



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA REGIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E MEIO AMBIENTE - PRODEMA



ESPÉCIES DE LAGARTOS COMO BIOINDICADORAS DE
QUALIDADE AMBIENTAL

Jadna Maria Silva

2020
Natal – RN
Brasil

JADNA MARIA SILVA

**ESPÉCIES DE LAGARTOS COMO BIOINDICADORAS DE
QUALIDADE AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Eliza Maria Xavier Freire**

Co-orientador: **Prof. Dr. Julio Alejandro Navoni**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Silva, Jadna Maria.

Espécies de lagartos como bioindicadoras de qualidade ambiental / Jadna Maria Silva. - Natal, 2020.

74 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação de Desenvolvimento e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Eliza Maria Xavier Freire.

Coorientador: Prof. Dr. Julio Alejandro Navoni.

1. Organismos biomonitores - Dissertação. 2. Lagartos - Dissertação. 3. Contaminantes ambientais - Dissertação. 4. Radiação natural - Dissertação. I. Freire, Eliza Maria Xavier. II. Navoni, Julio Alejandro. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 502/504

JADNA MARIA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA/UFRN), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Eliza Maria Xavier Freire
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Orientadora)

Prof. Dr. Miguel Fernandes Kolodiuk
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (Membro externo)

Prof(a). Dr(a). Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Membro interno)

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação tem como título “**Espécies de lagartos como bioindicadores de qualidade Ambiental**” e, conforme padronização aprovada pelo colegiado do PRODEMA, se encontra composta por uma Introdução geral (embasamento teórico e revisão bibliográfica do conjunto da temática abordada, incluindo a identificação do problema de pesquisa), caracterização geral da área de estudo, metodologia geral empregada para o conjunto da obra, e por dois Capítulos (“Lagartos como organismos modelo para avaliar contaminação e biomonitoramento ambiental (Lizards as model organisms to evaluate environmental contamination and biomonitoring – ARTIGO SUBMETIDO); e “Uso da espécie de lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 como bioindicador de mutagenicidade em região de radioatividade natural”, artigo em submetido). Os capítulos/artigos estão no formato do periódico ao qual está ou será submetido; os endereços dos sites onde constam as normas dos periódicos estão destacados em cada capítulo/artigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pelo apoio durante toda a minha formação acadêmica e pelas oportunidades oferecidas, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliza Maria Xavier Freire, por todas as experiências e aprendizados compartilhados ao longo dos seis anos de convivência no LabHerpeto, desde minha iniciação científica, e por todo o carinho que dedica a todos os filhos da ciência. Ao meu coorientador Prof. Dr. Júlio Alejandro Navoni, por todos os ensinamentos compartilhados durante a elaboração desta Dissertação de Mestrado.

À Profa. Dra. Viviane Amaral por toda colaboração e apoio, extensivos à sua orientanda Luiza Xavier, do Laboratório Genética Toxicológica, por todos os ensinamentos que compartilhou comigo; você me ensinou quase tudo que sei hoje sobre micronúcleo e mutagenicidade, além das experiências de vida compartilhadas. A Cris, por toda amizade nesses cinco anos e também pela ajuda essencial durante trabalhos em campo.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia Raul, Jaqueline, Jaqueiuto, Mikaelle, Bruno, Thawaan, André, Olyana, Daniel e Letícia, pelo apoio, pelas ajudas em campo e pelos ótimos momentos compartilhados nessa trajetória. Em especial a Thawaan e André, que me ajudaram além do campo, com planilhas e longas horas de trabalho em todo o processamento dos dados; a amizade e momentos de descontração proporcionados por vocês foram imprescindíveis e inesquecíveis.

À melhor turma do PRODEMA: Adlany, Alesi, Amanda, Ana Lúcia, Beatriz, Cláudia, Jéssica, Laiz, Maria Júlia, Márcio, Vinícius e Welson; todos vocês foram maravilhosos, a união esteve presente em toda a nossa caminhada nesses dois anos de mestrado! Vou sentir muito a falta de todos vocês, com amor. Aos doutorandos que também integravam a nossa turma e são pessoas incríveis, Adjuto, Aline, Cristiane, Daniel e Úrsula. Aos secretários e parceiros, David e Érica, por serem muito prestativos e facilitarem nossa vida acadêmica.

Aos meus pais Júlio e Vitória, que me apoiaram, me ouviram e me ajudaram nas fases mais complicadas desse processo, em especial o meu pai que até para o campo piloto foi comigo e estava sempre ali para apoiar em qualquer decisão que tomasse; vocês são muito

importantes para mim. Ao meu irmão Marcos e minha amiga, quase irmã, Mariana, pelo apoio e pelos momentos de descontração; você também foi importante nesse processo. A minha sogra Irani pelos bons conselhos e por toda a serenidade que me passou durante essa experiência; você é uma segunda mãe para mim.

Ao meu noivo Hudson que foi essencial, me apoiou e me ajudou muito nos momentos de crise e desespero; estava sempre me colocando pra cima quando eu não estava bem, por segurar as pontas nos momentos de estresse (foram muitos), sem você eu não teria conseguido.

Muito obrigada a todos vocês.

RESUMO DA DISSERTAÇÃO

Em nível mundial, é notável e crescente a preocupação com a contaminação do meio ambiente, tendo em vista que com os avanços tecnológicos mais poluentes são lançados na natureza, a exemplo dos agrotóxicos e lixo eletrônico. Além disso, atividades antrópicas podem potencializar poluidores naturais, como a radiação natural e metais pesados retirados nas mineradoras. Partindo desses fatos, o biomonitoramento tem sido uma ferramenta bastante útil para avaliação de agentes tóxicos no ambiente. Através de monitoramentos ambientais, especialmente utilizando organismos bioindicadores, é possível identificar áreas prioritárias que se encontram mais contaminadas ou que apresentam fatores naturais preocupantes como é o caso da radiação natural, e assim direcionar os esforços e estudos para recuperar áreas e amenizar os impactos no ecossistema. Nessa perspectiva, este estudo teve como objetivos efetuar revisão de literatura acerca do uso de espécies de lagartos como organismos modelo para avaliar contaminação ambiental, e testar uma espécie de lagarto endêmica e saxícola de área de Caatinga do nordeste brasileiro como bioindicadora de efeitos genotóxicos resultantes de contaminação por radioisótopos e outros poluentes naturais. Foi realizado trabalho em campo para coleta de espécimes do lagarto *Phyllopezus periosus*, no período de dezembro de 2018 a julho de 2019, em três áreas com diferentes níveis de radiação natural, quais sejam, uma área natural protegida – a ESEC Seridó, uma área com atividade mineradora - a Mina Brejuí, e área do município de Lajes Pintadas, com alta incidência de radiação. Em todos os locais onde os lagartos foram coletados também foram coletados dados ambientais, tais como, amostras de água dos afloramentos e radiação gama presente no ar. Todos os lagartos coletados, após anestesia, sob refrigeração, foram coletadas amostras de sangue e realizado teste de micronúcleos. Durante o trabalho de revisão foram encontrados estudos com dez famílias de lagartos, utilizando contaminantes orgânicos e inorgânicos, tendo sido constatado que a maioria dos contaminantes testados são tóxicos para os animais, causando efeitos histopatológicos, estresse oxidativo e danos ao DNA. Nosso estudo de campo constatou diferença estatisticamente significativa tanto para micronúcleos quanto para alterações nucleares, destacando blebs, núcleo amebóide, núcleo em ferradura e entre outras até então não identificadas anteriormente. Quando as alterações nucleares foram comparadas entre as localidades, as áreas mais significativas foram a Mina Brejuí e Lajes Pintadas. Constatou-se, portanto, que os lagartos respondem bem às alterações ambientais, fato que os destaca como relevantes organismos biomonitoradores, pois são sensíveis a diversos tipos de contaminantes ambientais incluindo a radiação natural.

PALAVRAS-CHAVE: Organismos biomonitoradores, Lagartos, Contaminantes ambientais, radiação natural.

ABSTRACT

At the global level, concern about the contamination of the environment is notable and growing, considering that with the most polluting technological advances, nature is launched, like pesticides and electronic waste. In addition, human activities can enhance natural polluters, such as natural radiation and heavy metals removed from mining companies. Based on these facts, biomonitoring has been a very useful tool for the evaluation of toxic agents in the environment. Through environmental monitoring, especially using bioindicator organisms, it is possible to identify priority areas that are more contaminated or that present worrying natural factors such as the case of natural radiation, and thus direct efforts and studies to recover areas and mitigate impacts on the ecosystem. . In this perspective, this study aimed to review the world literature on the use of lizard species as model organisms to evaluate environmental contamination, and to test a species of endemic and saxicolous lizard in the Caatinga area of northeastern Brazil as a biomonitor of resulting genotoxic effects contamination by radioisotopes and other natural pollutants. Field work was carried out to collect specimens of the lizard *Phyllopezus periosus*, from December 2018 to July 2019, in three areas with different levels of natural radiation, namely a protected natural area - ESEC Seridó, an area with mining activity - the Brejuí Mine, and the area of the municipality of Lajes Pintadas, with a high incidence of radiation. In all lizard specimens found, after anesthesia under refrigeration, blood samples were collected and micronucleus tests were performed; environmental data were also collected, such as outcrop water samples and gamma radiation present in the air. During the review work, studies were found with ten families of lizards, using organic and inorganic contaminants, and it was found that most of the contaminants tested are toxic to animals, causing histopathological effects, oxidative stress and DNA damage. Our field study found a statistically significant difference for both micronuclei and nuclear alterations, including a wide variety of nuclear abnormalities, hitherto not previously identified. When nuclear changes were compared between locations, the most significant areas were Mina Brejuí and Lajes Pintadas. It was found, therefore, that lizards respond well to environmental changes, a fact that highlights them as relevant biomonitor organisms, as they are sensitive to several types of environmental contaminants including natural radiation.

KEYWORDS: Biomonitor organisms, Lizards, Environmental contaminants, natural radiation.

LISTA DE FIGURAS

CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ÁREA DE ESTUDO

Figura 1: Decaimento natural do Urânio (238) 14

Figura 2: Decaimento natural do Urânio (238) com o tempo de meia vida de cada elemento. 14

CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ÁREA DE ESTUDO

Figura 3: Localização das áreas de estudo no Estado do Rio Grande do Norte: Municípios de Lajes Pintadas, Currais Novos (Mina Brejuí), e Serra Negra do Norte (ESEC Seridó)..... 23

Figura 4: Áreas de estudo na estação seca (A) ESEC Seridó, município de Serra Negra do Norte/RN; (B) Município de Lajes Pintadas/RN; (C) Mina Brejuí, município de Currais Novos/RN 23

METODOLOGIA GERAL

Figura 5: Espécime do lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 sobre afloramento rochoso no município de João Câmara..... 26

CAPÍTULO 2: Uso da espécie de lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 como bioindicador de mutagenicidade em região de radioatividade natural no semiárido brasileiro

Figura 1: Localização das áreas de estudo no Estado do Rio Grande do Norte: Municípios de Lajes Pintadas, Currais Novos (Mina Brejuí), e de Serra Negra do Norte (ESEC Seridó)..... 54

Figura 2: Alterações nucleares em espécimes de *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 descritos nessa pesquisa. (A) Micronúcleo; (B) Blebs; (C) Núcleo ameboide; (D) Broto e bleb; (E) Broto em gancho e blebs; (F) Broto e bleb; (G) Núcleo fusionado; (H) Broto e outra alteração..... 58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Lagartos como organismos modelo para avaliar Contaminação e Biomonitoramento Ambiental (Lizards as model organisms to evaluate Environmental Contamination and Biomonitoring)

Tabela 1: Número de estudos por família de lagartos que avaliaram a contaminação ambiental nos últimos 10 anos	30
Tabela 2: Compostos orgânicos estudados nas espécies de lagartos e seus efeitos	32
Tabela 3: Compostos inorgânicos estudados nas espécies de lagartos e seus efeitos	42

CAPÍTULO 2: Uso da espécie de lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 como bioindicador de mutagenicidade em região de radioatividade natural no semiárido brasileiro

Tabela 1: Concentração de metais em amostras de água (mg/L) coletadas nas três áreas de estudo, no período de maio a julho de 2019.	55
Tabela 2: Média da espectrometria da radiação Gama (U, Th, K), na área onde os animais foram coletados, divididas por área de coleta no período de dezembro de 2018 a fevereiro de 2019	56
Tabela 3: Média e erro padrão de micronúcleos (MN) e alterações nucleares em eritrócitos de lagartos da espécie <i>P. periosus</i> , discriminados por área de estudo.	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. O radônio e seus efeitos nos organismos vivos	15
1.2. Mutagenicidade e genotoxicidade	15
1.3. Biomonitoramento, uma ferramenta para a avaliação de risco	16
1.4. Biomonitores e biomarcadores	17
2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ÁREA DE ESTUDO	20
2.1. ESEC Seridó, Serra Negra do Norte/RN	20
2.2. Lajes Pintadas/RN	21
2.3. Mina Brejuí, Currais Novos/RN	22
3. METODOLOGIA GERAL	25
3.1. Análise do conhecimento atual	25
3.2. Procedimentos metodológicos	25
3.2.1. Amostragem ambiental	25
3.2.2. Amostragem biológica	25
3.2.3. Teste de micronúcleo (MN) e ensaio de anormalidades nucleares (AN).....	26
3.2.4. Análises estatísticas.....	27
<u>CAPÍTULO 1: Lagartos como organismos modelo para avaliar Contaminação e Biomonitoramento Ambiental</u> (Lizards as model organisms to evaluate Environmental Contamination and Biomonitoring)	28
Abstract.....	28
Introdução.....	28
Material e métodos	29
Resultados e discussão	30
Conclusão	46
Referências	46

<u>CAPÍTULO 2:</u> Uso da espécie de lagarto <i>Phyllopezus periosus</i> Rodrigues, 1986 como bioindicador de mutagenicidade em região de radioatividade natural.....	51
Resumo	51
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e métodos	53
Resultados.....	55
Discussão	59
Conclusão	61
Agradecimentos.....	61
Referências	61
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO.....	66
4. REFERÊNCIAS DA PARTE INTRODUTÓRIA DA DISSERTAÇÃO	67

1. INTRODUÇÃO GERAL

As substâncias radioativas encontradas no ambiente se originam ou resultam de diferentes fontes e processos, podendo ser cosmogênica, antrópica e/ou natural (UNSCEAR, 2010). Dentre as fontes de radiação que incidem anualmente sobre a população mundial, 19% correspondem a processos artificiais enquanto 81% são equivalentes a fontes naturais. Desses 81% que representam a radiação de fontes naturais, 55% são derivadas do radônio (Rn) (IPEN, 2002).

Ambientes isolados e de difícil acesso são considerados, mundialmente, menos afetados pela poluição gerada pelo homem, entretanto sofrem com as mudanças climáticas da mesma forma (ALVALÁ et al., 2017; BYAKATONDA et al., 2018). Esse fato poderia ser atribuído ao semiárido brasileiro, mas essa região apresenta particularidades que a definem como área única para estudos relacionados à qualidade ambiental. Entre esses aspectos destacam-se o fato de o semiárido ser um importante reservatório de minerais, em particular de radioisótopos como urânio (U), tório (Th) e potássio (^{40}K), se adaptar para enfrentar escassez hídrica, a qual influencia a dinâmica de disseminação de tóxicos, e ser foco de atividade de mineração, constituindo, portanto, fontes minerais ricas em metais tóxicos e radioisótopos, os quais são redistribuídos nos diferentes compartimentos ambientais (MCINTYRE, 2012; TORREZANI e OLIVEIRA, 2013; CHAVES et al., 2016).

No que concerne às fontes de radiação predominantes no semiárido brasileiro, especificamente no estado do Rio Grande do Norte (RN) onde a Caatinga predomina em cerca de 70% do território, podem ser destacados afloramentos rochosos pegmatitos e graníticos constituídos de ionizantes naturais, incluindo urânio, tório e rádio (Ra). Durante o processo natural de decaimento destes elementos resultam subprodutos tóxicos para o ambiente, tais como, o gás radônio (Rn), polônio (Po) e chumbo (Pb) (MALANCA et al., 1998; UNSCEAR, 2010; PETTA e CAMPOS, 2013; CHAVES et al., 2016). Esse decaimento natural dos núcleos atômicos instáveis em busca de atingir a estabilidade realizada por determinados átomos, que libera energia em forma de partículas radioativas, é chamada de radioatividade (Figura 1). Nesse processo, os átomos instáveis e radioativos liberam energia, a radiação ionizante, que se divide em três principais formas, alfa (α), beta (β) e gama (γ) (IPEN, 2002; OKUNO; YOSHIMURA, 2016). A radiação ionizante do tipo gama é formada por ondas eletromagnéticas, com alto poder de penetração quando em contato com os organismos vivos, sendo a mesma amplamente utilizada na medicina; já as radiações alfa e beta, são partículas eletricamente carregadas e possuem massa atômica. Uma característica das partículas alfa é que apresentam massa e carga maior que as outras, portanto tem menor poder de penetração,

não apresentando perigo à saúde humana quando originadas fora do corpo; contudo, se forem introduzidas ao corpo, seja por ingestão ou inalação, provoca diversos danos, bem como dá início a processos mutagênicos e carcinogênicos (IPEN, 2002; PETTA e CAMPOS, 2013; OKUNO; YOSHIMURA, 2016).

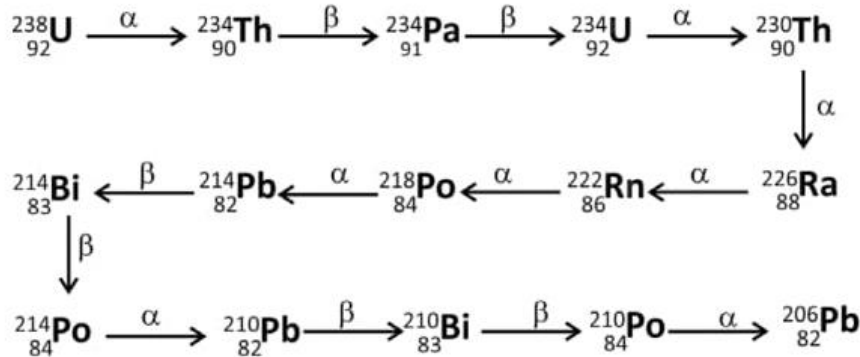


Figura 1 – Decaimento natural do Urânio (238).

Entre os subprodutos tóxicos anteriormente citados, destaca-se o radônio, pertencente à classe dos gases nobres, que é incolor, inodoro e insípido, produzido pelo decaimento dos radionuclídeos de ocorrência natural (National Center for Biotechnology Information, 2019). O isótopo do radônio (^{222}Rn) tem meia vida de 3,8 dias (Figura 2), é derivado do rádio originado pelo urânio e consiste no isótopo mais perigoso à saúde humana por ter mais tempo disponível no ambiente sendo ele um gás, o que aumenta os riscos de contaminação (PETTA e CAMPOS, 2013; National Center for Biotechnology Information, 2019).

Elemento	Meia-vida, $t_{1/2}$	Tipo de radiação emitida
^{238}U (urânio, $z = 92$)	4,5 bilhões de anos	
^{234}Th (tório, $z = 90$)	24,1 dias	α
^{234}Pa (protactínio, $z = 91$)	1,17 min	β
^{234}U (urânio, $z = 92$)	245 mil anos	β
^{230}Th (tório, $z = 90$)	8 mil anos	α
^{226}Ra (rádio, $z = 88$)	1620 anos	α
^{222}Rn (radônio, $z = 86$)	3,8 dias	α
^{218}Po (polônio, $z = 84$)	3,1 min	α
^{214}Pb (chumbo, $z = 82$)	26,8 min	α
^{214}Bi (bismuto, $z = 83$)	19,7 min	β
^{214}Po (polônio, $z = 84$)	0,2 ms	β
^{210}Pb (chumbo, $z = 82$)	22,3 anos	α
^{210}Bi (bismuto, $z = 83$)	5,0 dias	β
^{210}Po (polônio, $z = 84$)	138,4 dias	α
^{206}Pb (chumbo, $z = 82$)	ESTÁVEL	

Figura 2 – Decaimento natural do Urânio (238) com o tempo de meia vida de cada elemento. (Imagem: Conselho regional de química – IV região).

