3, p. 153-158, abr., 2012.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**. Vol. 16, No. 3 (Sep. 23, 1960), pp. 183-190, 1960.

GREŃ, I. Microbial transformation of xenobiotics. **Chemik**, [S.L], v. 66, n. 8, p. 835-842, jan., 2012.

GRIM, K.C. *et al.* Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances. **Toxicologic Pathology**, 37: 415-424, 2009.

GRUBER, P. M. *et al* Global lithium availability a constraint for electric vehicles? **Journal of Industrial Ecology**, [S.L], v. 15, n. 5, p. 760–775, jul., 2011.

HACON, S. S. Biomarcadores e o processo de avaliação do risco ambiental: *In*: DE AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. 1 ed. São Carlos: **Intertox**, 340 p.2003. p 265 – 273.

HADDAD, C. F. B. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção: *In*: MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G.M., PAGLIA, A.P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1 ed. Brasília: Fundação Biodiversitas, 1420 p. 2008. p. 287.

HAFEN, T.; WOLLNIK, F. Effect of lithium carbonate on activity level and circadian period in different strains of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Vol. 49, No. 4, pp. 975-983, 1993.

HAMMOND, S. A.; VELDHORN, N.; HELBING, C. C. Influence of temperature on thyroid hormone signaling and endocrine disruptor action in *Rana (Lithobates) catesbeiana* tadpoles. **General and Comparative Endocrinology**, [S.L], v. 1, n. 219, p. 6-15, ago. 2015.

HANKE, W.; LEIST, K. H. The effect of ACTH and corticosteroids on carbohydrate metabolism during metamorphosis Of *Xenopus laevis*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 16, 137-148. 1971.

HANKE, W.; NEUMANN, U. Carbohydrate metabolism in amphibia. **General and Comparative Endocrinology Supplement**, 3, 198-208, 1972.

HAYES, T. B. Interdependence of corticosterone-hormones and thyroid-hormones in larval toads (*Bufo boreas*) .1. Thyroid hormone-dependent and hormone-independent effects of corticosterone on growth and development. **J. Exp. Zool.**, [S.L], v. 271, n. 2, p. 95–102, fev., 1995.

HAYES, T. B. *et al.* The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, 213(6):921-933. doi:10.1242/jeb.040865, 2010.

HELBING, C.C. The metamorphosis of amphibian toxicogenomics. **Frontiers in Genetics**, [S.L], v. 3, n. 37, p. 1-6, mar., 2012.

HELBING, C.C.; OVASKA, K.; JI, J. Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, [S.L], v. 80, n. 1, p. 42-51, out., 2006.

HENDERSON, R. F. *et al.* The Use of Biological Markers in Toxicology. **Crit. Rev. Toxicol.**, [S.L], v. 20, n. 2, p. 65–82, jan., 1989.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, [S.L], v. 10, n. 3, p. 327–341, jul., 2014.

HUANG, P-C. *et al.* Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. **Human Reproduction**, [S.L], v. 22, n. 10, p. 2715–2722, out., 2007.

IIZUKA, Y.; SAKURAI, E.; HIKICHI, N. Effects of selenium on the serum glucose and insulin levels in diabetic rats. **Folia Pharmacologica Japonica**, [01 Aug 1992, 100(2):151-156], 1992.

JABLONSKA, E. *et al.* The effect of selenium supplementation on glucose homeostasis and the expression of genes related to glucose metabolism. **Nutrients**. Published online 2016 Dec 13. doi: [10.3390/nu8120772], 2016.

JAFFE, R.C. Plasma concentration of corticosterone during *Rana catesbeiana* tadpole metamorphosis. **Gen. Comp. Endocrinol.**, [S.L], v. 44, n. 3, p. 314–318, jul., 1981.

JANZ, D.M. *et al.* Selenium Toxicity to Aquatic Organisms. *In*: CHAPMAN, P M, *et al.* Ecological Assessment of Selenium in The Aquatic Environment. Pensacola FL (USA): **Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**. CRC PRESS. ISBN 9781439826775, 2010. p. 22.

JAYATILAKA, A.D.P. An ultrastructural study of the thyroid gland in the pre-metamorphic *Xenopus laevis* (Daudin) tadpole. **J. Anat.**, Vol 125, 3, 579-591. 1978.

