



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS-
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Estudo toxicológico de solos contaminados por petróleo usando o
camundongo silvestre *Calomys laucha* Olfers 1818

Krissia Aparecida de Almeida

Rio Grande, abril de 2015.

Estudo toxicológico de solos contaminados por petróleo usando o
camundongo silvestre *Calomys laucha* Olfers 1818

Krissia Aparecida de Almeida

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Fisiológicas –
Fisiologia Animal Comparada, do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande – FURG como
parte dos requisitos necessários a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Fisiológicas.

Banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luíza Muccillo-Baisch

Co-orientador: Prof. Dr. Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior

Profa. Dra. Juliane Ventura Lima

Profa. Dra. Mariângela Heppe-Lopes (Membro externo – UFPel)

Rio Grande, abril de 2015.

*“Dedico este trabalho ao meu filho amado e querido, Kauã Guilherme Almeida
Correa”.*

AGRADECIMENTOS

Neste momento, só consigo pensar em uma palavra: RESILIÊNCIA. Foram tantos obstáculos e adversidades que agradeço a Deus por não me deixar entrar em surto. Pois bem, aqui estou! Única e exclusivamente por ele: Meu filho lindo, Kauã!! Companheiro e meu maior tesouro que tantas vezes deixei de dar a atenção merecida para poder cumprir com minhas atividades, mas sei que ele será o maior beneficiado de tudo isso!

Aos meus pais, Vantoir e Luci e minhas irmãs Karine e Karolina que incondicionalmente me deram apoio, amor, carinho e atenção mesmo estando a mais de 3.000 km de distância. Amo muito vocês!

Agradeço a minha querida Orientadora Ana Luíza Muccillo Baisch, pela acolhida, ajuda nas questões pessoais e profissionais e além disso, de me proporcionar experiências fora do PPGCF-FAC, onde pude realizar e participar de projetos paralelos ao meu com olhar mais humano.

Ao meu lindo e querido co-orientador, Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior (morro de ciúmes) pela amizade, paciência, dedicação, ensinamentos, conselhos, incentivos e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade e não desistir de mim. Pelos presentes (não retribuídos, AINDA!) mais cheirosos e uns nem tanto, mas sempre com aquela criatividade e humor incrível “né véi” ??

Aos integrantes do LEFT e NANOBio, em especial às minhas estagiárias, mas que prefiro chama-las de amigas: Carol, Isis, Dienefer e

Letícia por toda ajuda e comprometimento com os trabalhos realizados em laboratório e fora dele também.

Minha amiga querida Nana, que esteve do meu lado o tempo todo, principalmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigada!

À Gianni, sempre prestativa e disposta a ajudar de coração, tanto nos assuntos relacionados ao trabalho como na vida pessoal.

Banca examinadora da dissertação, pelo aceite e contribuições que deram ao meu trabalho.

CAPES, pela concessão da bolsa;

Professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da FURG.

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVO GERAL	16
ARTIGO 1	17
Resumo.....	17
Introdução	18
Material e métodos	20
Resultados	23
Discussão	30
Conclusão.....	34
Referências bibliográfica	35
ARTIGO 2	43
Abstract.....	43
Introduction	44
Material and methods	46
Results and discussion	48
References	53
ARTIGO 3	57
Abstract.....	57
Introduction	58
Material and methods	60
Results and discussion	61
References.....	64

DISCUSSÃO GERAL	67
BIBLIOGRAFIA GERAL	70

RESUMO GERAL

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, outros compostos orgânicos além de baixas concentrações de elementos metálicos. Este combustível fóssil se caracteriza como importante contaminante em regiões industriais e urbanizadas e em função da complexidade de sua constituição química pode causar uma extensa gama de prejuízos à saúde dos organismos expostos. Uma vez no solo, o petróleo pode intoxicar a fauna residente e causar prejuízos em nível ecossistêmico. Dentre os organismos que podem ser afetados pela contaminação por petróleo destacamos os roedores silvestres. No ambiente, os roedores têm papel importante como dispersores de sementes e servem de alimento para diferentes predadores, correspondendo a uma considerável fração das espécies de mamíferos. No Brasil, o habitat do roedor silvestre *Calomys laucha* se restringe a região de dunas, tal como na praia do Cassino, RS. Por residir nesta zona costeira, estes organismos estão sujeitos à contaminação por petróleo tanto no ambiente terrestre quanto no ambiente marinho. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição de solos contaminados por diferentes concentrações de petróleo em parâmetros bioquímicos, fisiológicos, mutagênicos, reprodutivos e comportamentais em exemplares machos do roedor silvestre *C. laucha*. Os animais foram expostos a cinco diferentes concentrações de petróleo: 0, 1, 2, 4 e 8%. Aproximadamente 1 kg de solo foi colocado no fundo das gaiolas e os animais foram mantidos durante 14 dias, com acesso livre a água e alimento. Foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corporal e dos órgãos, ingesta de alimento, atividade exploratória e locomotora, viabilidade e anomalias de espermatozoides, danos mutagênicos e marcadores de estresse oxidativo em diferentes homogeneizados (fígado, testículo e sangue). Essa exposição causou severos danos à saúde dos animais, dando sinais já nos primeiros dias de exposição como perda de pêlos e até morte. Além disso, foi capaz de causar danos mutagênicos em células sanguíneas da medula óssea, danos lipídico e proteico no fígado, testículo e linfócitos, diminuição da viabilidade espermática e frequente presença de anomalias espermáticas, alterações comportamentais (letargia e depressão) e morfológicas (aumento peso relativo fígado, baço e rins). Este estudo demonstrou sensibilidade dos biomarcadores utilizados e evidencia que pequenos mamíferos silvestres como *Calomys laucha* são úteis para previsão de danos ambientais decorrentes da exposição ao petróleo.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos, roedores silvestres, compostos orgânicos, mutagenicidade, viabilidade espermática, danos em biomoléculas.