1.1. O radônio e seus efeitos nos organismos vivos

Por se tratar de um gás, o radônio tende a escapar das rochas através de fissuras, se dispersando facilmente pelo ambiente, e acaba contaminando reservatórios de água, solos, ar e até habitações humanas próximas a essas formações rochosas (AFONSO, 2009). Em suma, o radônio possui baixo poder de penetração, não sendo capaz de atravessar a nossa pele, entretanto, quando inalado ou ingerido, esse baixo poder de penetração torna inviável a saída desse elemento químico do corpo (PETTA e CAMPOS, 2013; National Center for Biotechnology Information, 2019). Por permanecer disperso no ambiente, esse gás tem como principal via de absorção o sistema respiratório, o que pode ocasionar danos irreversíveis à saúde das populações locais, comprometendo a homeostase celular e desencadeando efeitos genotóxicos e carcinogênicos (TAYLOR et al., 2001; BRASIL, 2005; BARILLET et al., 2011). Estudos mostram associação entre áreas com presença de radônio e elevação nos índices de ocorrência de câncer de pulmão, tendo em vista que a inalação do gás deposita substâncias radioativas nos brônquios (AFONSO, 2009; National Center for Biotechnology Information, 2019).

Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que o chumbo, um dos subprodutos liberados na cadeia de decaimento do urânio, que pode penetrar no corpo através do radônio inalado e que posteriormente decai na forma deste metal, no sangue de crianças acima de 5µg%, causa alterações no sistema nervoso, originando problemas nas funções cognitivas, distúrbios de comportamento, baixo rendimento escolar, diminuição da capacidade visual, dentre outros (VEGA et al., 2005; DASCANIO et al., 2010; MARTINEZ et al., 2013). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), e o Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos (USNTP), o radônio é um agente carcinogênico humano e a segunda maior causa de câncer, abaixo apenas do tabagismo. Nesse contexto, diante do potencial de toxicidade e do fato de que esse gás pode ser liberado por rochas e solos que contenham urânio, a contaminação através da exposição natural ao radônio é, de fato, uma preocupação mundial (SAMET, 2011).

1.2. Genotoxicidade e mutagenicidade

Componentes tóxicos provenientes do ambiente podem influenciar e desencadear alterações no DNA das células gerando um dano a esse material, que pode ser corrigido ou não, sendo denominados de genotóxicos (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Um dos agentes ambientais que geram sérios problemas a saúde humana é a radiação, sendo capaz de

promover mutações no DNA, bem como gerar ruptura dos filamentos e interferir diretamente no reparo natural do DNA (GASTALDO et al., 2008).

Por meio da interconexão da ecologia com a genética, estudos de genotoxicidade ganharam testes rápidos e eficazes para análise da influência de fatores tóxicos sobre o material genético, dentre os quais se destacam o teste cometa (TC), que avalia o dano ao DNA e os testes de avaliação da frequência de alterações cromossômicas e medição da frequência de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (NA), como brotos nucleares e núcleos deformados (BOMBAIL et al., 2001; ZAPATA et al., 2016). Esses são testes de curto prazo, sensíveis para detecção precoce de danos no cromossomo por agentes físicos e químicos, contudo, estudos utilizando-os ainda são escassos em répteis, principalmente quando se trata do teste de micronúcleo, que apresenta grande relevância, pois detecta os primeiros danos ao material genético (ZUÑIGA-GONZALEZ et al., 2001; CAPRIGLIONE et al., 2011; SCHAUMBURG et al., 2012). Cabe destacar que existe grande variação na metodologia utilizada para o teste de micronúcleo (CAPRIGLIONE et al., 2011; MCINTYRE; WHITING, 2012; SCHAUMBURG et al., 2012; MOHAMAD; KADRY, 2014; MINGO et al., 2016; ZAPATA et al., 2016).

Os micronúcleos consistem em fragmentos cromossômicos, ou cromossomos inteiros em alguns casos, que durante o processo de divisão celular não se anexam a nenhum dos fusos mitóticos, formando um pequeno núcleo. Processos clastogênicos podem induzir danos e causar a quebra cromossômica, já os aneugênicos estão relacionados à perda ou ganho de cromossomos (FENECH, 2000), gerando assim, pequenos núcleos na mesma célula. Sabe-se que a exposição de organismos a agentes tóxicos, dentre outros fatores, pode intensificar na formação desses arranjos (FENECH et al., 2011; OSSANA; SALIBIAN, 2013).

1.3. Biomonitoramento como ferramenta para a avaliação de risco

A identificação e caracterização de agentes tóxicos responsáveis por problemas ambientais e por gerar danos à saúde humana podem ser realizadas por meio de monitoramento ambiental em conjunto com outras ferramentas. Da Silva e colaboradores (2003), discutem três situações que sinalizam a necessidade de biomonitoramento: quando espécies nativas se encontram ameaçadas; quando há um consumo de organismos possivelmente afetados, implicando em risco para a saúde humana; e quando existe preocupação com a qualidade ambiental do lugar.

Para obtenção de uma visão abrangente a partir da avaliação de risco, é de grande relevância contar com biomonitoramento de todos os potenciais agentes tóxicos presentes no ambiente objeto de estudo. Para isso, a utilização de biomarcadores provenientes de

bioindicadores potenciais torna-se importante para compreensão do cenário de risco toxicológico de uma determinada região (CAPRIGLIONE et al., 2011; SCHAUMBURG et al., 2012; NASRI et al., 2017; SALVADOR et al., 2018; SARGSYANA et al., 2018). Deve-se considerar ainda outros aspectos do ambiente, visto que a contaminação por metais pesados pode se agravar em vista da escassez de recursos hídricos, o que potencializa a concentração de tais metais em afloramentos rochosos, por exemplo; por outro lado, quando ocorre o período chuvoso esses elementos são dissolvidos pela água, diminuindo sua concentração no ambiente (MARCON et al., 2010; MCINTYRE, 2012; CAMPOS et al., 2013; SARGSYANA et al., 2018).

No geral, bioindicadores adequados que sejam de ocorrência natural são considerados ferramentas de grande relevância para análise da saúde ambiental tanto de áreas degradadas como de ambientes aparentemente saudáveis. Isto porque sua aplicação possibilita a avaliação das alterações que possam estar ocorrendo nestes ambientes, bem como os prováveis efeitos para as comunidades humanas locais (PARMAR et al., 2016). De acordo com Callisto (2005), bioindicadores são espécies ou grupos biológicos que devido aos seus aspectos morfológicos e/ou ecológicos, sinalizam o nível dos impactos ambientais em um determinado ecossistema.

1.4. Biomarcadores

Para detectar e medir os efeitos biológicos causados por poluentes presentes no ambiente têm sido efetuados estudos e desenvolvimento de biomarcadores (RAMSDORF, 2007), que podem ser aplicados em diversos organismos, possibilitando avaliar, de forma prática e sensível, os possíveis efeitos gerados por agentes tóxicos (GALVAN, 2011). Biomarcadores são testes que podem ser aplicados em células, tecidos ou fluídos corporais para apontar a presença de contaminantes, em termos celulares ou bioquímicos, como por exemplo o teste cometa e o teste de micronúcleo (LIVINGSTONE, 1993; CAPRIGLIONE et al., 2011; MINGO et al., 2016; ZAPATA et al., 2016).

Diversos estudos utilizando biomarcadores no intuito de determinar a qualidade ambiental de vários lugares têm sido realizados em nível mundial nas últimas décadas (DE FLORA et al., 1993; ZENG et al., 1999; THEODORAKIS et al., 2001; BOMBAIL et al., 2001; BURGER et al., 2004; MARQUEZ-FERRANDO et al., 2009; CAPRIGLIONE et al., 2011; MCINTYRE e WHITING, 2012; ZAPATA et al., 2016; SARGSYAN et al., 2018). Dentre eles, análises enzimáticas utilizando fluídos corporais como a saliva, na avaliação de contaminação por agroquímicos como herbicidas a base de glifosato, além de diversos fungicidas (MINGO et al., 2016), bem como teste cometa e de micronúcleos utilizando sangue para avaliação mutagênica de contaminantes orgânicos (SCHAUMBURG et al.,

2016). Em adição, análises histológicas em órgãos como fígado, rins, estômago e tecido adiposo, por exemplo, têm sido utilizados para avaliar a contaminação por metais pesados, tais como, cádmio, chumbo, zinco e alumínio (MARQUEZ-FERRANDO et al., 2009; NASRI et al., 2017; SALVADOR et al., 2018).

No Brasil, a utilização de biomarcadores para detectar e medir o grau de contaminação ambiental iniciou-se no final dos anos 1990 (BAINY et al., 1999) e, desde então, vários autores vêm colaborando com um crescente número de estudos sobre qualidade ambiental e tipos de contaminantes em várias regiões do País (LEMOS et al., 2005; PORTO et al., 2005; AMADO et al., 2006; ZANETTE et al., 2006; RAMSDORF, 2007; MARCON et al., 2010; CHAVES et al., 2016; MARCON et al., 2017), bem como para padronização dos biomarcadores em espécies nativas (LEITÃO et al., 2000; DANTAS et al., 2013).

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos estudos em animais endêmicos de regiões com radioatividade natural, os quais têm demonstrado a utilidade do biomonitoramento de radioisótopos e de contaminação com metais (SAZYKINA, 2006; JOHANSEN, 2010; DANTAS et al., 2013). Nesse contexto, os répteis são as espécies mais adaptadas a ambientes extremos como os de caráter desértico, portanto, o uso destes, especialmente de lagartos, pode ser de grande utilidade para o biomonitoramento de regiões de grande aridez e sazonalidade, como a do semiárido brasileiro, particularmente a Caatinga (FREIRE et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012; MCINTYRE e WHITING, 2012).

Estudos utilizando lagartos têm sido realizados em regiões de características similares a do semiárido brasileiro, demonstrando grande utilidade para o biomonitoramento de poluentes gerados em regiões ricas em minerais (MCINTYRE; WHITING, 2012) e no estudo dos efeitos que estes poluentes geram sobre os sistemas biológicos (CABARCAS-MONTALVO, 2012; NASRI et al., 2017; SALVADOR et al., 2018; SARGSYANA et al., 2018); estes fatos os tornam modelos potenciais para estudos de monitoramento ambiental. Nessa perspectiva, estudos que utilizem espécies de lagartos endêmicas e de hábitos saxícolas na Caatinga semiárida, podem ser fundamentais para a compreensão e previsão de impactos sobre outros organismos, inclusive sobre a saúde humana. Nessa perspectiva e por atender a alguns dos pré-requisitos postos, o lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 pode ser um bom bioindicador, expressando os efeitos mutagênicos causados pela radiação natural presente nos afloramentos rochosos que estes habitam na Caatinga do Rio Grande do Norte.

Diante desse cenário, no capítulo 2 deste estudo, abordamos o biomonitoramento de uma região de Caatinga semiárida nordestina, localizada no estado do RN, que está vulnerável às condições de escassez hídrica, contaminação ambiental e consequentes fatores que atingem a saúde das comunidades locais. Portanto, o objetivo geral deste estudo é, embasado por

revisão da literatura mundial sobre lagartos como organismos modelo para avaliar contaminação ambiental, analisar qualitativa e quantitativamente a existência de padrões e efeitos genotóxicos resultantes de contaminação por radioisótopos e outros poluentes naturais, frente à escassez hídrica, utilizando o lagarto endêmico e saxícola, *P. periosus*, ocorrentes no nordeste brasileiro, sendo este estudo na Caatinga do Seridó do RN. O biomonitoramento utilizando este lagarto pode ser determinante e, portanto, a avaliação da qualidade ambiental é o foco central deste estudo.

Especificamente, pretende-se com este estudo: avaliar qualitativamente o conhecimento atual, em nível mundial, sobre o tema biomonitoramento utilizando espécies de lagartos; testar o uso do modelo de biomonitoramento proposto no estudo de contaminantes ambientais na região estudada; analisar o efeito mutagênico em amostras de sangue do lagarto *P. periosus*, decorrente da exposição aos poluentes presentes em diferentes cenários ambientais da Caatinga; subsidiar a elaboração de mapa de risco toxicológico em nível local, baseado nas informações obtidas no biomonitoramento.

2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ÁREA DE ESTUDO

O processo de avaliação de riscos utilizando o biomonitoramento foi efetuado em três regiões semiáridas do Seridó do Rio Grande do Norte (Figura 3), que apresentavam características específicas para responder às perguntas de pesquisa relacionada à qualidade ambiental e ao risco resultante da exposição a poluentes pelas comunidades locais: 1) uma Unidade de Conservação Federal (Estação Ecológica do Seridó, município de Serra Negra do Norte); 2) uma área influenciada antropicamente, mas sem atividade industrial nem de mineração (município de Lajes Pintadas; já estudada por pesquisadores/identificada radiação); e 3) uma região afetada antropicamente pela atividade de mineração (Mina Brejuí, município de Currais Novos); cada uma das quais isoladas entre si por mais de 50 km de distância. As três áreas apresentadas compartilham as condições ecológicas e ambientais para as espécies de lagartos utilizadas no estudo de biomonitoramento realizado no capítulo 2 desta dissertação.

2.1. ESEC Seridó, município de Serra Negra do Norte/RN

A Estação Ecológica do Seridó (ESEC Seridó) constitui Unidade de Conservação de Proteção Integral inserida na Caatinga do Seridó potiguar, especificamente na Ecorregião da Depressão Sertaneja Setentrional, município de Serra Negra do Norte, RN (06° 34' 36,2" S e 37° 15' 20,7" O; Figura 2-B) a 242 km de Natal, capital do estado. Esta Unidade de Conservação compreende área de 1.166,38 ha, cuja vegetação predominante é hiperxerófila de característica arbóreo-arbustiva, geralmente seca e esparsa, típico de Caatinga *stricto sensu*, além de apresentar densas herbáceas, em especial na estação chuvosa (VARELA-FREIRE, 2002; VELOSO et al., 2002). O clima nessa região é semiárido, quente e seco, apresentando um curto período chuvoso que predomina entre os meses de março a maio, enquanto a estação seca se estende nos meses de julho a dezembro ou janeiro. O solo é caracterizado como areno argiloso, sendo considerado moderadamente profundo (VARELA-FREIRE, 2002).

A fisionomia da vegetação arbórea e arbóreo-arbustiva dessa área de Caatinga é marcadamente intercalada por afloramentos rochosos; as principais áreas desses afloramentos da ESEC Seridó compreendem cerca de 8,5% da área total da Unidade de Conservação, com variação de 47 a 56.000 m² de extensão e 2 a 12m de altura (PALMEIRA, 2017).

Cabe destacar aqui que no período de 2002 a 2013, por meio do Programa Ecológico de Longa Duração (PELD/CNPq-Caatinga), foi desenvolvido nesta ESEC um amplo projeto sobre Ecologia de Comunidades de lagartos, o qual subsidia o conhecimento sobre as espécies de lagartos, especialmente sobre a que é objeto deste estudo (FREIRE et al. 2009; BARBOSA

et al. 2013; ANDRADE et al., 2013). Durante este último estudo (ANDRADE et al., 2013), no qual foi efetuado monitoramento final da fauna de lagartos desta ESEC, foram registradas quatorze espécies de lagartos, pertencentes a oito famílias (Gekkonidae, Gymnophthalmidae, Iguanidae, Phyllodactylidae, Polychrotidae, Scincidae, Teiidae, Tropiduridae); dentre estas, a espécie da família Phyllodactylidae, *Phyllopezus periosus*, foi uma das mais registradas (ANDRADE et al., 2013). *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 é endêmica do bioma Caatinga e estritamente saxícola na ESEC Seridó (ANDRADE et al., 2013; PALMEIRA, 2017).

2.2. Lajes Pintadas/RN

O município de Lajes Pintadas localiza-se na mesorregião Agreste Potiguar, microrregião da Borborema Potiguar (06° 09' 02" S e 36° 06' 22" O; Figura 2-A), a 136 km de Natal, capital do Estado, com área de aproximadamente 130 Km², caracterizada por vegetação de Caatinga hipoxerófila, apresentando arbustos e árvores com espinhos. Destacam-se aqui a catingueira, angico, baraúna, juazeiro, marmeleiro, mandacaru e aroeira (BRASIL, 2005b).

Limita-se com os municípios de São Tomé, Campo Redondo e Santa Cruz. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010), o município apresenta uma população de 4.614 habitantes. A cidade fazia parte do município vizinho, Santa Cruz, quando o Açude público foi construído no ano de 1953 - capacidade máxima de 6.000.000 m³ - com a finalidade de abastecer a comunidade que se formava e que não possuía água encanada. O abastecimento por meio deste corpo hídrico foi imprescindível para fornecer matéria prima e condições para que a comunidade de Lajes Pintadas se estabelecesse. Além disso, o Açude supriu por muitos anos a população até o momento em que a adutora Monsenhor Expedito, que hoje abastece 23 localidades da região Agreste do Estado, fosse liberada para o trecho do Trairi no ano de 2003. Nesse contexto, cabe destacar que estudo prévio realizado nessa região demonstrou que a população ainda depende do Açude de Lajes para inúmeras atividades, tais como o abastecimento de água e pesca, já que a adutora ainda não chega às casas mais próximas ao açude (DANTAS *et al.*, 2011); por meio deste mesmo estudo foi identificada associação entre o nível de radônio e efeitos na qualidade ambiental através de testes ecotoxicológicos (DANTAS, 2011).

Vale ressaltar ainda que, em estudo mais recente, têm sido descritos níveis elevados de radioatividade nessa localidade (CAMPOS et al., 2013). Outro ponto de fundamental importância é que no município de Lajes Pintadas/RN existem afloramentos rochosos com

a presença de ionizantes naturais que liberam o gás radônio e, conseqüentemente, o chumbo para o ambiente (Ministério de Minas e Energia, 2005). Além disso, outro dado peculiar é que segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2010, Lajes Pintadas/RN apresentou 415,2 casos de câncer num total de 4.614 habitantes, um número superior ao registrado na capital do estado que foi de 353,5 novos casos (806.203 habitantes). Os tipos de câncer mais comuns neste município são os de orofaringe, estômago e pulmão que, de acordo com a literatura, podem estar associados com a contaminação por radônio (SAMET, 2011). Esta alta incidência de casos de neoplasias na população de Lajes Pintadas pode estar associada à exposição à radiação natural e seus subprodutos como o radônio e os metais pesados. Os efeitos desta exposição à radiação natural são amplificados pela diminuição da disponibilidade hídrica gerada pelos processos de seca, uma vez que possibilita a concentração destes e outros produtos geogenicamente presentes no açudefe.

2.3. Município de Currais Novos, Mina Brejuí

A Mina Brejuí está localizada no município de Currais Novos, RN, situando-se especificamente na mesorregião Central Potiguar e na microrregião Seridó Oriental, inserida no Planalto da Borborema ($6^{\circ} 19' 12''$ S e $36^{\circ} 33' 06''$ O; Figura 2-C) a 195 km de Natal, capital do Estado. Esta área é contemplada por vegetação hiperxerófila arbóreo-arbustiva de caráter mais seco, com abundância de cactáceas e plantas de porte baixo; as plantas mais encontradas são, pereiro, faveleiro, facheiro, macambira, mandacaru, xique-xique e jurema-preta. O solo é arenoargilo, mas existem áreas com bastante pedregulho (BRASIL, 2005a).

A mina Brejuí é considerada a maior mina de scheelita da América do Sul que está em atividade desde a descoberta do minério em 1943. Apesar de todo esse tempo transcorrido, é possível visualizar montanhas de rejeitos minerais, que podem acarretar em risco ambiental para a região e para as mais de 200 famílias que moram no entorno da mina, associadas ao trabalho de mineração. Nesta região não existe informação científica relacionada com o impacto ambiental da mineradora nem as conseqüências potencialmente ligadas à exposição a poluentes metálicos e radioativos.