- JOHNSON, F. N. The history of lithium therapy. 1 ed. London: Palgrave Macmillan UK, 215 p. 1984.
- JUNG, S. *et al.* Effect of lithium on the mechanism of glucose transport in skeletal muscles. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, 63 365-371. 2017.
- KIEŁCZYKOWSKA, M. *et al.* The study of possible application of sodium selenite as an adjuvant in lithium treatment: an effect on oxidative processes in heart of rats. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**,19: 3947-3954. 2015a.
- KIEŁCZYKOWSKA, M. *et al.* The protective influence of selenium on oxidant disturbances in brain of rats exposed to lithium. **Physiol. Res.**, 64(5):739-46. Epub 2015 Mar, 24. 2015b.
- KIM, H. C.; PAIK, W. K. The activity of lactate dehydrogenase isozymes during thyroxine-induced tadpole metamorphosis. **Canadian Journal of Biochemistry**, Volume 44 1966.
- KJØLHOLT, J. *et al.* The Elements in the Second Rank, an Environmental Problem Now or in the Future? **Environmental Project**, Denmark, n. 770, p. 1-106, jan. 2003.
- KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. **J. Chromatogr.**, [S.L], v. 1130, n. 1, p. 16-27, out., 2006.
- KUSHCHAYEVA, Y. *et al.* Repositioning therapy for thyroid cancer: new insights on established medications. **Endocrine-Related Cancer**, 21, R183–R194. 2014.
- LANCTOT, C. M. *et al.* Bioaccumulation and biodistribution of selenium in metamorphosing tadpoles. **Environ. Sci. Technol.**, [S.L], v. 51, n. 10, p. 5764-5773, mai., 2017.
- LEI, C. *et al.* Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. **Clin. Chim. Acta**, Jan; 399(1-2):102-8. 2009.
- LI, G.; WANG, F.; KANG, D.; LI, C. Keshan Disease: An Endemic Cardiomyopathy in China. **Human, Pathology**, Vol 16 N.06. 602-609.1985.
- LIDE, D, R. Handbook of chemistry and physics, Internet Version 2005, <http://www.hbcnpnetbase.com>, **CRC Press**, Boca Raton, FL, 2005.
- LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C.A. A Tecnologia Na Criação De Rãs. 1 ed. Viçosa: **editora Folha de Viçosa** Ltda. 1992. p. 15.
- LINDER, G. *et al.* Physiological ecology of amphibians and reptiles: *In*: SPARLING, D.W.; *et al.* Ecotoxicology of Amphibians And Reptiles. 2 ed. Florida. USA: **Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**, 2010. p. 105.
- LITTLE, G. H.; ATKINSON, B. G.; FRIEDEN, E. Changes in the rates of protein synthesis and degradation in the tail of *Rana catesbeiana* tadpoles during normal metamorphosis. **Developmental Biology**, 30, 366-373. 1973.
- LIU, J.; GOYER, R.A.; WAALKES, M.P. Efeitos Tóxicos Dos Metais: *In*: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. 2 ed. Porto Alegre: **AMGH**, 2012. p. 325.

LOMAN, J. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: An experimental demonstration. **Amphibia-Reptilia**, 20: 421-430, 1999.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAHER, W. *et al.* Environmental sources, speciation, and, partitioning of selenium. *In*: CHAPMAN, P. M. *et al.* Ecological Assessment of Selenium in The Aquatic Environment. Pensacola FL (USA): **Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**. CRC PRESS. ISBN 9781439826775, 2010. p. 47.

MAMIYA, K. *et al.* Lithium concentration correlates with QTC in patients with psychosis. **J. Electrocardiol.**, Apr., 38(2):148-51. 2005.

MARANHO, L. A. *et al.* *In situ* evaluation of wastewater discharges and the bioavailability of contaminants to marine biota. **Sci. Total Environ.**, [S.L], v. 538, p. 876–887, dez. 2015.

MARKOU, K. *et al.* Iodine-induced hypothyroidism. **Thyroid**, [S.L], v. 11, n. 5, p. 501-510, mai., 2001.

MÁRQUEZ-GARCÍA, M., *et al.* Effects of Pond Drying on Morphological And Life-History Traits In The Anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). **Evolutionary Ecology Research**, 11: 803–815, 2009.

MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. The Tadpole Arena: *In*: MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. Tadpoles, The Biology of Anuran Larvae. 1 ed. [S.L.]: **University of Chicago Press**, 458 p. 1999.

MELTZER, H. Agentes Antipsicóticos e Lítio: *In*: Katzung, B.G.; Masters S.B; Trevor A.J. Farmacologia Básica e Clínica. 12 ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, 1228 p. 2014. p. 501–505.