INTRODUÇÃO

Contaminação do ambiente terrestre por petróleo e derivados e seus efeitos na biota

A composição química e a natureza física do petróleo podem variar significativamente dependendo do local e poço produtor (IARC, 1989). No entanto, o petróleo é basicamente constituído por uma complexa mistura de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio e baixas concentrações de metais (WHO, 1982). O petróleo e seus produtos são liberados para o meio ambiente através de acidentes durante carga, descarga, transporte ou produção de subprodutos, causando poluição pontual e difusa no ambiente (Park e Park, 2011). A compreensão do comportamento dos diferentes componentes do petróleo no solo, água e ar é muito importante na avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrentes dessa exposição.

Um dos compartimentos ambientais que funciona como receptor ambiental do petróleo é o solo. Este pode caracterizar-se como um filtro ambiental, devido a sua capacidade de depurar e imobilizar grande parte das substâncias nele depositadas. Além disso, o solo também atua como fonte, rota e receptor de contaminantes (Bone et al. 2010). As propriedades físicas e químicas do óleo bruto e derivados, como as diferentes pressões de vapores e solubilidade em água, bem como as características do solo como umidade e matéria orgânica determinam a distribuição desses componentes no compartimento ambiental. Em contato com o solo, o petróleo e seus produtos são retidos pelos sólidos do solo, tanto por infiltração e retenção nos poros como por adsorção à superfície das partículas. Por outro lado, como os

derivados de petróleo são constituídos por componentes que apresentam diferentes pressões de vapor, os mais voláteis irão se difundir pelos poros do solo e os componentes não volatilizados permanecerão no solo por longos períodos no ambiente, aumentando a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos (Jacques et al. 2007, Fine et al. 1997).

O risco de acidentes tem se intensificado diante do aumento da produção de petróleo. Durante a operação normal, vazamentos e derramamentos de petróleo bruto resulta na contaminação do solo e dependendo da localização do sítio, o nível de contaminantes de óleo no solo pode ser tão elevada como 10% p/p (Gogoi et al., 2003). Esta condição elenca os componentes do petróleo como poluentes mais frequentemente encontrados no solo (Banks et al., 2003). Os compostos com potencial tóxico podem atingir os organismos vivos, através do contato direto, inalação, ingestão da água percolada ou de forma direta (geofagia) (Watanabe & Hirayama, 2001; Van Der Waile et al., 2004). A maioria dos estudos sobre o derramamento de petróleo têm-se centrado sobre os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), e tem demonstrado que estes contaminantes tem causado efeitos prejudiciais sobre vários organismos aquáticos (Culbertson et al., 2007; Di Toro et al., 2007; Mille et al., 2007; Shafir et al., 2007). No entanto, o petróleo bruto pode causar toxicidade aguda letal, toxicidade crônica sub-letal, ou ambos, dependendo da exposição, dosagem, e o organismo exposto.

Quando ocorre um vazamento de óleo, a toxicidade não se limita a efeitos agudos restritos à vizinhança imediata da descarga. Devido à distribuição, todos os organismos dentro do domínio podem ser expostos por muitos componentes que constituem o petróleo durante um período de tempo

prolongado. O petróleo bruto e muitos dos seus componentes individuais têm sido relatados para causar uma variedade de efeitos sub-letal em uma ampla gama de organismos vivos. Alguns dos efeitos observados mais frequentemente de poluição de petróleo em organismos individuais incluem reprodução prejudicada (Feuston et al., 1997), tumores e lesões (Malins et al., 1994), alterações hematológicas (Yamato et al., 1996; Da Silva-Júnior et al., 2013b) e anormalidades morfológicas (Da Silva-Júnior et al., 2012 e 2013b). Alguns componentes do petróleo têm o potencial de bioacumulação nos organismos aquáticos e pode ser transmitida por transferência trófica a outros níveis da cadeia alimentar (Gardner et al., 1991). Além disso, algumas substâncias cancerígenas podem ser encontradas em produtos derivados de petróleo. HPAs e os hidrocarbonetos aromáticos voláteis: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são contaminantes aromáticos com riscos tóxicos e cancerígenos (ATSDR, 2009).