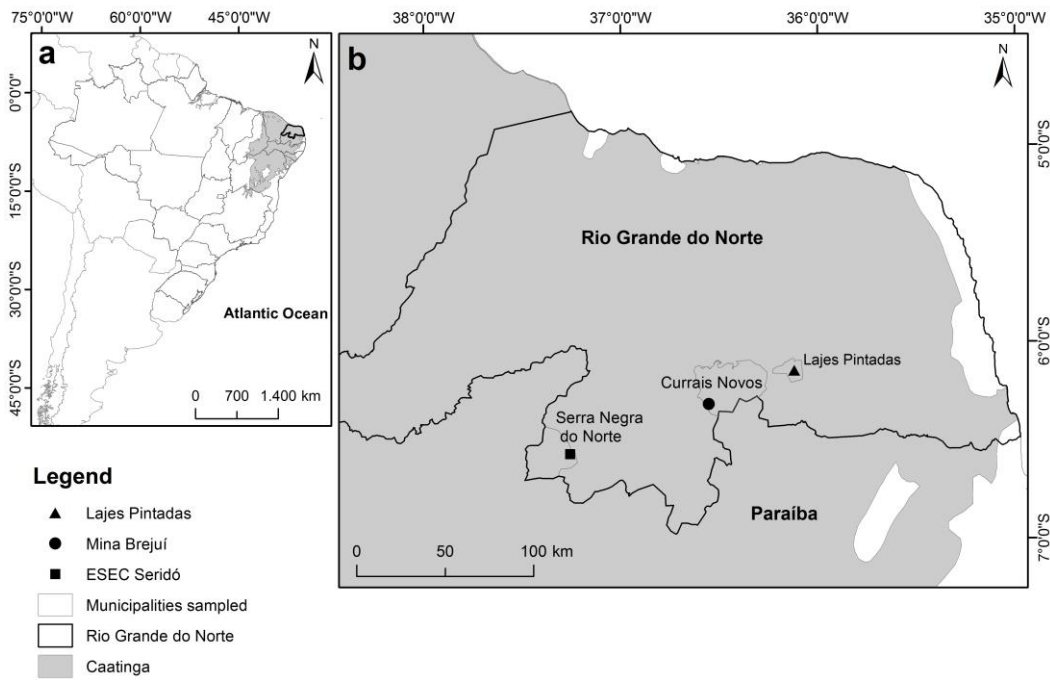


Figura 3 – Localização das áreas de estudo no Estado do Rio Grande do Norte: Municípios de Lajes Pintadas, Currais Novos (Mina Brejuí), e de Serra Negra do Norte (ESEC Seridó). Mapa: Luciano Neto.

Essas três áreas de amostragem encontram-se isoladas entre si por pelo menos 50 km de distância. Cabe ressaltar que, na caracterização geológica do compartimento regional onde essas áreas encontram-se inseridas há presença marcante de rochas como o granito, migmatitos e pegmatitos, que apresentam traços de urânio e tório em sua constituição (ANGELIM *et al.*, 2006). Além disso, essas áreas compartilham condições ecológicas e ambientais para ocorrência da espécie de lagarto utilizada (FREIRE *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2013) para o biomonitoramento aqui proposto.



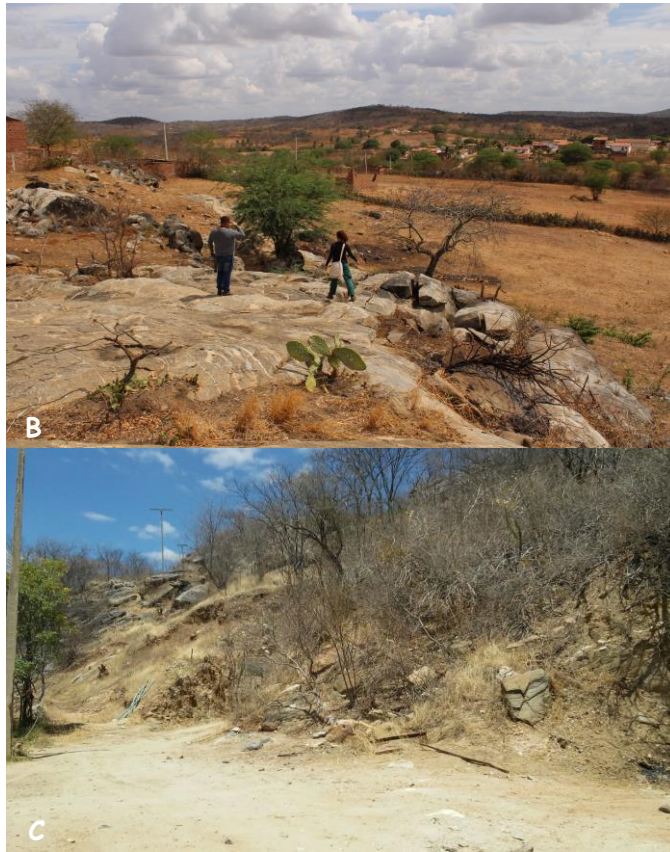


Figura 4 – Áreas de estudo na estação seca (A) ESEC Seridó, município de Serra Negra do Norte/RN; (B) Município de Lajes Pintadas/RN; (C) Mina Brejuí, município de Currais Novos/RN.

3. METODOLOGIA GERAL

3.1. Análise do conhecimento atual

Em relação à revisão e análise de literatura acerca do tema estudado em nível mundial, foi efetuada ampla pesquisa bibliográfica de artigos e livros publicados em meios digital e impresso, que tratassem o tema “Biomonitoramento por espécies de lagartos como estratégia para a análise de risco”. A pesquisa bibliográfica foi feita nas principais bases de dados e sites de busca de publicações científicas internacionais e nacionais, quais sejam: Web of Science, Scielo, PubMed, Google Scholar e Portal de Periódicos CAPES. Em cada base de dados foram realizadas pesquisas utilizando associações de palavras-chaves nos idiomas português e inglês: Biomonitoramento + Lagartos + Contaminantes, Biomonitoramento + Lagartos + Metais Pesados, Lagartos + Poluição, Lagartos + Contaminação, Biomonitoring + Lizards + Contaminants, Biomonitoring + Lizards + Heavy Metals, Lizards + Pollution, Lizards + Contamination. As buscas nas referidas bases de dados foram feitas no período de Maio a Agosto de 2019, considerando-se artigos publicados nos últimos 10 anos. Os artigos encontrados foram submetidos a uma triagem inicial, considerando os títulos e resumo e/ou abstracts dos trabalhos; em seguida, foram selecionados os artigos que continham informações relacionadas ao tema para leitura e análise posterior, aprofundadas. Maior detalhamento sobre essa metodologia se encontra no Capítulo I desta Dissertação.

3.2. Procedimentos metodológicos

3.2.1. Amostragem ambiental

A amostragem ambiental compreendeu a coleta de amostras de água *in situ*, efetuadas no mesmo local de coleta dos espécimes de lagartos. Além disso, foram registrados os pontos de coleta com GPS, bem como medições de radioatividade pela espectrometria da radiação gama (U, Th e ⁴⁰K) *in situ*, utilizando o equipamento de gamametria modelo RS-125 da Radiation Solution.

3.2.2. Amostragem biológica

A amostragem biológica consistiu na captura 41 indivíduos de *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 (Figura 3) distribuídos entre as 3 áreas de coleta, em conformidade com a quantidade estabelecida pela Licença SISBIO N° 63437-1. As coletas ocorreram durante duas excursões de cinco dias para cada área. Em virtude de esta espécie ser crepuscular e/ou noturna, todas as buscas para coletas foram efetuadas à noite, após as 18 h. Os lagartos foram capturados manualmente e anestesiado ainda em campo, através da técnica de resfriamento

(SHINE et al., 2015); em seguida, ainda em campo, foi efetuada coleta de sangue para realização do teste de micronúcleo.

Para a coleta de sangue dos indivíduos, foi adotado o método adaptado de CAPRIGLIONE et al. (2011), com modificações, tendo em vista que estes animais são ectotérmicos, de hábito noturno e, conseqüentemente, possuem metabolismo mais lento, quando comparado a outros táxons, fatos estes que dificultam a retirada de sangue. Em suma, com o lagarto anestesiado por resfriamento (SHINE et al., 2015), foi realizado um corte longitudinal no ventre do animal e coletado o sangue extravasado com uma seringa de 1mL. Posteriormente, todos os animais foram medidos (comprimento rostro-cloacal - CRC) e sexados. O biomarcador utilizado neste estudo foi o teste de micronúcleo.

Todos estes procedimentos foram efetuados em acordo com a legislação vigente (Resolução CFBio n° 301/2012 e Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA). A descrição detalhada da técnica está no respectivo capítulo.



Figura 5 – Espécime do lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 em afloramento rochoso no município de Lajes pintadas. Foto: Aguiberto Cândido.

3.2.3. Teste de micronúcleo (MN) e ensaio de anormalidades nucleares (AN)

O ensaio de micronúcleo (MN) foi realizado de acordo com Schaumburg e colaboradores (2012), em eritrócitos de *P. periosus*, com alguns ajustes: cinco esfregaços de sangue para cada animal foram feitos em lâminas de vidro limpas, secas à temperatura ambiente, fixados com metanol durante 10 min e corados com Giemsa 10% por 5 minutos. A identificação de MN foi efetuada utilizando microscópio Olympus Cx31 com aumento de 100 X, sendo realizada a contagem de 3000 células por indivíduo; a presença de MN e outras

anormalidades morfológicas nucleares, tais como, núcleo em ferradura, broto, “bleb” e forma ameboide, foram avaliadas e registradas.

Para identificação e caracterização dos biomarcadores foram adotados os critérios de Fenech (2007), quais sejam: o tamanho do MN deveria variar entre 1/3 e 1/16 do tamanho do núcleo principal, sendo morfológicamente idêntico; deveria estar no mesmo plano de foco, sendo facilmente distinguido de artefatos; não estar ligado ao núcleo principal; apresentar a mesma textura e coloração do núcleo principal.

O ensaio de anormalidades nucleares (AN) foi aplicado de acordo com os critérios de Carrasco et al. 1990. As frequências de AN foram calculadas a partir de 3000 eritrócitos por animal (em cinco lâminas), considerando as seguintes categorias: broto nuclear (NB), bleb nuclear (BN), núcleo circular (NC), núcleo fusionado (NF) núcleo ameboide (NA), cromatina condensada (CC) e outras alterações.

3.2.4. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. A comparação das variáveis entre os grupos foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis. A análise intergrupos foi realizada pelo teste post hoc Games-Howell. A correlação entre as variáveis foi analisada por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Diferenças estatisticamente significativas foram estabelecidas em $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados com o programa IBM SPSS Statistics versão 22.

CAPÍTULO 1

LIZARDS AS MODEL ORGANISMS TO EVALUATE ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND BIOMONITORING

Este artigo está publicado no periódico *Environmental Monitoring and Assessment* e, portanto, está formatado de acordo com as recomendações desta revista em <https://www.springer.com/journal/10661>

Jadna Maria Silva^{1,2}, Júlio Alejandro Navoni^{2,3} and Eliza Maria Xavier Freire^{1,2} (corresponding author)

1. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Botânica e Zoologia, Laboratório de Herpetologia. 2. Programa Regional de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente. 3. Programa de Pós-Graduação em Uso Sustentável de Recursos Naturais, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

E-mail: elizajuju1000@gmail.com.

ABSTRACT

Environmental contamination is reaching ever higher levels and affecting several animal populations, including humans. In this context, studies are being developed to monitor and evaluate this environmental problem using bioindicator organisms, in addition to testing the toxicity of contaminants in the laboratory. In this perspective, reptiles are ideal animals for these types of studies, considering that they are ectothermic and have a slower metabolism directly influencing their recovery power, and therefore they are more sensitive to xenobiotic effects. Among reptiles, lizards are animals which adapt to various environmental conditions, even being found in areas with arid characteristics. Therefore, a literature review was conducted in this study regarding the use of lizards as models for ecotoxicological studies, including biomonitoring, carried out in the last ten years, with the aim of evaluating them as biomonitors in Brazilian semi-arid region. Studies were found involving ten lizard families, among which the most investigated was Lacertidae. The studies were classified into two categories: organic contaminants (pesticides, petroleum by-products and explosives); and inorganic contaminants (metals such as zinc, lead and aluminum, and radionuclides). Contaminants directly contributed to DNA damage and to increasing the frequency of micronuclei in exposed animals, histopathological effects and oxidative stress. The performed analysis highlights the usefulness of lizards as environmental biomonitors. However, the response profile is dependent on the exposure level and route, in addition to the environmental scenario analyzed. Therefore, future studies aimed at evaluating environmental contaminants are required under exposure conditions more related to the environmental reality to be studied.

Keywords: Biomonitoring, Environmental contaminants, Organic contaminants, Inorganic contaminants, Lizards.

INTRODUCTION

Environmental contamination at a global level has reached worrying levels, and therefore studies have been developed in order to monitor and evaluate this problem (Poletta et al. 2008; Marquez-Ferrando et al. 2009; Marcon et al. 2010; Al-Hashem 2011; Cabarcas-Montalvo et al. 2012; Zocche et al. 2013; Schaumburg et al. 2016; Nasri et al. 2017). A wide variety of terrestrial and aquatic organisms have been used as tools to assess the environmental impacts linked to contamination and pollution in the different environmental compartments to understand the effects of chemical agents on biota (Zapata et al. 2016). Among these organisms, reptiles and especially lizards stand out, since environmental pollution together with global climate changes and the unsustainable use of natural resources constitute the most significant threats to the populations of these animal species (Gibbons et al. 2000).

Organisms which are reactive to environmental contamination, with the exception of humans, can be considered apt to be evaluation models, as long as they are found in abundance in the area to be evaluated, have a low migration rate and a reduced displacement area, with this being the case for most lizards (Zocche et al. 2013). In addition, these animals are ectothermic and present a slower metabolism; therefore, they are more

sensitive to toxic and xenobiotic agents which directly influence their recovery power (Schaumburg et al. 2012). Animals in general are exposed to various types of pollution daily, many of them of anthropic origin, but there are also those of natural origin, and they constantly need to adapt to survive in the environment (Hopkins 2000). Reptiles are specifically sensitive to environmental pollutants, being exposed by several routes from the possibility of ingesting part of contaminated soil, water or food, as well as dermal contact on contaminated substrates and gas inhalation (Burguer et al. 2004; Marquez-Ferrando et al. 2009; Simonyan et al. 2018). The ingestion of contaminated soil particles is a situation which has been causing serious risks to animals, since studies have already shown that lizards living in radioactive areas or contaminated with hydrocarbons presented damage to their DNA by ingesting soil particles during feeding; a situation which can cause further damage later (Marsili et al. 2009; Al-Hashem 2011). Contaminated foods are one of the most relevant sources of exposure to toxic agents, considering that there may be bioaccumulation of chemical elements of metallic origin or even organic contaminants such as agrochemicals via the food chain, thereby generating an accumulation cycle within the organisms (Nasri et al. 2017). Finally, dermal contamination is an important entry point for pesticides and airborne pollutants, as well as contaminants in the substrate itself (Zocche et al. 2013). Therefore, all of these factors can be considered as means of monitoring and evaluating various chemical substances found in the environment.

The investigation level of ecotoxicological studies using lizards has been deepened to better assess and demonstrate the consequences of environmental contamination (Campbell e Campbell 2002). These authors introduced a synthesis showing the scarcity of studies which used reptiles of the Squamata group to assess environmental contamination. Based on this principle, reptiles have been considered good biomonitors to assess environmental contamination given that they have reduced mobility, they do not normally live in large areas, and it is possible to assess the effective exposure in a given area (Burger et al. 2004); however, it is argued that there is a lack of studies with these animals when it comes to biomonitoring studies, mainly in relation to the effects generated by environmental contaminants in this group (Mitchelmore et al. 2005; Zapata et al. 2016; Sargsyan et al. 2018). This is because lizards have great potential as bioindicator organisms to assess the environmental risk of several areas, as well as being shown to be excellent examples with their application in ecotoxicological studies (Simonyan et al. 2018). Lizards are usually associated with a specific habitat, thus being more vulnerable to environmental degradation than other vertebrates such as birds and mammals (Hopkins 2000). Therefore, this review article aims to qualitatively and quantitatively assess current knowledge worldwide about the relevance of using lizards as biomonitors and model organisms in environmental contamination studies.

MATERIAL AND METHODS

Articles were searched about environmental biomonitoring and experimental models using lizards for analyzing environmental contaminants carried out in the period 2009 to 2019, thus contemplating the studies published on environmental contaminants in lizards in the last ten years. It is worth mentioning that studies which did not indicate that they are inserted in this required group and which were not related to any specific contaminant were not included. The searches were carried out in the following databases: PubMed, Web of Science, Scielo and Google Scholar in the mentioned period, using the following combinations of keywords: biomonitoring + lizards + contaminants; biomonitoring + lizards + heavy metals; lizards + contamination; lizards + pollution; lizards + pesticides; lizards + persistent organic contaminants + pollution. The obtained results were divided into two categories according to their origin: organic contaminants and inorganic contaminants. The

performed review shows where we are in relation to ecotoxicological research using lizard species, presenting a view of the deficiencies and gaps which still need to be filled.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 30 studies using lizards as biomonitors and/or model organisms for assessing environmental contaminants have been found for the past ten years (2009-2019), which represent samples from five continents (Tabela 1). The lizard family most studied in ecotoxicology from the total of these works was the Lacertidae family, represented in 57% of the studies. This lizard family is part of the Scincomorpha infraorder and is distributed in Africa, Asia and Europe (Uetz e Hošek 2016). The species most frequently found in the studies was the *Podarcis sicula* lacarcid, with 20% of the detected records. It is a species native to Italy and widespread throughout the country, being considered quite abundant; however, because it was introduced in other areas it can be found in other countries such as Portugal, Spain, France, Montenegro, Croatia, Turkey, Libya and Tunisia, all being geographically close to Italy (Verderame and Scudiero 2019a; Table 1).

The results obtained through this survey were divided into two categories: contaminants of organic origin (pesticides, petroleum products, coal and explosives) and contaminants of inorganic origin (heavy metals and radionuclides; Table 1).

Table 1 - Studies which used lizards as experimental models to evaluate environmental contaminants (2009-2019) recorded during this review and characterized according to the family to which they belong, continent of origin, reported contaminant and author(s) of the work.

Families	Continent	Organic contaminant	Inorganic contaminant	Authors
Agamidae	Asia	-	01	Al-Johany e Haffor 2009
Cordylidae	Africa	-	01	McIntyre e Whiting 2012
Dactyloidae	North America	01	-	McMurry et al. 2012 Cabarcas-Montalvo et al. 2012
Iguanidae	South America	01	-	Marquez-Ferrando et al. 2009; Marsili et al. 2009; Simoniello et al. 2010; Al-Hashem 2011; Capriglione et al. 2011; Amaral et al. 2012; Bicho et al. 2013; Cardone 2015; Chang et al. 2016; Mingo et al. 2016; Verderame et al. 2016; Mingo et al. 2017;
Lacertidae	Africa, Asia and Europe	11	06	

				Nasri et al. 2017; Panitskiy et al. 2017; Sargsyan et. Al, 2018; Simonyan et al. 2018; Verderame e Scudiero 2019b
Phrynosomatidae	North America	01	-	Aguilera et al. 2012
Scincidae	Africa and Oceania	01	01	Soliman 2012; Carpenter et al. 2016 Schaumburg et al. 2016; Mestre et al. 2019
Teiidae	South America	02	-	2016; Mestre et al. 2019
Tropiduridae	South America	-	01	Salvador et al. 2018 Ciliberti et al. 2011;
Varanidae	Africa	02	01	Ciliberti et al. 2012; Ciliberti et al. 2013

Organic contaminants

Reptiles, more specifically lizards, are an important target group of vertebrate animals exposed to various pesticides (fungicides, insecticides and herbicides) of varying combinations in regions with intensive agriculture (Verderame e Scudiero 2019b). The number of studies using lizards to evaluate organic contaminants and their effects increased in the last decade. There were nineteen studies found in this review using lizards as experimental models or as field biomonitors. The lizard family most studied for organic compounds was Lacertidae, representing 58% of the total studies (Table 1). The species of this family found in the studies were: *Podarcis sicula* (27% of the studies), *Podarcis muralis* (11%), *Podarcis bocagei* (11%), *Eremias argus* (5%) and *Acanthodactylus scutellatus* (5%) (Marsili et al. 2009; Al-Hashem 2011; Capriglione et al. 2011; Amaral et al. 2012a; 2012b; Bicho et al. 2013; Cardone 2015; Chang et al. 2016; Verderame et al. 2016; Mingo et al. 2016; 2017; Verderame e Scudiero 2019b). However, it should be noted that most studies regarding the effects of organic contaminants on lizards are experimental.