MIYATA, K.; KEIKO, O. Thyroid hormone-disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. **J. Toxicol. Pathol.**, [S.L], v. 25, n. 1, p. 1-9, mar. 2012.

MOHANDAS, E.; RAJMOHAN, V. Lithium use in special populations. **Indian J. Psychiatry**, 49(3): 211–218. 2007.

MOHR, S. T.; MUDD, G. M.; GIURCO, D. Lithium resources and production: critical assessment and global projections. **Minerals**. [S.L], v. 2, n. 1, p. 65-84. 2012.

MOORE, M. N. *et al.* An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, **Mutat. Res.** [S.L], v. 552, n. 1, p. 247-268, ago. 2004.

NIKINMAA, M. Interaction between chemicals. *In*: NIKINMAA, M. An introduction to Aquatic Toxicology. USA: **Academic Press, Elsevier**. DOI: 10.1016/B978-0-12-411574-3.00013-X. 2014. p. 160.

NOGUEIRA, F. L. *et al.* Efeito do cádmio no fígado de girinos de rã-touro. **Rev. Elet. Cient., UERGS**, [S.L], v. 3, n. 2, p. 447-471, jan., 2017.

NORRIS, D. O. Evolution of endocrine regulation of metamorphosis in lower-vertebrates. **Am. Zool.**, [S.L], p. 709-718, jan., 1983.

NRC. Biological markers in environmental health research. Committee on biological markers of the national research council. **Environ. Health Perspect**, [S.L], v. 74, p. 3-9, out., 1987.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. **Chemosphere**, 57 1581–1589. 2004.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. *In: Series on Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications*, Paris, France. 2007. p. 37.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: The Amphibian Metamorphosis Assay. **AMA draft Test Guideline version**, [S.L], nov., 2008.

OHLENDORF, H. M. Ecotoxicology of Selenium. *In: HOFFMAN, D.J; RATTNER, B.A; BURTON JR, G. A; CAIRNS JR, J. HANDBOOK OF ECOTOXICOLOGY. CRC PRESS*, 1312 p, 2002. p. 470.

OLIVEIRA, C. R. *et al.* Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, [S.L], v. 149, p. 304-313, abr. 2016.

OLIVIERI, O. *et al.* Low selenium status in the elderly influences Thyroid Hormones. **Clinical Science**, 89, 637-642. 1995.

OPITZ, R. *et al.* Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds. **Environ Toxicol Chem**. 2005 Mar;24(3):653-64. 2005.

OPITZ, R. *et al.* Expression of sodium-iodide symporter mRNA in the thyroid gland of *Xenopus laevis* tadpoles: Developmental expression, effects of antithyroidal compounds, and regulation by TSH. **J Endocrinol**. Jul;190(1):157-70. 2006

OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBIA, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, [S.L], v. 65, n. 3, p. 486-497, out. 2013.

OSTER, O.; PRELLWITS, W. Selenium and cardiovascular disease. **Biol. Trace Elem. Res.** Feb;24(2):91-103. 1990.

PAPPAS, A.C. *et al.* Selenoproteins and Maternal Nutrition. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.**, 151(4):361-72. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.08.009. 2008.

PEDROZO, M. F.; KUNO, R. Contaminantes da água e solo: *In: OGA, S., CAMARGO, M. M.de A., BATISTUZZO, J.A.de O. Fundamentos de Toxicologia*. 3 eds. São Paulo: **Atheneu**, 2008. p. 199.