The organic contaminants found in the recorded studies are listed in Table 2; most of them were tested agrochemicals (fungicides, insecticides and herbicides), and most of them are toxic to the studied species. In these studies, exposure was orally acute at different levels. Biomarkers were used for the analyzes which depict multiorganic changes, both morpho-histological involving the liver, kidneys, testicles, thyroid, adipose tissue, as well as changes at the systemic level of several parameters, including enzymatic activity, hormonal levels and biochemical indicators (Marsili et al. 2009; Bicho et al. 2013; Cardone 2015; Chang et al. 2016; Mingo et al. 2016; Schaumburg et al. 2016).

The sublethal effects of pesticides on lizards have a wide variety of implications for exposed individuals such as hormonal changes, enzyme responses, oxidative stress, neurotoxic implications, immunosuppression, and also include physiological reactions such as feverish responses, fertility problems, development and locomotor performance (Amaral et al. 2012; Bicho et al. 2013, Cardone 2015, Carpenter et al. 2016, Schaumburg et al. 2016).

Table 2 - Organic compounds studied in lizard species as experimental models for assessing environmental contaminants (2009-2019) and their effects recorded during this review, characterized according to the classification of the compound, family and species of lizard to which they belong, exposure time and route, verified effects, and author(s) of the work.

Organic compound	Classification	Family/ Species	Concentration of the substances	Exposure time	Exposure route	Effects	Authors
Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs)	Petroleum compounds	Lacertidae <i>Podarcis sicula</i>	-	-	-	Presence of PAHs in lizard bile	Marsili et al. 2009
Tar	Petroleum compounds	Lacertidae <i>Acanthodactylus scutellatus</i>	-	-	-	Damage of liver tissue cells and apoptosis	Al-Hashem, 2011
Thiophanate-methyl	Fungicide	Lacertidae <i>Podarcis sicula</i>	100 ml of 1.5% TM (1.5 g TM in 100 ml of water)	15, 30 and 40 day	Dermal route, by spraying	Genotoxic effects	Capriglione et al. 2011
Organophosphates, Carbamates and Pyrethroids	Insecticides	Phrynosomatidae <i>Sceloporus serrifer</i> <i>Sceloporus torquatus</i>	15000000 µg/L	-	-	No effects were detected	Aguilera et al. 2012
Alachlor, Bentazone, Dicamba, Dimetenamide-P, Mesotrione and Terbutylazine	Herbicide	Lacertidae <i>Podarcis bocagei</i>	-	-	-	Loss of body condition and histopathological changes	Amaral et al. 2012

Coal	*	Iguanidae <i>Iguana iguana</i>	-	-	-	Genotoxic effects	Cabarcas-Montalvo et al. 2012
DDD, DDE and Malathion	Insecticide	Varanidae <i>Varanus niloticus</i>	-	-	-	Low concentrations and no direct effects	Ciliberti et al. 2012
Octa-hydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX)	Explosive	Dactyloidae <i>Anolis carolinensis</i>	HMX at 2,000 mg/kg 2000 µg/g	14 days	Oral gavage, acute toxicity	No toxic effects observed	McMurry et al. 2012
Alachlor, Bentazone, Dicamba, Dimetenamide-P, Mesotrione and Terbutylazine	Herbicide	Lacertidae <i>Podarcis bocagei</i>	-	-	-	Disruptive effects of the thyroid	Bicho et al. 2013
DDT and CPF	Insecticide	Varanidae <i>Varanus exanthematicus</i>	4 mg of DDTkg ⁻¹ and 0.5 mg of CPFkg ⁻¹ 4 µg/g and 0.5 µg/g	6 weeks	Oral, subchronic exposure	There was a high tolerance to the analyzed pollutants	Ciliberti et al. 2013
Imidacloprid	Insecticide	Lacertidae <i>Podarcis sicula</i>	-	-	-	Toxic effects on the reproductive system	Cardone, 2015
Glyphosate (Agpro Glyphosate 360 and Yates Roundup)	Herbicide	Scincidae <i>Oligosoma polychroma</i>	144 mg of glyphosate for 1 L of water	Single dose	Dermal route, indirect form	No significant effects were detected	Carpenter et al. 2016

Weedkiller)			144000µg/L				
Lambda cyhalothrin	Insecticide	Lacertidae <i>Eremias argus</i>	10 mg kg of 1 pc of LCT 10 µg/g	1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 and 168 h	Oral route	There was no bioaccumulation	Chang et al. 2016
Glyphosate, Metrafenone, Metiram, Fosetil-Al, Fluopicolide, Initium, Diphenconazole, Ciflufenamide, Folpet, Quinoxifen, Penconazole, Miclobutanil, Fenhexamide, Potassium phosphonate	Herbicide and fungicides	Lacertidae <i>Podarcis muralis</i>	-	-	-	Oxidative stress	Mingo et al. 2016
Glyphosate (Roundup)	Herbicide	Teiidae <i>Salvator merianae</i>	50-1600 µg of RU/egg	60 days	Egg shell	Genotoxic effects	Schaumburg et al. 2016
Animal manure	Natural fertilizers	Lacertidae <i>Podarcis sicula</i>	-	-	-	Estrogenic contamination affects the reproductive system of lizards	Verderame et al. 2016
Glyphosate	Herbicide	Lacertidae				Oxidative stress and	Mingo et al. 2017

<p>Glyphosate (Roundup Full II), Atanor cypermethrin and Nufarm chlorpyrifos</p>	<p>Herbicides and insecticide</p>	<p><i>Podarcis muralis</i> Teiidae <i>Salvator merianae</i></p>	<p>- GLY 2% (a.p. 66.2%); CPF at 0.8% (a.p. 48%) and CYP at 0.12% (a.p. 25%)</p>	<p>- 3 months</p>	<p>- Dermal route, indirect form</p>	<p>genotoxic effects Effects on the immune system</p>	<p>Mestre et al. 2019</p>
<p>Glyphosate</p>	<p>Herbicide</p>	<p>Lacertidae <i>Podarcis sicula</i></p>	<p>0,05 e 0,5 µg/ kg pc em 50 µl de água</p>	<p>3 weeks</p>	<p>Oral gavage</p>	<p>Xenoestrogenic action on the liver</p>	<p>Verderame and Scudiero 2019b</p>

In addition to agrochemicals, components of oil, coal and explosives were also evaluated to identify the toxicity degree of these compounds in lizards (Marsili et al. 2009; Al-Hashem 2011; Capriglione et al. 2011; Cabarcas-Montalvo et al. 2012; Ciliberti et al. 2013; Cardone 2015; Chang et al. 2016; Schaumburg et al. 2016). Among the organic contaminants, glyphosate has been the main focus of studies which assess the degrees of toxicity, as it is one of the most widely used herbicides worldwide with its main indication being in soy monoculture, despite this agrochemical having several negative effects in exposed biota (Carpenter et al. 2016; Mingo et al. 2016; Schaumburg et al. 2016; Mingo et al. 2017; Mestre et al. 2019; Verderame e Scudiero 2019b).

The effects of the glyphosate-based herbicide Roundup (RU) tested in sublethal concentrations found in these studies were genotoxic but not teratogenic, inducing DNA damage in lizards popularly known as tegus (*Salvator merianae*), also being able to interfere in embryo development and hinder the reproduction of this species in areas exposed to these agrochemicals. Comet, micronuclei and nuclear abnormality tests were used for this evaluation, demonstrating a significant increase in induced DNA damage for all concentrations above 100 µg RU/egg (Schaumburg et al. 2016).

Roundup Full II, Chlorpirifos Nufarm and Cypermethrin Atanor contaminants in tegus eggs were also tested in experimental and subchronic conditions (Table 2), using concentrations equivalent to those recommended for application in crops for three months. The leukocyte count did not show significant differences between the control and treatment groups, however it showed a slight negative trend in relation to organisms exposed to pesticides. Even at levels considered low, it was observed that these pesticides can cause immunotoxicity for *Salvator merianae*, including the application of these compounds in areas which this species inhabits can affect its immune system. Corticosterone can decrease or increase in the presence of a stressor, and higher levels of corticosterone were found in lizards exposed to pesticides compared to the control group in this study (Mestre et al. 2019).

Further regarding glyphosate, another study evaluated its effects on the enzymatic activities of *P. muralis* lizards exposed in the field to the herbicide before and after application days of the contaminant in the agricultural area. The study showed there were strong signs of oxidative stress after collecting and analyzing the saliva of these animals (Mingo et al. 2017). The analyzed parameters were cholinesterase acetylcholinesterase activity (AChE), glutathione-S-Transferase (GST) and glutathione reductase (GR) activity. The results demonstrated neurological effects with a 5 to 30% decrease in acetylcholinesterase activity, with no influence on liver activity due to the lack of other biomarkers (Mingo et al. 2016). This same author published an evaluation of several other fungicide-type contaminants, in addition to glyphosate (Mingo et al. 2016; Table 2). As there was an inconclusive result as to what or which contaminants had been absorbed by the lizards, a new study was carried out with a focus on glyphosate, showing that oxidative stress was the main effect in both cases. An innovation of the authors in both studies was the less invasive collection technique for the animals by using swabs to detect the presence of toxic agents in the lizards' saliva. This technique had a success rate of around 90% (Mingo et al. 2016), therefore being highly recommended to reduce environmental impact on animals, especially those which are threatened with extinction by the IUCN red list.

An association was found in New Zealand between two commercial glyphosate formulations (Agro Glyfosate 360 and Yates Roundup Weedkiller) and the thermoregulation behavior of *Oligosoma polychroma* lizards. The lizards were divided into three groups for the experiment, one control and one for each glyphosate formulation; the treatment occurred only once, simulating the application in the field. The treatment groups were covered with straw and sprayed with the herbicide at a concentration of 144mg of glyphosate to 1L of water; this concentration was considered low within the range which can be used to control weeds. The animals were

weighed during the four weeks before treatment and four weeks after treatment, but there was no evidence that the exposure influenced their weight. Exposure to the Yates Roundup Weedkiller formulation was correlated with a search for warmer temperatures by the lizards, more than in the other two tests. Still regarding thermoregulatory behavior, it was observed that the animals presented a feverish reaction looking for warmer areas of the terrarium in an attempt to minimize the stress caused by herbicides (Carpenter et al. 2016). However, no significant effects were identified; a posteriori effects may appear, but nothing occurred during the study period. Despite this, the authors suggest more transparency regarding the compositions of the commercialized agrochemicals, so that it is possible to know the toxicity level of their active ingredients more than their formulations (Carpenter et al. 2016).

In a study with male *P. sicula* lizards found in areas of organic farms free from pesticides and similar chemical groups, it was found that they had estrogenic contamination after histological and molecular analyzes of their livers; biosynthetic changes were found in their liver tissues due to the presence of the vitelogenin biosynthesis gene (VTG) in males, which is considered a biomarker of estrogen contamination (Verderame et al. 2016). Even in areas free from agrochemicals, this result demonstrates that the use of substances considered natural by farmers can also indirectly affect the fauna that resides there. Verderame et al. (2016) also add that the use of natural fertilizers such as animal manure can generate an accumulation of natural steroids which end up interfering in the reproduction of lizards of this species, reinforcing the described speculations.

Other pesticides have also been evaluated using lizards; contamination by the thiophanate-methyl fungicide causes genotoxic effects in Italian *P. sicula* lizards, producing high frequencies of DNA damage, as well as enabling the increase in the number of micronucleated cells, leading to the conclusion that this contaminant must accumulate in the organism, inducing chromosome instability by interfering with the formation of microtubules, resulting in an aneugenic effect (Capriglione et al. 2011). Comet (frequency of DNA damage), micronuclei (frequency of cells with micronuclei) and chromosomal abnormality (arm breaks and Robertson fusions) tests were used for this evaluation.

Cardone (2015) used hormonal and morphological analysis techniques to assess oral exposure of *P. sicula* lizards to the insecticide Imidacloprid, finding that this compound consistently affected the lizards' reproductive system. Pure glyphosate administered orally was considered toxic to the liver of this same species, even exerting a xenoestrogenic action, with histological and biomolecular analyzes of the animals' liver being performed for this experiment. The liver structure in the control group animals was considered regular, whereas few degranulation areas were found in the liver parenchyma for the animals receiving the lowest doses of glyphosate treatments, while the liver parenchyma was more damaged with greater degranulation areas for the highest dose, in addition to edema in blood vessels and bile ducts (Verderame and Scudiero 2019b).

For the *P. bocagei* species, studies carried out in Portugal evaluated the risk of exposure to various herbicides in natural field conditions (Table 2) in comparing areas without the influence of these compounds with contaminated areas, verifying that animals exposed to this type of contaminant presented a more precarious health condition than individuals in the control areas; one of the animals in the exposed area even contained an intestinal parasite (Amaral et al. 2012). In addition, the most significant presence of hematoparasites was found in contaminated areas, reaching 18% higher than the reference areas. The animals showed histopathological changes such as fibrosis and degeneration of hepatocytes, as well as disruptive effects of the thyroid gland, which is a problem that can affect the lizard's reproductive system, with the alachlor compound being considered responsible in the latter case (Amaral et al. 2012; Bicho et al. 2013).

Liver tissue cells from *Acanthodactylus scutellatus* lizards were damaged and several of them underwent apoptosis in areas contaminated with tar in an oil field in Kuwait, confirming that prolonged exposure to oil-based contaminants causes severe pathologies to animals living in those areas; histological analyzes were performed for this evaluation (Al-Hashem 2011). However, in a study conducted in oil fields in Italy, *Podarcis sicula* lizards exposed to high levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and trace elements were evaluated, without any pathological effect being found in the individuals (Marsili et al. 2009). McMurry et al. (2012) carried out an experimental study with *Anolis carolinensis* lizards to evaluate the effects of the explosive octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina HMX on these animals. A dose of 2000 µg/g of HMX was administered orally in this experiment, and the animals were initially observed at regular intervals, and later three times a day; at the end of the tests it was found that this substance did not present high toxicity for the adult green Anole lizards. However, there was a reduction in the hatching rate for the eggs in those exposed to soil contaminated with this explosive.

Coal mines are considered contamination sources for biota, given that coal is toxic to the respiratory system. The environmental impact in two cities close to coal mines in northern Colombia was assessed in a study on two animal species, *Mus musculus* (rat) and *Iguana iguana* (lizard). There was an increase in the frequency of damage to DNA and cells with micronuclei of the biomonitors used in impacted areas near the mine, with the consequence of genotoxic effects linked to the contamination degree of these environments (Cabarcas-Montalvo et al. 2012).

An important point to note is the variability of responses described on the consequences of organic contaminants in lizards and their relationship with both toxicokinetic and toxicodynamic aspects; facts that have an impact on the response degree and the consequent usefulness of each species as a biomonitor. For example, some studies have indicated no bioaccumulation or visible intoxication for the tested contaminants, as in the case of pyrethroids in the Chinese *Eremias argus* lizards. The explanation for this is the differences in the bioaccumulative capacity, resulting in a more efficient metabolism, decreasing the toxic capacity of substances due to a higher metabolic rate of toxic substances by the liver (Chang et al. 2016). In a study to define biomarkers for two species of lizards, Aguilera et al. (2012) used pieces of tail from the *Sceloporus serrifer* and *Sceloporus torquatus* lizards at two locations in Mexico, an environmental protection area and another highly polluted area in an industrial park, to analyze enzymatic activities in the presence of organophosphate, carbamate and pyrethroid pesticides, but the animals did not show evident effects.

Another possibility raised by Ciliberti et al. (2012; 2013) in this type of result is that the lizards may have a high tolerance to the pollutants in question or there is not such a severe environmental contamination, as was the case with Savannah monitors (*Varanus exanthematicus*) and Nile monitors (*Varanus niloticus*), respectively. In the first case, the animals appeared capable of handling high contamination by organochlorines and lead derived from pesticides in the environment. In this scenario, it is also worth considering the size of the animal, which has a greater body mass.

Inorganic contaminants

There has been significant advancement in scientific studies using lizards as biomonitors of heavy metals and radionuclides over the past seventeen years, considering the last review carried out by Campbell and Campbell (2002) as a reference when few studies on this topic were found and only two addressed the effects of heavy metals in this zoological group.

In addition, there is concern to verify the bioaccumulation of metals in the organs to confirm the usefulness of the lizard as a bioindicator, despite there being discontinuity in studies to assess the real effects on lizards; most studies do not actually show the pathological effects of contamination on animals. McIntyre and Whiting (2012) studied the increased rate of heavy metal concentration in endemic lizards (*Smaug giganteus*) in two gold mining areas in South Africa, and argued that there is still little understanding about the bioaccumulative effects of these contaminants, but one of the factors is a decrease in the individual's body condition, even when there is a high availability of prey in the environment. The study areas were two mining areas and two control areas. Significant differences were found between the sampled locations in the sodium (Na), nickel (Ni), aluminum (Al), chromium (Cr), iron (Fe), manganese (Mn), silicon (Si) and sulfur (S) concentrations in lizard whole blood samples, with samples from the mine area always presenting higher values. The metals which showed the most significant values in the statistical tests were lithium (Li) with 9.7 µg/g, nickel (Ni) with 7.45 µg/g, copper (Cu) with 5.58 µg/g, chromium (Cr) with 5.42 µg/g, which may be the metals responsible for the aforementioned effects. The lizards used in this study are on the IUCN list of endangered animals, classified as vulnerable, so less invasive methods were used and the animals did not die. They were marked with passive transponders integrated with an alphanumeric code, injected subcutaneously in the post-femoral region of the animal.

In the ten studies which addressed heavy metals in lizards published in the last decade (Table 3), the concentrations of metals were analyzed in various organs and tissues, with blood, liver, kidneys, lungs, stomach and tail tip being the most common (Al-Johany and Haffor 2009; Marquez-Ferrando et al. 2009; Simoniello et al. 2010; Ciliberti et al. 2011; McIntyre and Whiting 2012; Soliman 2012; Nasri et al. 2017; Salvador et al. 2018; Sargsyan et al. 2018; Simonyan et al. 2018). Among these, an innovative study evaluated the presence of metals in the helminths that parasitized *Chalcides ocellatus* lizards in three areas (industrial area, rural area and urban area) in Egypt. In this study, bioaccumulation of the metals cadmium, lead and nickel was found in cestode parasites present in animals (Soliman 2012). A number of metals and other inorganic compounds were evaluated in this study, with the main ones being: Lead (Pb), Cadmium (Cd), Chrome (Cr), Aluminum (Al), Zinc (Zn), Copper (Cu), Iron (Fe) and Mercury (Hg).

Table 3 – Inorganic compounds studied in different species of lizards and their effects.