- PETTERSON, A.D.; GONZALEZ, F.J.; IDLE, J.R. Xenobiotic Metabolism – A View through the metabolometer. **Chem. Res. Toxicol.**, [S.L], v. 23, n. 5, p. 851–860, mai., 2010.
- PINTO, A. *et al.* Delaying of insulin signal transduction in skeletal muscle cells by selenium compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 105 (2011) 812–820. 10.1016/j.jinorgbio.2011.03.010, 2011.
- POWELL, R.; INCHÁUSTEGUI, S.J. conservation of the herpetofauna of the Dominican Republic. **Applied Herpetology**, 6: 103–122, 2009.
- REGARDS, E.; TAUROG, A.; NAKASHIMA, T. Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles and in adult anuran amphibia. **Endocrinology**, [S.L], v. 102, n. 3, p. 674-684, mar. 1978.
- RISSOLI, R. Z. *et al.* Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® And Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, 156 (2016) 37e44. 2016.
- RODRIGUES, C. Ap. G. Áreas Potenciais Para A Criação De Rã-Touro Gigante *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) na região Sudeste do Brasil / RODRIGUES, C. AP. G.; *et al.* – Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 38 p.: il. (Embrapa Monitoramento por Satélite. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 12). ISSN 1806-3322, 2010.
- ROSSETI, L. Normalization of insulin sensitivity with lithium in diabetic rats. **Diabetes**, VOL. 38, MAY 1989.
- ROTRUCK, J. T. *et al.* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, ;179(4073):588-90. 1973.
- RUGIERO, G. M.; ROSA, M.A.; MELLO, M. F. Mecanismo de ação do lítio: o papel do fosfatidil inositol. **Rev Neuropsiq. Da Infancia e Adolescência**, 2(3):34-41. 1994.
- RYUZAKI, M.; OONUKEI, M. Changes in lipidic composition in the tail of *Rana catesbeiana* larvae during metamorphosis. **Zoological Science** 7: 409-417, 1990.
- SALLA, R. F. *et al.* Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **J. Exp. Zool.**, [S.L], v. 323, n. 7, p. 487–496, ago. 2015.
- SALLA, R. F. *et al.* Impact of an environmental relevant concentration of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, [S.L], v. 144, p. 1862-1868, fev. 2016.
- SANTOS, L. H. *et al.* Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **J. Hazard Mater**, [S.L], v. 175, n. 1, p. 45-95, mar., 2010.
- SANTOS, L. R. S. *et al.* Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Anat Rec (Hoboken)**, [S.L], v. 297, n. 5, p. 864-875, mai., 2014.
- SAWANT, V.A.; VARUTE, A.T. lipid changes in the tadpoles of *Rana tigrina* during growth and metamorphosis. **Comp. Biochem. Physiol.**, 1973, Vol. 44B, pp. 729 to 750, 1972.

- SCHOMBURG, L. *et al.* Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. **Endocrinology**, 2006;147(3):1306–1313. doi: 10.1210/en.2005-1089, 2006.
- SCHULTE, P.; MAZZUCKELLI, L.F. validation of biological markers for quantitative risk assessment. **Environ. Health Perspect.**, [S.L], v. 90, p. 239-246, jan., 1991.
- SCIENCES, B.; ROAD, Y. Relationships among developmental stage, metamorphic timing, and concentrations of elements in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Environ. Toxicol. Chem.**, [S.L], v. 22, n. 7, p. 1597-1604, jul., 2003.
- SMITH, D. F. Central and peripheral effects of lithium on amphetamine-induced hyperactivity in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, Vol 14, pp 439-442, 1981.
- SMITH-GILL, S. J; CARVER, V. Chapter 15: Biochemical Characterization of Organ Differentiation and Maturation. *In*: GILBERT, L. L; FRIEDEN, E. Metamorphosis, a problem in developmental biology. 2 Ed. New York and London. 1981. p. 506.
- SODHI, N. S. *et al.* Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. **Plos One**, 3(2): e1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>, 2008.
- STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Ann. Rev. Biochem**, 49: 93-110. 1980.
- STATISTA. Total global consumption of lithium from 2008 to 2016 (in metric tons of lithium carbonate equivalent). Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/451999/global-total-consumption-of-lithium/>. Acesso em: 31 de outubro de 2018.
- STAUNTON, D. A. *et al.* Effects of chronic lithium treatment on dopamine receptors in the rat corpus striatum. I. Locomotor activity and behavioral supersensitivity. **Brain Research**, 232 (1982) 391—400. DOI 10.1016/0006-8993(82)90282-7, 1982.
- STEINMAUS, C. *et al.* Combined effects of perchlorate, thiocyanate, and iodine on thyroid function in the national health and nutrition examination survey. **Environmental Research.**, [S.L], v. 123, p. 17-24, mar. 2013.
- TABATA, I. *et al.* Lithium increases susceptibility of muscle glucose transport to stimulation by various agents. **Diabetes**, VOL. 43, JULY 1994.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-173. DOI: 10.1016/0147-6513(77)90033-1, 1977.
- U.S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries (USGS) 2016: Lithium. Reston, VA, USA: U.S. Geological Survey, U.S. Geological. Mineral commodity summaries 2016: lithium: **Geological Survey**, 2016 ed. Virginia: USA, 202, p 2016.
- U.S. Geological Survey (USGS). Mineral Commodity Summaries 2018: U.S. **Geological Survey**, 200p., <https://doi.org/10.3133/70194932>, 2018. ed. Virginia: USA, 202, p 2018.
- VAN DER OOST, R. *et al.* Review Article Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, [S.L], v. 13, n. 2, p. 57-149, fev. 2003.