Organic compound	Classification	Family/Species	Effects	Authors
Cadmium (Cd)	Heavy metal	Agamidae <i>Urematix aegyptius</i>	Cadmium-induced pneumothelial and endothelial injury.	Al-Johany and Haffor 2009
Mercury (Hg), Chromium (Cr), Antimony (Sb), Copper (Cu), Thallium (Tl), Cadmium (Cd), Lead (Pb), Tin (Sn), Barium (Ba), Strontium (Sr), Manganese (Mn), Rubidium (Rb), Astate (As) and Zinc (Zn)	Heavy metals	Lacertidae <i>Psammodromus algirus</i>	All metals bioaccumulated on the individuals' tails.	Marquez-Ferrando et al. 2009
Cadmium (Cd)	Heavy metal	Lacertidae <i>Podarcis sicula</i>	Rupture of the hepatic matrix	Simoniello et al. 2010
Cadmium (Cd) and Lead (Pb)	Heavy metals	Varanidae <i>Varanus niloticus</i>	There was no bioaccumulation in the tissues	Ciliberti et al. 2011
Nickel (Ni), Aluminum (Al), Copper (Cu), Chrome (Cr), Sulfur (S), Iron (Fe), Tungsten (W), Lithium (Li), Sodium (Na), Silicon (Si), Manganese (Mn) and Bismuth (Bi)	Heavy metals	Cordylidae <i>Smaug ginganteus</i>	Decreased body condition	McIntyre and Whiting 2012
Cadmium (Cd), Lead (Pb) and Nickel (Ni).	Heavy metals	Scincidae <i>Chalcides ocellatus</i>	There was bioaccumulation of metals in the cestode parasites present in the lizards	Soliman, 2012
Cadmium (Cd), Zinc (Zn) and Lead (Pb)	Heavy metals	Lacertidae <i>Acanthodactylus boskianus</i>	Bioaccumulation of the three metals in lizard tissues	Nasri et. al., 2017
¹³⁷ Cs and ⁹⁰ Sr	Radionuclides	Lacertidae <i>Lacerta agilis</i>	-	Panitskiy et al. 2017

Aluminum (Al) and Zinc (Zn)	Heavy metals	Tropiduridae <i>Tropidurus torquatus</i>	Bioaccumulation of zinc in fat and aluminum in the liver	Salvador et al. 2018
Chromium (Cr), Cobalt (Co), Copper (Cu), Zinc (Zn), Astate (As), Molybdenum (Mo), Cadmium (Cd), Lead (Pb), and Nickel (Ni)	Heavy metals	Lacertidae <i>Darevskia armeniaca;</i> <i>Darevskia raddei</i>	Genotoxic and epigenetic effects	Sargsyan et al. 2018
Chromium (Cr), Cobalt (Co), Copper (Cu), Zinc (Zn), Astate (As), Molybdenum (Mo), Cadmium (Cd) and Lead (Pb).	Heavy metals	Lacertidae <i>Darevskia armeniaca;</i> <i>Darevskia raddei</i>	Genotoxic effects	Simonyan et al. 2018

Some studies have found a correlation between the ingestion of prey contaminated with heavy metals and the bioaccumulation of these metals in lizards (Marquez-Ferrando et al. 2009; Nasri et al. 2017; Salvador et al. 2018). One of these studies registered contamination of the local biota by heavy metals in the green corridor of Guadiamar (Spain) after the collapse of a mine tailings tank, even after eight years of this fact. The *Psammodromus algirus* lizards which inhabited the impacted area had high concentrations of heavy metals in their tissues, with the main contamination route being from ingesting polluted prey. Considering that this lizard is a generalist and feeds on invertebrates, it can be said that the entire local biota is contaminated (Marquez-Ferrando et al. 2009). In Tunisia, Nasri et al. (2017) evaluated the accumulation of cadmium, zinc and lead in lizards of the *Acanthodactylus boskianus* species which live near a phosphate treatment plant, finding a correlation between ingesting prey contaminated with metals and the bioaccumulation of these metals in lizards; a fact which led to the conclusion that there was a transfer of contaminants from aquatic to land networks. The concentrations were analyzed in the liver, kidneys, stomach and tail pieces, and it was found that cadmium metal was found in greater concentration in the liver, and lead in the animals' tails (Nasri et al. 2017).

There is also the possibility of ingesting contaminated sediment particles along with the food, with larger individuals having the capacity to accumulate larger amounts of pollutants; however, the longevity of the species must also be considered. A study carried out in Saudi Arabia showed that long-term exposure (by ingestion) to the cadmium element generates structural pathologies in the lung cells of the *Uromastix aegyptius* lizard due to an elevation of reactive oxygen species. The experimental group was submitted to ingestion of cadmium mixed with the diet (200 mg/g) for seven weeks and then the animals were sacrificed; blood samples were subsequently collected by cardiac puncture, and the analysis was performed by leukocyte count and the isolated lungs by ultrastructural analysis (Al-Johany and Haffor 2009). In an experimental study in Naples, Italy, with *Podarcis sicula*, Simoniello et al. (2010) evaluated the lizard's response to cadmium metal liver poisoning and concluded that cadmium ingestion destabilizes the liver tissue structure of these lizards. The animals were divided into a control group, received only food, and the experimental group received a single intraperitoneal cadmium dose of 10 mg/10g of body weight.

Two of the studies analyzed used techniques at the molecular level (comet test, micronucleus test and global DNA methylation) to assess DNA damage caused by exposure to heavy metals, and found a clear relationship between heavy metal contamination and an increase in damage frequency to DNA and micronucleus cells in lizards (*Darevskia armeniaca* and *Darevskia raddei*) which were sensitive to pollutants. These studies were carried out in Armenia in seven different areas covering a protected area, industrial and urban areas (Sargsyan et al. 2018; Simonyan et al. 2018). It was also assessed whether the age of individuals would influence the tests, but it was found that lizards of the *Darevskia* genus have a greater capacity to cope with stresses generated by xenobiotics with an increase in their life span; therefore, the tests were not affected by age (Sargsyan et al. 2018).

The only study in radionuclide areas was conducted at a nuclear weapons testing center in Kazakhstan (Panitskiy et al. 2017). In this study, analyzes of the amount of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr radionuclides were performed in the bodies of *Lacerta agilis* lizards of the Lacertidae family; however, as also observed in most studies with heavy metals, the effects of these radioactive compounds on lizards were not presented, only the form with which radioactive chemical elements are redistributed in the environment through animals.

As pointed out by Panitskiy et al. (2017), there is a lack of experimental data on the evaluation of radionuclide transfer parameters in reptile bodies. In addition, studies with reptiles in areas of natural radiation were also not found during this review, which is one of the main points to be advanced in research worldwide.

A very relevant contribution presented by Ciliberti et al. (2013) was the use of the tip of the lizards' tail for studies on lead contamination, considering that this tissue is a good bioindicator of this element and also reduces the environmental impact. Nasri et al. (2017) agrees and reinforces this statement, indicating the liver as an aluminum bioaccumulator and animal fat as a zinc bioaccumulator; however, both did not describe the real effects of these metals on the lizards' organism. Therefore, it is extremely important that studies are carried out which describe possible pathological effects in these animals.

Therefore, it was found in this review that most studies on environmental contaminants are experimental. However, field studies can more clearly show and evidence the environmental effects of such contaminants, considering all the variables to which animals are exposed in nature.

CONCLUSION

This review on environmental contaminants and biomonitoring by lizards made it possible to verify that most studies are focused on organic contaminants, specifically agrochemicals, such as herbicides, fungicides and insecticides. In addition, it is noteworthy that the studies are mostly experimental, and it should also be noted that the consequences in areas exposed to a risk situation can be much worse for lizards. Still, it is worth noting that studies on the evaluation of organic contaminants are those which best express the effects of toxic elements/substances on lizard organisms. This is an important point which still needs to advance in studies on the action of inorganic contaminants such as heavy metals in lizards. Despite the gaps and deficiencies found, this study area is recent and has been growing in recent years. Biomonitoring of chemical agents in itself still has a long way to go in order to have a better understanding of the action of environmental pollutants and the redistribution processes in the environment, and therefore to discuss and apply methodologies which reduce these impacts on nature.

Although there are still few studies which show the pathological effects of inorganic contaminants in lizards, most validate these animals as bioindicators and discuss which organs are better biomarkers. Among the contaminants discussed, studies on areas rich in radiation and radionuclides are the least studied. On the other hand, it became clear throughout this review that reptiles, specifically lizards, are ideal models for ecotoxicological studies. These facts fully justify the use of lizards for biomonitoring regions with extreme conditions such as the Brazilian semi-arid region. In addition, studies involving native animals from regions with natural radioactivity have demonstrated the usefulness such as in the radioisotope biomonitoring, similar to metal contamination, which can predict the resulting impact on other organisms, including human health.

REFERENCES

- AGUILERA, C., DEL PLIEGO, P.G., ALFARO, R.M., LAZCANO, D., CRUZ, J. (2012). Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus* spp.) from two suburban populations of Monterrey, Mexico. *Ecotoxicology*, 21(8), 2103-2112. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0978-0>
- AL-HASHEM, M.A. (2011). Evidence of hepatotoxicity in the sand lizard *Acanthodactylus scutellatus* from Kuwait's Greater Al-Burgan oil field. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1391-1395. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.021>
- AL-JOHANY, A.M., HAFFOR, A.S. (2009). Effects of cadmium exposure on the ultrastructural pathology of different pulmonary cells, leukocyte count, and activity of glutathione peroxidase and lactate dehydrogenase in relation to free radical production in *Uromastix aegyptius*. *Ultrastructural pathology*, 33(2), 39-47. <http://doi.org/10.1080/01913120902751312>

- AMARAL, M.J., BICHO, R.C., CARRETERO, M.A., SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C., FAUSTINO, A.M., SOARES, A.M., MANN, R.M. (2012). The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: Part 2–Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere*, 87(7), 765-774. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.048>
- BICHO, R.C., AMARAL, M.J., FAUSTINO, A.M., POWER, D.M., RÊMA, A., CARRETERO, M.A., SOARES, A.M.V.M., MANN, R.M. (2013). Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. *Ecotoxicology*, 22(1), 156-165. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1012-2>
- BURGER, J., CAMPBELL, K.R., CAMPBELL, T.S. (2004). Gender and spatial patterns in metal concentrations in brown anoles (*Anolis sagrei*) in southern Florida, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(3), 712-718. <https://doi.org/10.1897/02-647>
- CABARCAS-MONTALVO, M.L., OLIVERO-VERBEL, J., CORRALES-ALDANA, H. (2012). Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci Total Environ.* Feb 1;416:208-14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.080>
- CAMPBELL, K.R., CAMPBELL, T.S. (2002). A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A summary of available data. *Environ Toxicol Chem* 21:894–898. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210502>
- CAPRIGLIONE, T., DE IORIO, S., GAY, F., CAPALDO, A., VACCARO, M.C., MORESCALCHI, M.A., LAFORGIA, V. (2011). Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, 20(4), 885. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0655-8>.
- CARDONE, A. (2015). Imidacloprid induces morphological and molecular damages on testis of lizard (*Podarcis sicula*). *Ecotoxicology*, 24(1), 94-105. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1361-0>
- CHANG, J., LI, J., WANG, H., WANG, Y., GUO, B., YIN, J., HAO, W., LI, W., LI, J., XU, P. (2016). Tissue distribution, metabolism and hepatic tissue injury in Chinese lizards (*Eremias argus*) after a single oral administration of lambda-cyhalothrin. *Environmental pollution*, 218, 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.045>
- CARPENTER, J.K., MONKS, J.M., NELSON, N. (2016). The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*). *Ecotoxicology*, 25(3), 548-554. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1613-2>
- CILIBERTI, A., BERNY, P., DELIGNETTE-MULLER, M.L., DE BUFFRÉNIL, V. (2011). The Nile monitor (*Varanus niloticus*; Squamata: Varanidae) as a sentinel species for lead and cadmium contamination in sub-Saharan wetlands. *Science of the Total Environment*, 409(22), 4735-4745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.028>
- CILIBERTI, A., BERNY, P., VEY, D., DE BUFFRÉNIL, V. (2012). Assessing environmental contamination around obsolete pesticide stockpiles in West Africa: Using the Nile monitor (*Varanus niloticus*) as a sentinel species. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(2), 387-394. <https://doi.org/10.1002/etc.731>
- CILIBERTI, A., MARTIN, S., FERRANDEZ, E., BELLUCO, S., RANNOU, B., DUSSART, C., BERNY, P., DE BUFFRÉNIL, V. (2013). Experimental exposure of juvenile savannah monitors (*Varanus exanthematicus*) to an environmentally relevant mixture of three contaminants: effects and accumulation in tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3107-3114. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1230-4>

- GIBBONS, J.W., SCOTT, D.E., RYAN, T.J., BUHLMANN, K.A., TUBERVILLE, T.D., METTS, B.S., GREENE, J.L. (2000). The global decline of reptiles, dejavu amphibians. *BioScience* 50:653–666. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0653:TGDORD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2)
- HOPKINS, W.A. (2000). Reptile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 19:2391–2393. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191001>
- MARCON, A.E., FERREIRA, D.M., MOURA, M.F.V., CAMPOS, T.F., AMARAL, V.S., AGNEZ-LIMA, L.F., MEDEIROS, S.R.B. (2010). Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere* 81(6):773–780 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.006>
- MÁRQUEZ-FERRANDO, R., SANTOS, X., PLEGUEZUELOS, J.M., ONTIVEROS, D. (2009). Bioaccumulation of heavy metals in the lizard *Psammodromus algirus* after a tailing-dam collapse in Aznalcóllar (Southwest Spain). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(2), 276. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9189-3>
- MARSILI, L., CASINI, S., MORI, G., ANCORA, S., BIANCHI, N., D'AGOSTINO, A., FERRARO, M., FOSSI, M.C. (2009). The Italian wall lizard (*Podarcis sicula*) as a bioindicator of oil field activity. *Science of the total environment*, 407(11), 3597-3604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.035>
- MCINTYRE, T.L., WHITING, M.J. (2012). Increased metal concentrations in giant sungazer lizards (*Smaug giganteus*) from mining areas in South Africa. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012 Nov;63(4):574-85. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9795-y>
- MCMURRY, S.T., JONES, L.E., SMITH, P.N., COBB, G.P., ANDERSON, T.A., LOVERN, M.B., COX, S., PAN, X. (2012). Accumulation and effects of octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5, 7-tetrazocine (HMX) exposure in the green anole (*Anolis carolinensis*). *Ecotoxicology*, 21(2), 304-314. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0791-1>
- MESTRE, A.P., AMAVET, P.S., VANZETTI, A.I., MOLEÓN, M.S., MARCÓ, M.V.P., POLETTA, G.L., SIROSKI, P.A. (2019). Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.057>
- MINGO, V., LÖTTTERS, S., WAGNER, N. (2016). The use of buccal swabs as a minimal-invasive method for detecting effects of pesticide exposure on enzymatic activity in common wall lizards. *Environmental pollution*, 220, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.022>
- MINGO, V., LÖTTTERS, S., WAGNER, N. (2017). The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles—a field study. *Science of the total environment*, 590, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.178>
- MITCHELMORE, C.L., ROWER, C.L., PLACE, A.R. (2005). Tools for assessing contaminant exposure and effects in reptiles. In: Gardner, S.C., Oberdorster, E. (Eds.), "Toxicology of Reptiles. New perspective: *Toxicology and the Environment*. Taylor & Francis Group, Florida, pp. 63–122.
- NASRI, I., HAMMOUDA, A., HAMZA, F., ZRIG, A., SELMI, S. (2017). Heavy metal accumulation in lizards living near a phosphate treatment plant: possible transfer of contaminants from aquatic to terrestrial food webs. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(13), 12009-12014. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5390-x>

- PANITSKIY, A.V., LUKASHENKO, S.N., KADYROVA, N.Z. (2017). ^{137}Cs and ^{90}Sr In lizards of Semipalatinsk test site. *Journal of environmental radioactivity*, 166, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.04.034>
- POLETTA, G.L., LARRIERA, A., KLEINSORGE, E., MUDRY, M.D. (2008). Caiman latirostris (Broadsnouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat. Res.* 650 (2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>
- SALVADOR, R.M.V., PIM, F., JÚNIOR, H.A.N., DE ABREU, A.T., PIMENTEL, E.F., DE CERQUEIRA, L.O., ENDRINGER, D.C. (2018). Tropicurus torquatus (Squamata: Tropicuridae) as a bioindicator of heavy metal (aluminum and zinc) pollution in Vila Velha, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 2, p. 1210-1219. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0427-y>
- SARGSYAN, A., SIMONYAN, A., HOVHANNISYAN, G., ARAKELYAN, M., AROUTIOUNIAN, R. (2019). Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in Darevskia lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.10.005>
- SCHAUMBURG, L.G., POLETTA, G.L., SIROSKI, P.A., MUDRY, M.D. (2012). Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard Tupinambis merianae (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.023>
- SCHAUMBURG, L.G., SIROSKI, P.A., POLETTA, G.L., MUDRY, M.D. (2016). Genotoxicity induced by Roundup®(Glyphosate) in tegu lizard (Salvator merianae) embryos. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 130, p. 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.11.009>
- SIMONIELLO, P., FILOSA, S., RIGGIO, M., SCUDIERO, R., TAMMARO, S., TRINCHELLA, F., MOTTA, C.M. (2010). Responses to cadmium intoxication in the liver of the wall lizard Podarcis sicula. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.005>
- SIMONYAN, A., HOVHANNISYAN, G., SARGSYAN, A., ARAKELYAN, M., MINASYAN, S., AROUTIOUNIAN, R. (2018). DNA damage and micronuclei in parthenogenetic and bisexual Darevskia rock lizards from the areas with different levels of soil pollution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 154, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.025>
- SOLIMAN, M.F.M. (2012). Heavy metal pollution across sites affecting the intestinal helminth communities of the Egyptian lizard, *Chalcides ocellatus* (Forskal, 1775). *Environmental monitoring and assessment*, 184(12), 7677-7685. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2528-x>
- UETZ, P., HOŠEK, J. (2016). The Reptile Database. (<http://www.reptile-database.org>. (Acessado em 01.08.2019)).
- VERDERAME, M., LIMATOLA, E., SCUDIERO, R. (2016). Estrogenic contamination by manure fertilizer in organic farming: a case study with the lizard Podarcis sicula. *Ecotoxicology*, 25(1), 105-114. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1571-0>
- VERDERAME, M., SCUDIERO, R. (2019a). Health status of the lizard Podarcis siculus (Rafinesque-Schmaltz, 1810) subject to different anthropogenic pressures. *Comptes rendus biologiques*, 342(3-4), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2019.04.001>
- VERDERAME, M., SCUDIERO, R. (2019b). How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard Podarcis siculus (Rafinesque-Schmaltz, 1810): Histological and Molecular Evidence. *BioMed research international*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4746283>

- ZAPATA, L.M., BOCK, B.C., OROZCO, L.Y., PALACIO, J.A. (2016). Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>
- ZOCHE, J.J., DAMIANI, A.P., HAINZENREDER, G., MENDONÇA, R.A., PERES, P.B., DOS SANTOS, C.E.I., DEBASTIANE, R., DIAS, J.F., DE ANDRADE, V.M. (2013). Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.015>

CAPÍTULO 2

USO DA ESPÉCIE DE LAGARTO *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 COMO BIOINDICADOR DE MUTAGENICIDADE EM REGIÃO DE RADIOATIVIDADE NATURAL

Este artigo será submetido ao periódico Environmental Monitoring and Assessment e, portanto, está formatado de acordo com as recomendações desta revista (<https://www.springer.com/journal/10661>)

Jadna Maria Silva¹, Viviane Souza do Amaral^{1,2}, Júlio Alejandro Navoni^{1,3}, Eliza Maria Xavier Freire^{1,4*}

1. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2. Departamento de Biologia Celular e Genética/UFRN. 3. Programa de Pós-graduação em Uso Sustentável de Recursos Naturais do Instituto Federal do Rio Grande do Norte/ IFRN 4. Departamento de Botânica e Zoologia/UFRN. *E-mail: elizajuju1000@gmail.com

RESUMO

Os seres vivos estão expostos a diferentes fontes de radiação ao longo de sua vida, sendo as fontes naturais a principal causa no ambiente circundante. Altos níveis de radioatividade natural foram detectados em região semiárida do Estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. O uso de espécies endêmicas como bioindicadores de qualidade ambiental têm sido ferramentas úteis para entender o potencial impacto de substâncias tóxicas de áreas impactadas por fatores antrópicos e/ou naturais. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilidade do lagarto *Phyllopezus periosus*, espécie endêmica da caatinga brasileira com habitat saxícola, como bioindicador de qualidade ambiental em áreas com diferentes níveis de antropização e/ou ligado à atividade extrativista em uma região com alta radioatividade natural. Espécimes do lagarto *Phyllopezus periosus* foram coletados em três áreas diferentes, sendo uma área de proteção ambiental e duas localizadas em áreas reconhecidas como tendo alta taxa de radiação natural, sendo uma delas uma área de mineração. A caracterização ambiental dessas áreas foi realizada por meio da medição do teor de metais presentes nos mananciais potencialmente utilizados pelos espécimes coletados e emissores de radiação gama (Urânio, Potássio e Tório). Os desfechos biológicos avaliados foram os micronúcleos e as taxas de anormalidade nuclear em amostras de sangue, a fim de avaliar quaisquer efeitos mutagênicos. Foram encontradas diferenças significativas entre as áreas avaliadas nos níveis de radioatividade de fundo. As diferenças nas frequências de micronúcleos e de anomalias nucleares foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as áreas de estudo. Uma relação entre o nível de radioatividade e o dano genético observado também foi encontrada. Além disso, outras alterações nucleares morfológicas ainda não descritas na literatura são relatadas. Este é o primeiro estudo científico usando *P. periosus* em áreas de fundo de alta radiação natural descrevendo a utilidade potencial desta espécie para avaliar o biomonitoramento da qualidade ambiental.