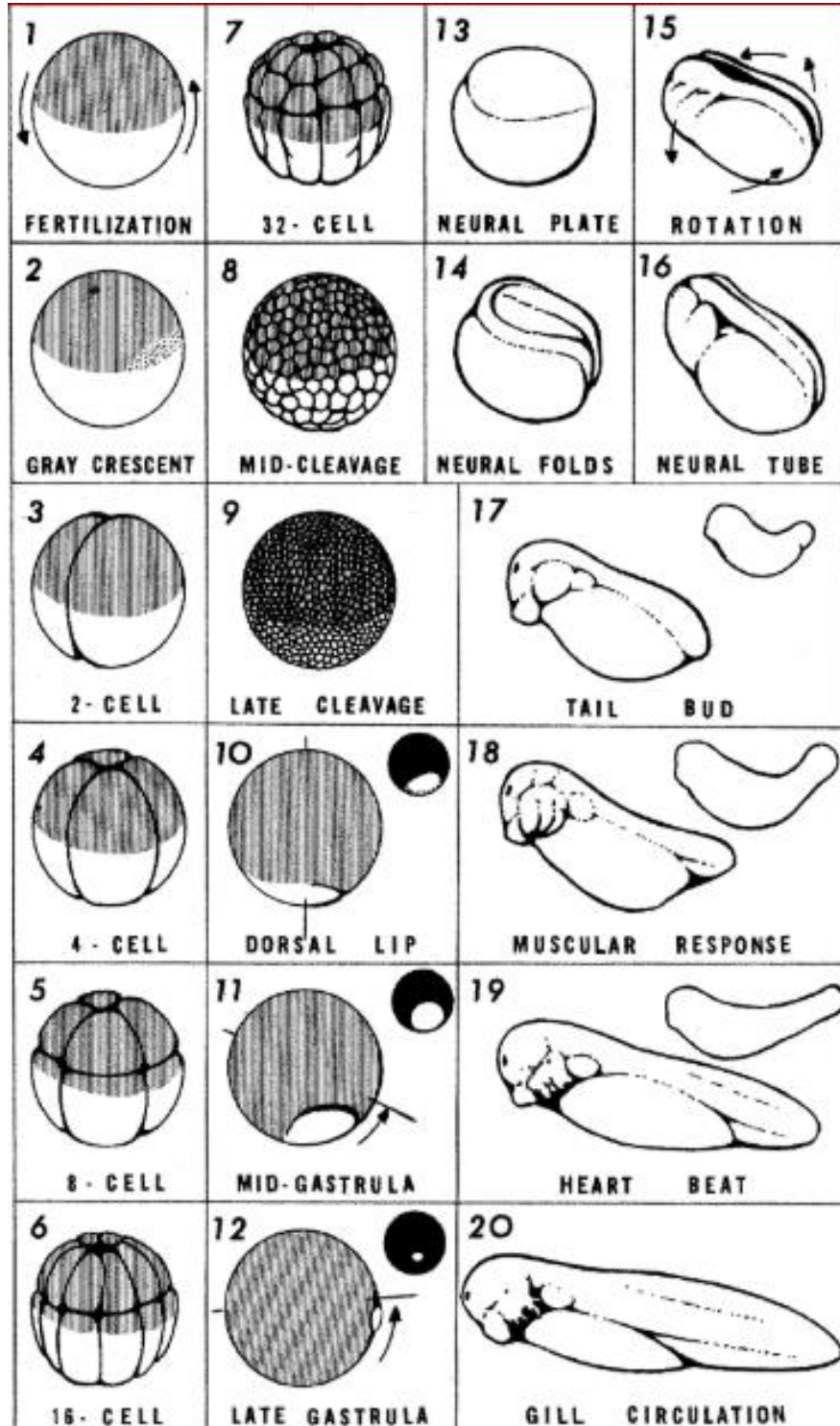


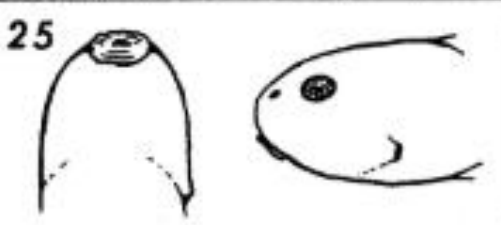
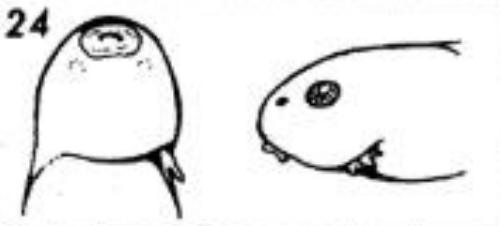
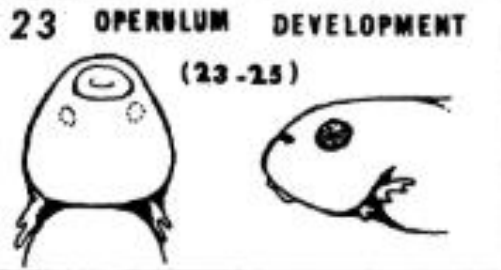
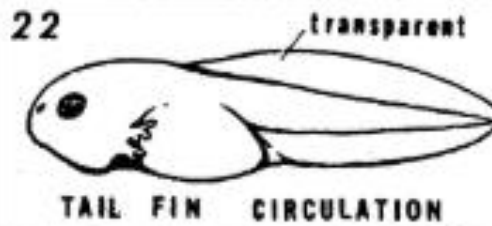
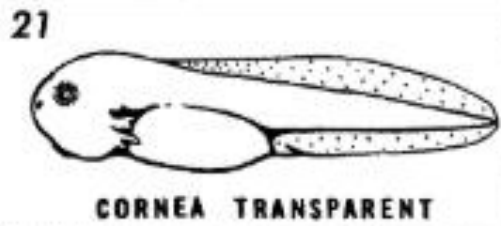
- VENDSBORG, P. B.; VILSTRUP, H. The influence of lithium on carbohydrate and lipid metabolism in the perfused rat liver. **Acta pharmacol. et toxicol.**, 1976,38, 10-16. 1976.
- VENTURINO, A. *et al.* Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, [S.L], v. 8, n. 3, p. 167-186, mai/ago. 2003.
- VERONEZ, A. C. S. *et al.* Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology** 174 (2016) 101–108. 2016.
- VIEIRA, M. I. Capítulo V, Algumas Características da Rã Touro. *In*: VIEIRA, M. I. Rã Touro Gigante. Características e Reprodução. 4ª edição. São Paulo, 1993. p. 17 – 19.
- VIJAIMOHAN, K.; MALLIKA, J.; SHYAMALA, D.C. chemoprotective effect of sobatum against lithium-induced oxidative damage in rats. **J. Young. Pharm.**, 2(1):68-73. doi: 10.4103/0975-1483.62217. 2010.
- WERNER, I; HITZFELD, B. 50 years of ecotoxicology since silent spring- A Review. **GAIA** 21/3 (2012): 217-224. DOI: 10.14512/gaia.21.3.13, 2012.
- WISNIAK, J. Jöns Jacob Berzelius: a guide to the perplexed chemist. **Chem. Educator**, 5, 343-350. 2000.
- WRIGHT, M. L.; RICHARDSON, S. E.; BIGOS, J. M. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 160 (2011) 498–503, 2011.