Palavras chaves: Biomonitoramento; Radioatividade natural; Espécies endêmicas; Teste de micronúcleo.

ABSTRACT

Living beings are exposed to different sources of radiation throughout their lifespan, with natural sources being the main cause in the surrounding environment. High levels of natural radioactivity have been detected in the semi-arid region of the State of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. The use of endemic species as bioindicators of environmental quality have been useful tools to understand the potential impact of toxic substances from impacted areas by anthropic and/or natural factors. In this perspective, this study aimed to assess the usefulness of the *Phyllopezus periosus* lizard, an endemic species of the Brazilian caatinga with saxicolous habitat, as a bioindicator of environmental quality in areas with different anthropization levels and/or linked to the extraction activity in a region with high natural background radioactivity. Specimens of the *Phyllopezus periosus* lizard were collected in three different areas, with one being an environmental protection area and two located in areas recognized as having high natural background radiation, with one of these being a mining area. The environmental characterization of these areas was carried out by measuring the level of metals present in the water sources potentially used by the collected specimens and the gamma radiation emitters (Uranium, Potassium, and Thorium). The biological endpoints assessed were the micronuclei and nuclear abnormality rates in blood samples in order to assess any mutagenic effects. Significant differences among the assessed areas in the background radioactivity levels were found. Differences in micronuclei and nuclear abnormality frequencies were statistically significant ($p < 0.05$) among the study areas. A relationship between the radioactivity level and the observed genetic damage was also found. In addition, other morphological nuclear changes which are still undescribed in literature are reported. This is the first scientific study using *P. periosus* in high natural radiation background areas describing the potential usefulness of this species for assessing environmental quality biomonitoring.

Keywords: Biomonitoring; Natural radioactivity; Endemic species; Micronucleus test.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos vem se observando um aumento no nível de poluição ambiental em escala mundial resultantes, por exemplo, do uso exacerbado de agrotóxicos, incremento de atividades de mineração que redistribuem a liberação de metais no ambiente, até questões armamentistas e de tecnologias com base nuclear dentre outros (Cabarcas-Montalvo et al., 2012; McIntyre e Whiting, 2012; Schaumburg et al., 2016; Panitskiy et al., 2017; Verderame e Scudiero, 2019).

Como consequências, diariamente a biosfera é submetida a variados tipos de substâncias tanto de origem antrópica quanto de ocorrência natural. Portanto, os seres vivos localizados em áreas contaminadas são representações biológicas do exposoma resultante e consequentemente, constituem ferramentas úteis para compreender as consequências biológicas da exposição e representação dos riscos sobre a saúde humana (Hopkins, 2000, Simonyan et al., 2018). Nesse contexto, a seleção de bioindicadores deve cumprir certos pré-requisitos para otimizar a utilidade, tais como, sua ocorrência natural, serem encontrados em abundância na área em questão, ser preferencialmente espécies endêmicas, ter comportamento cientificamente conhecido, apresentar baixa taxa de migração e de deslocamento, além de serem reativos ao/s contaminante/s ambiental/is considerados (Ramsdorf, 2007; Zocche et al., 2013; Parmar et al., 2016). Além disso, a resposta biológica a ser analisada tem de ser sensível em termos analíticos a variações de exposição, configurando assim, como biomarcadora (Zocche et al., 2013; Parmar et al., 2016).

Animais ectotérmicos como os répteis, especialmente lagartos, exibem períodos de atividade metabólica reduzida e, por isso, se tornam mais sensíveis à presença de poluentes ambientais, fator que dificulta e torna mais lenta a sua recuperação, sendo considerados bons modelos experimentais para analisar exposição a diversos poluentes (Schaumburg et al., 2012; Zapata et al., 2016). Outro fator relevante é que os lagartos normalmente são predadores e geralmente estão associados a um habitat específico, além de apresentarem uma mobilidade mais restritiva, tornando-se assim mais suscetíveis à degradação ambiental do que outros vertebrados como aves e mamíferos (Hopkins, 2000; Burger et al., 2004). Apesar de sua utilização ainda ser limitada, são representativos para analisar distintas vias de exposição, desde ingestão de partículas de solo contaminadas (Panitskiy et al., 2017), água e alimentos contaminados (Burger et al., 2004; Marquez-Ferrando et al., 2009), inalação de gases tóxicos, bem como contato dérmico com substâncias tóxicas (Al-Hashem, 2011; McMurry et al., 2012; Sargsyan et al., 2018; Simonyan et al., 2018).

Uma forma eficaz de detectar e avaliar os efeitos de agentes xenobióticos presentes no ambiente é através de biomarcadores de exposição. Muitos destes compostos causam danos ao DNA, além de afetar órgãos, tecidos e/ou fluídos corporais que indicam a ação de contaminantes sobre o organismo, permitindo assim uma avaliação prática e sensível da situação (Ramsdorf, 2007; Capriglione et al., 2011; Galvan, 2011; Mingo et al., 2016; Zapata et al., 2016). Dentre os ensaios mais utilizados para o monitoramento de dano genético em ambientes naturais, destaca-se o Teste de Micronúcleos (MN) por sua relativa simplicidade, rapidez e baixo custo, além de fornecer informação através da análise morfológica das distintas anormalidades genéticas observadas, podendo ser interpretados os acontecimentos biológicos registrados (Zapata et al., 2016; Fenech e Crott, 2002). Levando-se em consideração todo o contexto de utilização de bioindicadores para avaliar danos ambientais, destaca-se que o semiárido brasileiro, especialmente a Caatinga do estado do Rio Grande do Norte (RN), apresenta reservatórios de radiação natural derivadas da presença de afloramentos rochosos do tipo pegmatitos e graníticos, que incluem em sua constituição ionizantes naturais como urânio (^{238}U), rádio (^{226}Ra), tório (^{234}Th) e potássio (^{40}K). Estes elementos químicos apresentam um processo de decaimento natural, no qual liberam subprodutos tóxicos para o ambiente, como polônio (^{210}Po), chumbo (^{206}Pb) e o radônio (^{222}Rn), sendo

este último carcinógeno para humanos (Unsear, 2010; Petta e Campos, 2013; Chaves et al., 2016). Nesse panorama, estudos que utilizem espécies de lagartos endêmicas e de hábito saxícola na Caatinga semiárida podem ser úteis para a compreensão dos impactos ambientais de substâncias tóxicas sobre outros organismos, as quais podem ter consequências sobre a saúde humana. Nessa perspectiva, o lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 apresenta características promissoras a um potencial organismo sentinela para a região semiárida brasileira, tais como, hábito saxícola, endemismo na Caatinga, hábito noturno e alimentação de invertebrados e seiva (Andrade et al., 2016). Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a utilidade do lagarto *P. periosus* como bioindicador de qualidade ambiental decorrente da exposição a ambientes com elevado nível basal de radioatividade natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Espécimes do lagarto *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 foram coletados em distintas áreas do bioma Caatinga no Seridó do Rio Grande do Norte (Figura 1), quais sejam, Estação Ecológica do Seridó –ESEC Seridó, município de Serra Negra do Norte (ES, 06° 34' 36,2" S e 37° 15' 20,7" W); município de Lajes Pintadas (LP, 06° 09' 02" S e 36° 06' 22" W); e Mina Brejuí, município de Currais Novos (MB, 6° 19' 12" S e 36° 33' 06" W).

A ESEC é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, com vegetação do tipo arbóreo-arbustiva, clima semiárido quente e seco e solo arenoso (Varela-Freire, 2002). A fisionomia da vegetação é de Caatinga hiperxerófila, de característica arbóreo-arbustiva, geralmente seca e esparsa, típico de Caatinga *stricto sensu*, além de apresentar densas herbáceas, em especial na estação chuvosa (Varela-Freire, 2002; Veloso et al., 2002). A vegetação arbórea e arbóreo-arbustiva é marcadamente intercalada por afloramentos rochosos, os quais compreendem cerca de 8,5% da área total desta ESEC, com variação de 47 a 56.000 m² de extensão e 2 a 12m de altura (Andrade et al., 2013; Palmeira, 2017).

O município de Lajes Pintadas também está inserido em uma área de Caatinga, contudo menos espessa que a ESEC, com vegetação de Caatinga hipoxerófila, apresentando arbustos e árvores com espinhos e de aspecto menos árido do que a Caatinga hiperxerófila. Nessa área encontra-se inserida na região pegmatítica da Borborema de onde têm sido descritos elevados níveis de radioatividade (Campos et al., 2013; Dantas et al., 2017). Por fim, a área de mineração considerada neste estudo pertence à Mina Brejuí (MB) localizada no município de Currais Novos, a qual atua na atividade extrativista de Scheelita sendo a maior mina de Tungstênio do país, também localizada na região pegmatítica da Borborema. Essa área está caracterizada por uma vegetação hiperxerófila arbóreo-arbustiva de caráter mais seco, com um solo arenoso, mas com áreas de bastante pedregulho (Brasil, 2005). Todas as áreas apresentam radioatividade natural, apenas a ESEC Seridó não possui agentes potencializadores dessa radioatividade, tendo em vista que as outras duas áreas apresentam atividades antropogênicas potencializadoras.

Coleta de amostras

Ao todo foram coletados 41 lagartos da espécie *Phyllopezus periosus* Rodrigues, 1986 nos três locais de estudo para a realização do teste de MN em amostra de sangue. Os animais foram capturados durante excursões a cada uma das três áreas estudadas, no período de dezembro de 2018 a julho de 2019. A coleta e utilização dos lagartos foi autorizada pela Licença SISBIO N° 63437-1. Para entender o cenário de exposição, foram coletadas amostras de água em recipientes plásticos de 2 litros, mantidas em temperatura ambiente, nos locais onde foram

capturados os animais e consideradas possíveis fontes de ingestão para estes. Além disso, a radiação natural do local de coleta dos espécimes foi aferida.

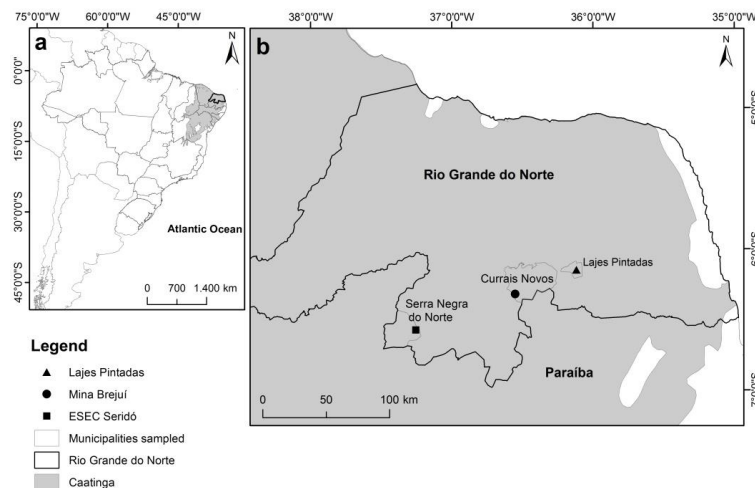


Figura 1 – Localização das áreas de estudo no Estado do Rio Grande do Norte: Municípios de Lajes Pintadas, Currais Novos (Mina Brejuí), e de Serra Negra do Norte (ESEC Seridó).

Análise de amostras

Análise de metais em amostras de água

As amostras de água foram analisadas por meio da quantificação dos seguintes metais: cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, níquel, prata e zinco. A análise foi realizada usando um espectrômetro de absorção atômica modelo VARIAN 240 Fast Sequential. A quantificação foi realizada por uma curva de calibração externa seguindo o protocolo descrito por APHA (2012). O nível de radioatividade em cada um dos locais de coleta de espécimes foi analisado usando um espectrômetro de radiação gama para os elementos U, Th e K. A análise foi realizada usando um equipamento de solução de radiação modelo RS-125.

Análise citogenética usando o teste do micronúcleo

Os lagartos coletados foram anestesiados por resfriamento seguindo o protocolo descrito por Shine et al. (2015). As amostras de sangue foram coletadas por meio de incisão na região ventral dos animais para garantir a quantidade mínima de sangue necessária. É importante notar que a maioria dos estudos descreveu a coleta de sangue pela veia caudal (McIntyre e Whiting, 2012; Schaumburg et al., 2012; Sargsyan et al., 2018). No entanto, isso não foi possível porque os lagartos *P. periosus* não apresentavam sangue suficiente na cauda para justificar o método de amostragem aplicado.

O ensaio do micronúcleo (MN) em eritrócitos de *P. periosus* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Schaumburg et al. (2012), com algumas modificações. Primeiramente, cinco esfregaços de sangue para cada animal foram preparados em lâminas de vidro limpas, secas em temperatura ambiente, fixadas com metanol por 10 min e coradas com Giemsa 10% por 5 minutos. A análise da ocorrência de MN e anormalidades nucleares (AN) foi realizada em microscópio Olympus Cx31 com aumento de 100 X e contagem de 3.000 células por animal.

Foi adotado o critério de Fenech (2007) para a identificação e caracterização de Micronúcleos (MN) e anomalias nucleares (AN), em que o MN deveria apresentar tamanho entre 1/3 e 1/16 do núcleo principal, sendo

morfologicamente idêntico em textura e coloração sem conexões entre eles, sendo facilmente distinguíveis de artefatos no mesmo plano de foco.

Além disso, as frequências de anormalidades nucleares foram analisadas considerando as seguintes categorias: broto nuclear, bleb nuclear, núcleo circular (NC), núcleo fusionado (NF) núcleo ameboide (NA), cromatina condensada (CC) e outras alterações (OA) como aquelas que não se enquadravam em nenhuma outra categoria. A diferença considerada em broto e bleb nuclear foi em relação à espessura da ligação da estrutura com o núcleo, quando a formação era inicial lembrava uma bolha, já o broto, apresentava uma ligação mais fina com o núcleo, lembrando uma “verruga”. Os critérios definidos por Bull et al. (2012) foi usado para CN e FN, com o primeiro sendo representado como um núcleo furado e o último descrito como uma célula binucleada em ponte entre os núcleos.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. A comparação das variáveis entre os grupos foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis. A análise intergrupos foi realizada pelo teste post hoc Games-Howell. A correlação entre as variáveis foi analisada por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Diferenças estatisticamente significativas foram estabelecidas em $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados com o programa IBM SPSS Statistics versão 22.

RESULTADOS

Amostras de água presentes nos afloramentos e ou nas proximidades dos animais capturados foram analisadas para descrever as fontes de exposição a substâncias tóxicas nas áreas de coleta de espécimes. Assim, um total de 6 amostras foram incluídas no estudo: ESEC (2), LP (3) e MA (1).

As concentrações dos metais encontradas nas amostras de água analisadas estão descritas na Tabela 1. Apenas uma amostra apresentou valor limítrofe, enquanto os demais parâmetros ficaram dentro do valor de referência descrito na legislação (CONAMA 357).

Tabela 1: Concentrações de metais em amostras de água (mg / L) coletadas nas três áreas de estudo.

Local	ESEC		LP			MB
	Açude	Lajedo	Serra Manoel Carlos	Riacho I	Riacho II	Fonte artificial
Cádmio	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
Chumbo	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Cobre	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030
Cromo	<0,060	<0,060	<0,060	<0,060	<0,060	<0,060
Ferro	0,511	0,989	1,378	0,247	5,018	0,405
Manganês	<0,020	<0,020	0,308	<0,020	0,139	0,238
Níquel	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Prata	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
Zinco	<0,010	0,013	0,016	<0,010	<0,010	<0,010

- Concentrações não detectáveis são expressas como <limite de detecção do método analítico realizado para cada metal.

- Os resultados destacados em negrito indicam valores acima do valor de referência considerado para a comparação (CONAMA 357).

Os níveis de U, Th e K foram analisados nos locais de coleta de amostras. Os isótopos analisados apresentaram níveis variáveis dependendo do local de amostragem (Tabela 2).

Os menores níveis de potássio foram encontrados na área da ESEC. Em média, LP e MB apresentaram nível 5 vezes maior desse elemento do que o ESEC ($p < 0,01$). Os menores valores de Tório foram encontrados como ESEC, sendo em média 20 vezes maior na área pegmatítica. Finalmente, os níveis mais baixos de urânio foram encontrados na ESEC. A MB apresentou os maiores valores, sendo mais de 2 vezes quando comparado com a área de referência ($p < 0,01$). A dose expressa a intensidade geral da radiação. Como pode ser visto, diferenças estatísticas foram observadas entre as áreas. Os menores valores foram encontrados na área da ESEC, enquanto os maiores foram descritos na MB.

Tabela 2: Nível médio de emissores gama (U, Th, K) em cada área de coleta de amostra.

Elemento/Área	ESEC	LP	MB	Valores de p
⁴⁰K (%)	0,08±0,04	0,53±0,28	0,30±0,11	<0,001
Th (ppm)	0,06±0,02	1,57±0,75	0,93±0,56	<0,010
U (ppm)	2,22±0,51	2,90±0,25	4,67±0,27	<0,001
Dose (nGy/h)	18,78±2,66	22,9±1,80	32,1±4,40	<0,020

As diferenças entre os grupos foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas foram analisadas em $p \leq 0,05$.

-Resultados expressos em média ± erro padrão.

Uma análise de correlação foi realizada para entender o nível de radioatividade de acordo com o local amostrado considerando a dose total observada em cada área. Tanto o potássio quanto o urânio (ρ de Spearman: 0,509 e 0,998 respectivamente) apresentaram correlação positiva e estatisticamente significativa ($p < 0,01$), reforçando as observações anteriormente descritas na classificação das áreas de acordo com a radioatividade encontrada nos locais de amostragem.

Um total de 41 lagartos foram coletados nas áreas de estudo: ESEC (6 espécimes), LP (15 espécimes) e MB (20 espécimes). Os resultados para MN e NA separados por localização são apresentados na Tabela 3. Diferenças significativas foram encontradas para MN ($p < 0,05$). As maiores frequências dessa alteração nuclear foram encontradas em lagartos coletados na LP, com faixa de 0 a 49 MN / 3000 células, enquanto a faixa para espécimes na área de mineração foi de 0 a 21 MN / 3000 células. A soma das anormalidades representadas como NAs foi considerada significativa entre os grupos ($p < 0,01$). A área onde os lagartos mostraram os menores NAs foi a ESEC. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas no SNA quando comparado com as outras duas áreas: ESEC versus LP ($p < 0,01$) e ESEC versus MB ($p < 0,05$). Foram observadas diferenças significativas considerando cada NA separadamente para as áreas de coleta em relação a: Broto ($p < 0,05$), Bleb ($p < 0,01$), Núcleo Ameboide ($p < 0,05$) e OA ($p < 0,05$).

Tabela 3: Micronúcleos e anormalidades nucleares encontradas em eritrócitos de lagartos *P. periosus* por área de amostragem.