- XUAC, Y. T.-J. *et al.* Effect of insulin in combination with selenium on blood glucose and PI3K-Mediated GLUT4 expression in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.**; 15: 387-393, 2011.
- YANG, G.; WANG, S.; ZHOU, R.; SUN, S. Endemic selenium intoxication of human in China. **The American Journal of Clinical Nutrition** 37: 872-881. 1983.
- YAOITA, Y.; BROWN, D. D. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. **Genes Dev.**, [S.L], v. 4, n. 11, p. 1917-1924., nov., 1990.
- YOUNG, T. F. *et al.* What you need to know about selenium. *In*: CHAPMAN, P. M, *et al.* Ecological assessment of selenium in the aquatic environment. Pensacola FL (USA): **Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**. CRC PRESS. ISBN 9781439826775, 2010. p. 7 – 16.
- MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. *In*: ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, A. Ecotoxicologia Aquática: Princípios de Aplicações. São Paulo: editora **Rima**. 478 p, 2006.
- ZHANG, F. *et al.* Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors. **Aquat. Toxicol.**, [S.L], v76, p 24–36. 2006.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSON, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of sweden. **Sci. Total Environ.**, [S.L], v. 407, n. 8, p. 2760-2770, abr., 2009.

## ANEXO 1

Tabela de Gosner (1960). Estágios de desenvolvimento do 1 ao 46 para categorização de girinos anuros.





LIMB BUD (26-30)

$\text{length} : \text{diameter}$