Áreas	ESEC	LP	MB	Valores de P
<i>MN</i>	0,40±0,39	7,87±1,45	5,45±0,57	<0,01
<i>Broto</i>	7,20±0,74	17,27±0,68	10,05±0,59	<0,05

<i>Bleb</i>	51,20±2,89	176,13±2,00	105,70±1,42	<0,01
<i>NC</i>	1,20±0,67	0,20±0,24	0,35±0,31	N.S.
<i>FN</i>	0,20±0,44	0,33±0,32	0,50±0,41	N.S.
<i>AN</i>	NO	1,73±0,50	0,80±0,36	<0,05
<i>CC</i>	NO	0,80±0,46	1,20±0,47	N.S.
<i>OA</i>	0,20±0,45	9,13±1,51	1,75±0,34	<0,01
<i>SNA</i>	60,4±21,9	213,4±32,8	125,7±16,2	<0,001

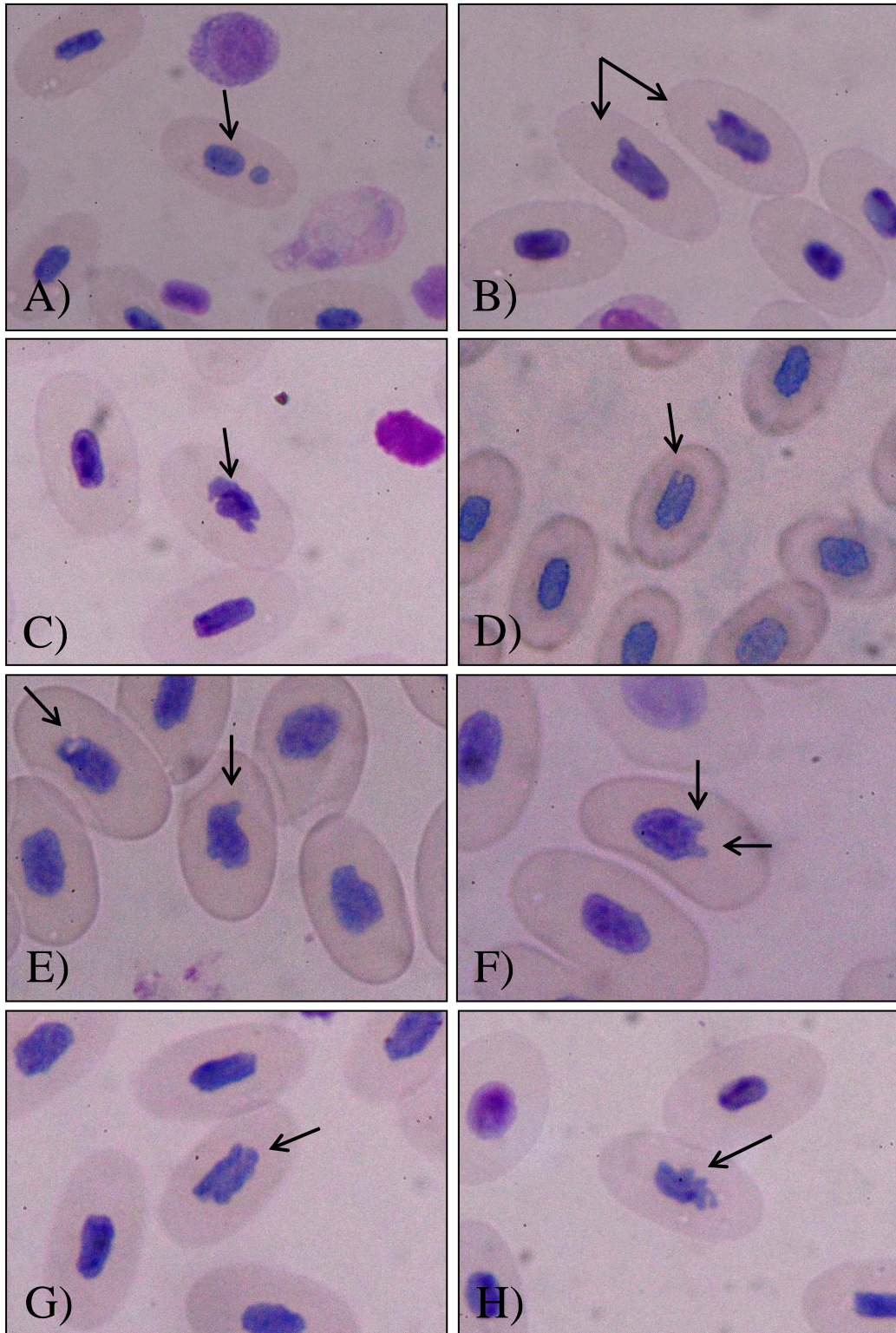
ESEC = ESEC Seridó; LP = Lajes Pintadas; MB = Mina Brejuí; NC = núcleo nuclear; FN = núcleo fundido; AN = núcleo ameboide; CC = cromatina condensada; OA = outras anormalidades; SNA = Soma das anomalias nucleares; NO = não observado.

- Resultados expressos em média ± erro padrão.

As diferenças na frequência de MN foram estatisticamente significativamente correlacionadas com broto (ρ de Spearman: 0,345; $p < 0,05$); Bleb (ρ de Spearman: 0,293; $p < 0,05$); núcleo ameboide (ρ de Spearman: 0,507; $p < 0,001$) e com a soma das anormalidades nucleares (ρ de Spearman: 0,318; $p < 0,05$). Em relação aos radioisótopos medidos, uma relação estatisticamente significativa foi observada entre MN e apenas o nível de potássio (ρ de Spearman: 0,322; $p < 0,05$) e a Dose (ρ de Spearman: 0,463; $p < 0,01$).

As anormalidades morfológicas nucleares encontradas neste estudo considerando os critérios de classificação padronizados (fotos AG) descritos na literatura (Fenech et al., 2007; Bull et al., 2012) são mostradas na Figura 2. Além disso, um número importante de várias anomalias nucleares não classificadas foram encontradas e descritas como (OA) e exemplificadas na (foto H).

Figura 2: Anormalidades nucleares em eritrositos de espécimes de *Phyllopezus periosus*. (A) Micronúcleo; (B) Blebs; (C) Núcleo ameboide; (D) Broto e bleb; (E) Bleb e broto em forma de gancho; (F) Broto e bleb; (G) Núcleo fusionado; (H) Broto e outra anormalidade.



DISCUSSÃO

O Brasil possui um dos maiores reservatórios de radioisótopos (especialmente urânio) do mundo, mas as pesquisas sobre questões de radioatividade natural ainda são escassas (Dantas et al. 2019). Uma série de estudos realizados na última década por este grupo de trabalho descreveu a ocorrência de altos níveis de radioatividade na região semiárida do Estado do Rio Grande do Norte (Marcon et al. 2010; Campos et al. 2013a; 2013b; Dantas et al. 2013; Dantas et al. 2017; Chaves et al. 2016; Marcon et al. 2017; Verçosa et al. 2017).

Esta região inclui uma das mais importantes fontes naturais de urânio e seus subprodutos a nível nacional devido à composição pegmatítica dos afloramentos rochosos. Além disso, altos níveis de potássio e tório também foram descritos (Dantas et al. 2019). A radiação é um fator mutagênico capaz de causar danos ao DNA quando a capacidade do sistema de reparo celular é excedida (Marcon et al. 2017). Assim, o biomonitoramento de áreas com altos níveis de radiação natural tem sido abordado por meio da resposta biológica usando vários bioindicadores, como microrganismos (Dantas et al. 2017), insetos (Verçosa et al. 2017), plantas (Garcia et al. 2011; Dantas et al. 2017), peixes (Chaves et al. 2016) e até mesmo biomonitoramento humano (Marcon et al. 2017). Répteis são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental (Capriglione et al. 2011; Schaumburg et al. 2016; Zapata et al. 2016; Sargsyan et al., 2018; Simonyan et al., 2018) e a maioria dos estudos sobre esses animais usaram ensaios de NM ou cometa para determinar valores de dano de DNA de linha de base como descritores de qualidade ambiental (Poletta et al. 2008; Strunjak-Perovic et al. 2010; Schaumburg et al. 2012; Mohamad e Kadry 2014; Schaumburg et al. 2014). No entanto, um número relativamente pequeno de estudos usou répteis para avaliar os efeitos mutagênicos em ambientes naturais (Marquez-Ferrando et al. 2009; Cabarcas-Montalvo et al. 2012; Zapata et al. 2016; Sargsyan et al. 2018). Nenhum deles foi realizado em território brasileiro (Silva et al. 2020).

As espécies de lagartos foram usadas anteriormente para avaliar a exposição à radioatividade. Por exemplo, um estudo usando a espécie *Lacerta agilis* em uma área de teste de armas nucleares no Cazaquistão foi realizado para avaliar o nível de radionuclídeos no cenário ambiental estudado (Panitskiy et al. 2017). No entanto, nenhum relatório anterior foi encontrado ligando a exposição à radioatividade com danos ao DNA. Entre as áreas investigadas, duas delas apresentavam altos níveis de radiação natural descrevendo diferentes cenários de exposição radioativa. No entanto, a espécie em estudo é saxícola. Portanto, as espécies de *P. periosus* apresentam uma habilidade particular relacionada à exposição direta à radiação natural proveniente das rochas que são o habitat principal da espécie. A alta frequência descrita de micronúcleos e anormalidades nucleares destaca a utilidade potencial do biomonitoramento e reforça a relação causal entre a radioatividade natural e o dano ao DNA.

Mesmo que os radionuclídeos estejam confinados à crosta terrestre, processos de erosão e ações antrópicas favorecem sua redistribuição em diferentes ambientes, dispersando-os por diferentes compartimentos ambientais, como rochas, solos, ar e água (Bleise et al. 2003). Vale ressaltar que os maiores valores de radioatividade natural encontrados aqui foram na área de mineração (Tabela 2). Além disso, a dose de radiação foi fortemente associada aos níveis de urânio medidos. Vários autores apontam que a exposição ao U induz danos ao DNA devido ao estresse oxidativo (Miller et al. 2002; Monleau et al. 2006; Thiebault et al. 2007; Barillet et al. 2011). É importante notar também que alguns estudos realizados no estado do Rio Grande do Norte destacaram uma relação entre a exposição à radiação e os efeitos mutagênicos usando vários modelos experimentais incluindo células humanas de descamação oral (Dantas et al. 2019). Além disso, especulou-se uma associação entre uma alta frequência de câncer observada no semiárido brasileiro com altos níveis de

radioatividade natural (Marcon et al. 2010; Campos et al. 2013a; 2013b; Dantas et al. 2017; Chaves et al. . 2016; Marcon et al. 2017; Verçosa et al. 2017). Considerando que a atividade de mineração permite que elementos radioativos sejam mais expostos e facilita a redistribuição dos diferentes componentes nos compartimentos ambientais, pode-se esperar que influencie a taxa de anormalidade nuclear descrita na área de mineração, sendo pelo menos parcialmente mais associada à carga de exposição a radionuclídeos e outras substâncias, como metais. No entanto, Lajes Pintadas apresentou as maiores frequências de anomalias nucleares na região pegmatítica. Por exemplo, as frequências de gemas, sangramentos e SNA foram estatisticamente maiores em LP em comparação com MB ($p < 0,05$). Essas diferenças podem estar, pelo menos em parte, relacionadas à presença de outros radionuclídeos, como os subprodutos do urânio, particularmente o radônio. Este elemento é um gás incolor, inodoro e insípido que entra no ambiente através do ar e da água. Outros relatórios realizados por este grupo têm mostrado altos níveis de radônio em Lajes Pintadas e outras localidades do Estado do Rio Grande do Norte, e sua associação com danos genéticos reforça essa especulação (Campos et al. 2013a; Campos et al. 2013b; Dantas et al. . 2017; Marcon et al. 2017).

Além da radiação natural descrita, outras substâncias podem estar contribuindo para a carga xenotóxicas. Em um estudo realizado em uma área de mineração de carvão na Colômbia, os efeitos genotóxicos nas células sanguíneas de *Iguana iguana* (lagarto) e *Mus musculus* (roedor) foram realizados por meio do teste de MN e mostraram maior frequência de MN em áreas próximas às áreas de mineração em comparação com os resultados obtidos em uma área não antropizada (Cabarcas-Montalvo et al. 2012).

Outro estudo mostrou o teor de metais pesados em anuros, utilizando *Hypsiboas faber* capturados em uma área de mineração de carvão vegetal foi significativamente maior do que aqueles observados em espécimes coletados em uma área protegida, e uma correlação associada entre exposição e danos ao DNA foi descrita (Zocche et al. 2013). Estudos observacionais e experimentais mostraram a relação entre a exposição a metais e estresse oxidativo, distúrbios neurológicos, disfunção mitocondrial e aberrações cromossômicas, entre outros resultados (Stackelberg et al. 2015; Menezes-filho et al. 2016; Marcon et al. 2017).

Assim, considerando condições de habitat semelhantes descritas nos estudos acima mencionados com respeito ao habitat de *P. periosus*, pode-se hipotetizar que outros fatores de influência, como altas concentrações de metais, também podem estar contribuindo para o efeito mutagênico observado. No entanto, a área de mineração onde parece não ter influência no efeito mutagênico observado.

Estudos realizados em áreas poluídas usando as espécies de lagartos *Darevskia armeniaca* e *D. raddei* não mostraram diferenças na frequência de MN quando comparados com áreas de controle (Simonyan et al. 2018; Sargsyan et al. 2018). Assim, duas questões surgem ao considerar esses fatos: uma está relacionada à biodisponibilidade dos metais e a segunda à suscetibilidade das espécies à exposição aos metais. Uma frequência MN basal interespecies foi observada em outros estudos realizados por este grupo (dados não publicados).

Assim, *P. periosus* parecia ser mais vulnerável aos efeitos de agentes mutagênicos, como a radiação natural. Fatores como o metabolismo mais lento da espécie (característica de espécies noturnas), juntamente com sua pele mais delicada (característica do grupo Gekkota), podem estar contribuindo para a resposta observada. Portanto, as espécies de *P. periosus* podem ser mais sensíveis e conseqüentemente mais adequadas como biomonitoras da qualidade ambiental.

Outro ponto importante que valida a existência de agentes ambientais causando danos em nível molecular é a ocorrência de alta frequência de algumas anomalias nucleares particulares. Por exemplo, uma alta frequência de blebs que é considerado um pré-broto. Essas anormalidades nucleares representam uma exacerbação da expressão genética, o que significa desregulação da maquinaria celular. Por exemplo, um estudo

experimental utilizando embriões de teiú (*Salvator merianae*) em que a genotoxicidade induzida foi analisada por exposição ao Roundup, resultando em alta frequência de gemas nucleares sendo observadas (Schaumburg et al. 2016). Os autores relacionaram essa anormalidade nuclear a mudanças em: divisão celular, processos de morte celular, amplificação gênica e mutagenicidade. É importante destacar que o efeito mutagênico observado neste estudo foi superior ao relatado no protocolo experimental citado, fato que reforça a ideia de que substâncias naturais, e em particular metais e / ou elementos radioativos, parecem ter um papel significativo na o tipo e a resposta genética encontrados.

CONCLUSÃO

Tendo em vista que um grande número de contaminantes ambientais pode provocar danos ao DNA e a utilidade do biomonitoramento ambiental no estudo de áreas impactadas, este relatório descreveu o padrão de dano genético apresentado pelo lagarto *Phyllopezus periosus* pela primeira vez. Além disso, considerando o cenário ambiental estudado que apresenta níveis basais elevados e variáveis de radioatividade natural, este trabalho destaca que esse estressor ambiental pode ter um papel importante no dano genético observado.

Por fim, foi encontrada uma alta frequência de outras anormalidades nucleares ainda não descritas. Outros estudos experimentais objetivam validar a utilidade da espécie *Phyllopezus periosus* como bioindicador de qualidade ambiental, principalmente em áreas com alto fundo de radioatividade natural como os observados neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Dr. Thomas Ferreira da Costa Campos, do laboratório de radioatividade natural LARANA / UFRN, por sua assistência na determinação de emissores gama de radionuclédeos. Também agradecemos à CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos concedida. EMXF agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa (processo 313661 / 2017-0).

REFERÊNCIAS

- AL-HASHEM, M.A.. (2011). Evidence of hepatotoxicity in the sand lizard *Acanthodactylus scutellatus* from Kuwait's Greater Al-Burgan oil field. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74(5), 1391-1395. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.021>
- ANDRADE, M.J.M., SALES, R.F.D., FREIRE, E.M.X. (2013). Ecology and diversity of a lizard community in the semiarid region of Brazil. *Biota Neotropica*. 13, 199-209. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300023>
- ANDRADE, M.J.M., CARVALHO, G.A.B., KOLODIUK, M.F., JORGE, J.S., FREIRE, E.M.X. (2016). *Phyllopezus periosus* (Paraíba Gecko). *Tree sap foragins. Herpetological Review*. 47, 672-673.
- APHA (American Public Health Association). (2012). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- BARILLET, S., ADAM-GUILLERMIN, C., PALLUEL O., PORCHER, J.M., DEVAUX, A. (2011). Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 2, p. 495-502, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.013>

- BLEISE, A., DANESI, P.R., BURKART, W. (2003). Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93-112. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(02)00041-3)
- BRASIL. (2005). Ministerio de Minas e Energia. Secretaria De Geologia, Mineração E Transformação Mineral. Diagnóstico Do Município de Currais Novos. http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/16955/rel_currais_novos.pdf?sequence=1
- BULL, C.F., MAYRHOFER, G., ZEEGERS, D., MUN, G.L.K., HANDE, M.P., FENECH, M.F. (2012). Folate deficiency is associated with the formation of complex nuclear anomalies in the cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 53(4), 311-323. <https://doi.org/10.1002/em.21688>
- BURGER, J., CAMPBELL, K.R., CAMPBELL, T.S. (2004). Gender and spatial patterns in metal concentrations in brown anoles (*Anolis sagrei*) in southern Florida, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(3), 712-718. <https://doi.org/10.1897/02-647>
- CABARCAS-MONTALVO, M.L., OLIVERO-VERBEL, J., CORRALES-ALDANA, H. (2012). Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci Total Environ.* Feb 1;416:208-14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.080>
- CAMPOS, T.F., PETTA, R.A., MALANCA, A., PASTURA, V.F.S., SICHEL, S.E., MOTOKI, A. (2013a). O gás radônio e a radiação natural em terrenos metagraníticos e pegmatíticos: o caso do município de Lages Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). *Revista de Geologia*, 26(2), 45-52.
- CAMPOS, T.F.C., PETTA, R.A., MALANCA, A., PASTURA, V.F.S., SICHEL, S.E., MOTOKI, A. (2013b). O gás radônio doméstico e a radioatividade natural em terrenos metamórficos: o caso do município de Lucrécia (Rio Grande do Norte, Brasil). *Geologia*, 26(02).
- CAPRIGLIONE, T., DE IORIO, S., GAY, F., CAPALDO, A., VACCARO, M.C., MORESCALCHI, M.A., LAFORGIA, V. (2011). Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, 20(4), 885. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0655-8>.
- CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L., MYERS, M.S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>
- CHAVES, L.C.C., NAVONI, J.A., DE MORAIS, F.D., DE MEDEIROS, S.R.B., DA COSTA, T.F., PETTA, R.A., DO AMARAL, V.S. (2016). Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 1, p. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5993-2>
- DA COSTA DANTAS, R., NAVONI, J.A., DE ALENCAR, F.L.S., DA COSTA XAVIER, L.A., DO AMARAL VS. (2019). Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 143-157. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06962-6>
- DA COSTA DANTAS, R., ALVES, N.O., FERREIRA, D.M., CAMPOS, T.F.C., PETTA, R.A., MEDEIROS, G.F.F., AMARAL, V.S. (2013). Uso da Ecotoxicologia na investigação da toxicidade associada à radiação natural no açude Riacho da cachoeira, região do semiárido/Brasil. *Geologia*, 26(02).
- FENECH, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- FENECH, M. and CROTT, J.W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block

- micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 131-136. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00086-6)
- FENECH, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- FREIRE, E.M.X., SKUK, G.O.S., KOLODIUK, M.F., RIBEIRO, L.B., MAGGI, B.S., RODRIGUES, L.S., VIEIRA, W.L.S., FALCÃO, A.C.G.P. (2009). Répteis das Caatingas do seridó do Rio Grande do Norte e do cariri da Paraíba: síntese do conhecimento atual e perspectivas. Pp. 51-84. In: Recursos naturais das Caatingas: uma visão multidisciplinar. E.M.X. Freire (org.). EDUFRN, Natal, RN, Brasil.
- GARCIA, A.C.F.S., MARCON, A.E., DE MORAIS FERREIRA, D., DOS SANTOS, E.A.B., DO AMARAL, V.S., DE MEDEIROS, S.R.B. (2011). Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(12), 3329-3335. <https://doi.org/10.1039/C1EM10582E>
- HOPKINS, W.A. (2000). Reptile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 19:2391–2393. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191001>
- MARCON, A.E., FERREIRA, D.M., MOURA, M.F.V., CAMPOS, T.F., AMARAL, V.S., AGNEZ-LIMA, L.F., MEDEIROS, S.R.B. (2010). Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere* 81(6):773–780 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.006>
- MARCON, A.E., NAVONI, J.A., DE OLIVEIRA GALVAO, M.F., GARCIA, A.C.F.S., DO AMARAL, V.S., PETTA, R.A., CAMPOS, T.F.C., PANOSSO, R., QUINELATO, A.L., DE MEDEIROS, S.R.B. (2017). Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. *Chemosphere*, 167, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.136>
- MÁRQUEZ-FERRANDO, R., SANTOS, X., PLEGUEZUELOS, J.M., ONTIVEROS, D. (2009). Bioaccumulation of heavy metals in the lizard *Psammmodromus algirus* after a tailing-dam collapse in Aznalcóllar (Southwest Spain). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(2), 276. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9189-3>
- MCINTYRE, T.L. and WHITING, M.J. (2012). Increased metal concentrations in giant sungazer lizards (*Smaug giganteus*) from mining areas in South Africa. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012 Nov;63(4):574-85. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9795-y>
- MCMURRY, S.T., JONES, L.E., SMITH, P.N., COBB, G.P., ANDERSON, T.A., LOVERN, M.B., COX, S., PAN, X. (2012). Accumulation and effects of octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5, 7-tetrazocine (HMX) exposure in the green anole (*Anolis carolinensis*). *Ecotoxicology*, 21(2), 304-314. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0791-1>
- MILLER, A.C., STEWART, M., BROOKS, K., SHI, L., PAGE, N. (2002). Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* 91, 246e252. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00391-4)
- MINGO, V., LÖTTERS, S., WAGNER, N. (2016). The use of buccal swabs as a minimal-invasive method for detecting effects of pesticide exposure on enzymatic activity in common wall lizards. *Environmental pollution*, 220, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.022>
- MOHAMAD, H.R., KADRY, M.A. (2014). Study of Chromosomal and DNA Damage Baseline Level in Two Subspecies of Chamaeleo Chamaeleon in Egypt Using Micronucleus and Comet Assays. *International Journal of Science and Research*, 3(6), 2642-2644.

- MONLEAU, M., DE MÉO, M., PAQUET, F., CHAZEL, V., DUMÉNIL, G., DONNADIEU-CLARAZ, M. (2006). Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol. Sci.* 89, 287e295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj010>
- OLIVEIRA, M., AHMAD, I., MARIA, V.L., FERREIRA, C.S.S., SERAFIM, A., BEBIANNO, M.J., PACHECO, M., SANTOS, M.A. (2010). Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.003>
- PANITSKIY, A.V., LUKASHENKO, S.N., KADYROVA, N.Z. (2017). ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr In lizards of Semipalatinsk test site. *Journal of environmental radioactivity*, 166, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.04.034>
- PARMAR, T.K., RAWTANI, D., AGRAWAL, Y.K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in life science*, 9(2), 110-118. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
- PETTA, R.A., CAMPOS, T.F.C. (2013). O gás radônio e suas implicações para a saúde pública. *Revista de Geologia*, 26(2), 7-18.
- POLETTA, G.L., LARRIERA, A., KLEINSORGE, E., MUDRY, M.D. (2008). Caiman latirostris (Broadsnouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat. Res.* 650 (2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>
- SARGSYAN, A., SIMONYAN, A., HOVHANNISYAN, G., ARAKELYAN, M., AROUTIOUNIAN, R. (2019). Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.10.005>
- SCHAUMBURG, L.G., POLETTA, G.L., SIROSKI, P.A., MUDRY, M.D. (2012). Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.023>
- SCHAUMBURG, L.G., POLETTA, G.L., SIROSKI, P.A., MUDRY, M.D. (2014). Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): the effect of age. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 766, 5-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.03.007>
- SCHAUMBURG, L.G., SIROSKI, P.A., POLETTA, G.L., MUDRY, M.D. (2016). Genotoxicity induced by Roundup®(Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 130, p. 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.11.009>
- SHINE, R., AMIEL, J., MUNN, A.J., STEWART, M., VYSSOTSKI, A.L., LESKU, J.A. (2015). Is “cooling then freezing” a humane way to kill amphibians and reptiles?. *Biology open*, 4(7), 760-763. <https://doi.org/10.1242/bio.012179>
- SILVA, J.M., NAVONI, J.A., FREIRE, E.M.X. (2020). Lizards as model organisms to evaluate environmental contamination and biomonitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(7), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08435-7>
- SIMONYAN, A., HOVHANNISYAN, G., SARGSYAN, A., ARAKELYAN, M., MINASYAN, S., AROUTIOUNIAN, R. (2018). DNA damage and micronuclei in parthenogenetic and bisexual *Darevskia* rock lizards from the areas with different levels of soil pollution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 154, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.025>

- STRUNJAK-PEROVIC, I., LISICIC, D., COZ-RAKOVAC, R., JADAN, M., BENKOVIC, V., TADIC, Z. (2010). Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicology*, 19(8), 1460-1465. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0531-y>
- UNSCEAR, 2010. Summary of low-dose radiation effects on health, United Nations, Vienna. <http://www.unscear.org>
- VARELA-FREIRE, A.A. (2002). A Caatinga hiperxerófila Seridó, a sua caracterização e estratégias para a sua conservação. São Paulo, ACIESP. 39p.
- VELLOSO, A.L. (2002). Ecorregiões propostos para o bioma da caatinga. Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil; Recife; associação Plantas do Nordeste.
- VERÇOSA, C.J., DE MORAES FILHO, A.V., DE ARAÚJO CASTRO, I.F., DOS SANTOS, R.G., CUNHA, K.S., E SILVA, D.D.M., GARCIA, A.C.L., NAVONI, J.A., DO AMARAL, V.S., ROHDE, C. (2017). Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. *Ecotoxicology and environmental safety*, 141, 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.024>
- VERDERAME, M., SCUDIERO, R. (2019). How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810): *Histological and Molecular Evidence. BioMed research international*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4746283>
- ZAPATA, L.M., BOCK, B.C., OROZCO, L.Y., PALACIO, J.A. (2016). Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>
- ZOCHE, J.J., DAMIANI, A.P., HAINZENREDER, G., MENDONÇA, R.A., PERES, P.B., DOS SANTOS, C.E.I., DEBASTIANE, R., DIAS, J.F., DE ANDRADE, V.M. (2013). Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.015>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão de literatura acerca do conhecimento atual disponível em nível mundial nos últimos dez anos (2009-2019), sobre a utilização de espécies de lagartos para testes de contaminantes e para biomonitoramento de áreas contaminadas, possibilitou constatar incremento no número de estudos sobre essa temática; entretanto, ainda há muito a se avaliar, tendo em vista que existem poucos estudos em campo sob situações reais, utilizando lagartos como biomonitores e ainda se tem muito mais a se abordar e a se comparar. A efetivação deste estudo em campo através da utilização do lagarto *P. periosus* como biomonitor ambiental, possibilitou constatar que o mesmo responde às alterações ambientais, sendo considerado um bom organismo biomonitor. Partindo do princípio que o ambiente apresenta inúmeras variáveis, destacamos que a radiação natural é um grande fator de risco a toda a biota, por isso é necessário compreender todas as suas possíveis consequências e a utilização de organismos biomonitores se torna importante nesse processo. Os dados deste estudo irão contribuir em um projeto maior para a elaboração do mapa de risco toxicológico.

REFERÊNCIAS DA PARTE INTRODUTÓRIA DA DISSERTAÇÃO

AFONSO J. C. 2009. Elemento Químico Radônio. Química Nova Vol. 32.
http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc32_4/09-EQ10909.pdf

AL-SABTI, K., METCALFE, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v.343, p. 121-135.

ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; EL-DEIR, A. C. A.; LIMA, A. L. A.; SOUTO, A.; BEZERRA, B. M.; FERRAZ, E. M. N.; FREIRE, E. M. X.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CASAS, F. M. G. L.; MOURA, G. J. B.; PEREIRA, G. A.; MELO, J. G.; RAMOS, M. A.; RODAL, M. J. N.; SCHIEL, N.; LYRA-NEVES, R. M.; ALVES, R. R. N.; AZEVEDO JUNIOR, S. M.; TELINO JUNIOR, W. R.; SEVERI, W. 2012. Caatinga Revisited: Ecology and Conservation of an Important Seasonal Dry Forest. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1-18.

ALVALÁ, R.; CUNHA, A. P.; BRITO, S. S.; SELUCHI, M. E.; MARENGO, J. A.; MORAES, O. L.; & CARVALHO, M. A. 2017. Drought monitoring in the Brazilian Semiarid region. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, (AHEAD), 0-0.

ANDRADE, M.J.M.; SALES, R.F.D. & FREIRE, E.M.X. 2013. Ecology and diversity of a lizard community in the semiarid region of Brazil. *Biota Neotropica*, 13: 199-209.

AMADO, L.L.; ROSA, C.E.; LEITE, A.M.; MORAES, L.; PIRES, W.V.; PINHO, G.L.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A. 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 199-206.

ANGELIM, L. A. A.; MEDEIROS, V. C.; NESI, J. R. 2006. Programa Geologia do Brasil - PGB. Projeto Mapa Geológico e de Recursos Minerais do Estado do Rio Grande do Norte. Mapa Geológico do Estado do Rio Grande do Norte. Escala 1:500.000. Recife: CPRM/FAPERNA, 2006.

BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir – São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, v. 44, p. 289-305.

BARBOSA, M. R. V.; ARZABE, C.; ATTAYDE, J. L.; BANDEIRA, A. G.; CRISPIM, M. C.; FREIRE, E. M. X. ; LUCENA, J. E. ; PANOSSO, R.; QUIRINO, Z. G. M.; SOUZA, J. E. R. T.; XIMENES, M. F. F. M. 2013. Caatinga: Estrutura e Funcionamento de Ambientes Terrestres e Aquáticos. In: Marcelo Tabarelli; Carlos Frederico Duarte da Rocha; Helena Piccoli Romanowski; Odete Rocha; Luiz Drude de Lacerda. (Org.). PELD/CNPq: Dez Anos do Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração no Brasil: Achados, Lições e Perspectivas. 1 ed. Recife-PE: Ed. Universitária da UFPE. 443 Pp.

BARILLET S.; ADAM-GUILLERMIN, C.; PALLUEL, O.; PORCHER, J. M.; & DEVAUX, A. 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 2, p. 495-502, 2011.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, v.44, p.383-392.

BRASIL. 2005a. Ministerio de Minas e Energia. Secretaria De Geologia, Mineração E Transformação Mineral. Diagnóstico Do Município de Currais Novos. http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/16955/rel_currais_novos.pdf?sequence=1

BRASIL. 2005b. Ministerio de Minas e Energia. Secretaria De Geologia, Mineração E Transformação Mineral. Diagnóstico Do Município de Lajes Pintadas. <http://www.cprm.gov.br/rehi/atlas/rgnorte/relatorios/LAJE075.PDF>

BYAKATONDA, J.; PARIDA, B. P.; & KENABATHO, P. K. 2018. Relating the dynamics of climatological and hydrological droughts in semiarid Botswana. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*.

CABARCAS-MONTALVO M.L.; OLIVERO-VERBEL J; CORRALES-ALDANA H. 2012. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. Sci Total Environ. Feb 1;416:208-14.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JR, J.F.; MORENO, P. 2005. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. Navegando o Rio das velhas das Minas aos Gerais, v. 1, p. 1-12.

CAMPOS, T. F.; PETTA, R. A.; MALANCA, A.; PASTURA, V. F. S.; SICHEL, S. E.; MOTOKI, A. 2013. O gás radônio e a radiação natural em terrenos metagraníticos e pegmatíticos: o caso do município de Lages Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). *Revista de Geologia*, 26(2), 45-52.

CAPRIGLIONE, T.; DE IORIO, S.; GAY, F.; CAPALDO, A.; VACCARO, M. C.; MORESCALCHI, M. A.; LAFORGIA, V. 2011. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, 20(4), 885.

CHAVES, L. C. C.; NAVONI, J. A.; DE MORAIS F. D.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.; FERREIRA DA COSTA, T.; PETTA, R. A.; SOUZA DO AMARAL, V. 2016. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 1, p. 1-10.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. 2003. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance.

DANTAS, S.R.C. 2011. Análise da toxicidade no açude riacho da cachoeira, Lajes Pintadas (RN): um desafio interdisciplinar. Dissertação de Mestrado, Programa Regional em Desenvolvimento e Meio-Ambiente. Natal, Rio Grande do Norte.

DANTAS, S.R.C., ALVES, N.O., FERREIRA, D.M., CAMPOS, T. F.C., PETTA, R. A., MEDEIROS, G.F.F., & AMARAL, V.S. 2013. Uso da Ecotoxicologia na investigação da toxicidade associada à radiação natural no açude Riacho da cachoeira, região do semiárido/Brasil. *Geologia*, 26(02).

DASCANIO, D.; RODRIGUES, O. M. R.; VALLE, T. G. M. 2010. Relação entre os estilos parentais e o desempenho intelectual de crianças com plumbemia. *Avaliação Psicológica*, 9, 461-470.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, v. 319, p. 167-177, 1993.

FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.

FENECH, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.; SURRALLE, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.

FREIRE, E.M.X.; SKUK, G.O.S.; KOLODIUK, M.F.; RIBEIRO, L.B.; MAGGI, B.S.; RODRIGUES, L.S.; VIEIRA, W.L.S & FALCÃO, A.C.G.P. 2009. Répteis das Caatingas do seridó do Rio Grande do Norte e do cariri da Paraíba: síntese do conhecimento atual e perspectivas. Pp. 51-84. In: Recursos naturais das Caatingas: uma visão multidisciplinar. E.M.X. Freire (org.). EDUFRN, Natal, RN, Brasil.

GALVAN, G. L. 2011. Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae).

HOSE, J.E.; CROSS, J.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Mar. Environ. Res*, v. 22, p. 167-176.

IPEN, 2002 - BELLINTANI, S. A.; GILI, F. das Neves - Noções Básicas de Proteção Radiológica, Apostila do IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares 2002 . Disponível em: <http://www.engeworks.com.br/arquivos/>

JOHANSEN MP1, TWINING JR. 2010. Radionuclide concentration ratios in Australian terrestrial wildlife and livestock: data compilation and analysis. *Radiat Environ Biophys.* 2010 Nov;49(4):603-11. doi: 10.1007/s00411-010-0318-9. Epub 2010 Aug 15.

LEITÃO, M.A.S.; AFFONSO, E.G.; da SILVA, M.F.E.; MEIRELLES, N.C.; RANTIN, F.T.; VERCESI, A.E.; JUNQUEIRA, V.B.C.; DEGTEREV, I.A. The liver monooxygenase system of brazilian freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 126, p. 29-38. 2000.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 197-201. 2005.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, v. 57, p. 195- 211. 1993.

MALANCA, A.; REPETTI, M.; DE MACÊDO, H.R. 1998. Gross alpha- and betaactivities in surface and groundwater of Rio Grande do Norte, Brazil. *Appl Radiat Isotopes* 49:893–898

MARCON, A.E.; FERREIRA, D.M.; MOURA, M.F.V.; CAMPOS, T.F.; AMARAL, V.S.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. 2010. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere* 81(6):773–780

MARCON, A.E.; NAVONI, J.A.; DE OLIVEIRA GALVÃO, M.F.; GARCIA, A.C.F.S.; DO AMARAL, V.S.; PETTA, R.A.; CAMPOS, T.F.C.; PANOSSO, R.; QUINELATO, A.L.; DE MEDEIROS, S.R.B. 2017. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. *Chemosphere*, 167, 36-43.

MARTÍNEZ, N.; FELDMAN, G.; GRANGER, S.; CHAIN, S.; SORIA, N. 2013. Intoxicación con plomo: evaluación clínica y estudios complementarios en niños. *Rev. Cienc. Salud.* 10 (Especial): 9-15 / 9.

MCINTYRE, T.L.; WHITING, M.J. 2012. Increased metal concentrations in giant sungazer lizards (*Smaug giganteus*) from mining areas in South Africa. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012 Nov;63(4):574-85.

MINGO, V.; LÖTTERS, S.; WAGNER, N. 2016. The use of buccal swabs as a minimal-invasive method for detecting effects of pesticide exposure on enzymatic activity in common wall lizards. *Environmental pollution*, 220, 53-62.

National Center for Biotechnology Information. Radon. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Radon>>. Acesso em: 24 julho 2019.

NASRI, I.; HAMMOUDA, A.; HAMZA, F.; ZRIG, A.; SELMI, S. 2017. Heavy metal accumulation in lizards living near a phosphate treatment plant: possible transfer of contaminants from aquatic to terrestrial food webs. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(13), 12009-12014.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E.M. 2016. Física das radiações. Oficina de textos.

OSSANA, N. A.; SALIBIÁN, A. 2013. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1), 67-74.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in life science*, 9(2), 110-118.

PETTA, R.A.; & CAMPOS, T.F.C. O gás radônio e suas implicações para a saúde pública. *Revista de Geologia*, 26(2), 7-18. 2013.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, v. 97, p. 287-292. 2005.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri-UFPR). 2007.

SALVADOR, R. M. V.; PIM, F.; JÚNIOR, H. A. N.; DE ABREU, A. T.; PIMENTEL, E. F.; DE CERQUEIRA, L. O.; ENDRINGER, D. C. 2018. *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) as a bioindicator of heavy metal (aluminum and zinc) pollution in Vila Velha, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 2, p. 1210-1219.

SAMET, J.M. Radiation and câncer risk: a continuing challenge for epidemiologists. *Environmental Health*. 10(Suppl):S4. 2011. <http://www.ehjournal.net/content/10/SI/S4>

SAZYKINA T. L.; KRYSHEV, II. Radiation effects in wild terrestrial vertebrates - the EPIC collection. *J Environ Radioact*. 88(1):11-48. Epub 2006 Feb 23. 2006.

SARGSYAN, A.; SIMONYAN, A.; HOVHANNISYAN, G.; ARAKELYAN, M.; & AROUTIOUNIAN, R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2018.

SCHAUMBURG, L. G.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L.; MUDRY, M. D. Genotoxicity induced by Roundup®(Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 130, p. 71-78, 2016.

SHINE, R.; AMIEL, J.; MUNN, A. J.; STEWART, M.; VYSSOTSKI, A. L.; LESKU, J. A. 2015. Is “cooling then freezing” a humane way to kill amphibians and reptiles?. *Biology open*, 4(7), 760-763.

TAYLOR, S.; MCINTOSH, A.; WALKER, T. The collapse of ‘geologic time’. *Creation*, v. 23, n. 4, p. 30-34. 2001.

THEODORAKIS, C.W.; BICKHAM, J.W.; LAMB, T. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA, *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 20, p. 317-326.2001.

TORREZANI, N. C.; DE OLIVEIRA, E. F. 2013. Problemas ambientais decorrentes da exploração do carvão mineral e a aplicação da ecotoxicologia aquática como ferramenta de biomonitoramento. *Oecologia Australis*, 17(4), 509-521.

UNSCEAR. Summary of low-dose radiation effects on health, United Nations, Vienna. 2010.
<http://www.unscear.org>

VARELA-FREIRE, A.A. 2002. A Caatinga hiperxerófila Seridó, a sua caracterização e estratégias para a sua conservação. São Paulo, ACIESP. 39p.

VEGA, J.; DE COLL, J.; LERMO, J.; ESCOBAR, J.; DÍAZ, M.; CASTRO, J. Niveles intelectuales y ansiedad en niños con intoxicación plúmbica crónica: Colegio "María Reiche". *Anales de la Facultad de Medicina, Callao-Perú*, 66, (2),142- 147.2005.

VELLOSO, A. L. 2002. Ecorregiões propostos para o bioma da caatinga. Instituto de Conservacao Ambiental The Nature Conservancy do Brasil; Recife; associacao Plantas do Nordeste.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 143, p.187-195. 2006.

ZAPATA, L. M., BOCK, B. C., OROZCO, L. Y., & PALACIO, J. A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 108-116. 2016.

ZENG, D.; LI, Y.; LIN, Q. Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China, *Mutation Research*, v. 426, p. 19-161.1999.