Dentre as espécies que podem ser receptores ambientais dos contaminantes liberados pelas atividades relacionadas ao petróleo estão os pequenos mamíferos. Inúmeras espécies deste grupo têm sido utilizadas ao redor do mundo para fins de monitoramento da qualidade ambiental, na Oceania, na Ásia, na África (Nakayama et al., 2012), na América do Norte (Espinosa-Reyes et al., 2012), América do Sul (Da Silva et al., 2000) e Europa (González et al., 2008). Apesar do grande número de estudos ambientais envolvendo o uso de roedores silvestres, a utilização destes organismos como modelos de sentinelas para monitoramento de impactos decorrentes de acidentes e derrames de petróleo em ambiente terrestre é ainda uma estratégia incipiente. Os estudos com organismos silvestres visam não somente investigar

os mecanismos de ação associados aos efeitos tóxicos, mas também selecionar variáveis que respondem precocemente a um distúrbio ambiental. Neste contexto, os estudos de bioacumulação de contaminantes e biomarcadores de efeito podem oferecer informações a respeito do grau de contaminação a que os organismos estão expostos.

Um dos primeiros estudos que investigou os efeitos tóxicos de graxas de petróleo foi conduzido por Shubik et al. (1962). Neste trabalho, os autores investigaram três diferentes vias de exposição: dérmica, sub-cutânea e alimentar. Com exceção da via dérmica, a qual induziu alterações como descamação, depilação e hiperplasia epidérmica, a exposição a graxas de petróleo não induziu alterações significativas em relação aos animais controle, incluindo o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, os quais foram compartilhados entre os animais expostos e não expostos ao petróleo.

Outros estudos sobre os efeitos tóxicos da exposição a petróleo e seus derivados em roedores foram realizados em linhagens de laboratório, no final da década de 1970 e na década de 1980 (Veldre & Janes, 1979, Parker et al., 1981, Easley et al., 1982, Lockard et al., 1982, Khan et al., 1987, Wilson & Holland, 1988). Dentre os efeitos adversos descritos na literatura estão sinais clínicos de intoxicação aguda como tremores, paralisia e morte, alterações histopatológicas nos rins e fígado, alterações bioquímicas e hematológicas e aparecimento de tumores em animais expostos cronicamente. Por outro lado, as frações de petróleo testadas por Lockard e seus colaboradores (1982) demonstraram fraco potencial genotóxico e mutagênico para células somáticas e germinativas.

Nos anos subsequentes, os estudos continuaram demonstrando os efeitos agudos e crônicos em roedores de laboratório expostos a petróleo e seus derivados, através de diferentes vias de exposição. Por exemplo, Broddle e seus colaboradores (1996) estudaram os efeitos da aplicação dermal de diferentes frações de petróleo por um longo período (pelo menos 24 meses) e comprovaram o desenvolvimento de tumores nos animais estudados. Adesanya et al. (2009) estudaram os efeitos espermatotóxicos em camundongos Swiss expostos via oral ao “Bonny light crude oil”, verificando a redução da densidade e motilidade espermática nos animais expostos ao petróleo. Patrick-Iwuanyanwu et al. (2011) estudaram os efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos de dietas contaminadas com petróleo e óleo diesel em ratos Wistar e mostraram alterações em marcadores bioquímicos hepáticos e renais, além de alterações degenerativas em células destes dois órgãos. Ainda visando investigar os efeitos da exposição do petróleo através da via alimentar, Lemiere et al (2004) utilizaram mariscos contaminados coletados de uma região de derrame de petróleo como recurso alimentar de ratos Wistar, sendo constatado aumento dos danos genotóxicos decorrentes do consumo de alimento contaminado.

Marcadores de genotoxicidade e imunotoxicidade também já foram utilizados para monitorar risco associado a contaminantes derivados de petróleo oriundos de atividades antrópicas. No Brasil, Heuser et al., (2002) utilizaram dois bioensaios de genotoxicidade (ensaio cometa e teste do micronúcleo) no roedor nativo *Ctenomys minutus* para monitorar a influência dos contaminantes liberados por emissões veiculares em uma rodovia de alto tráfego.

A respeito da investigação dos efeitos adversos do derrame de petróleo no solo, o uso de roedores silvestres também é uma estratégia ainda em fase inicial. Alguns estudos, do nosso grupo de pesquisa têm sido realizados com duas espécies: *Mus spretus* (*M. spretus*), um camundongo da região mediterrânea e *Calomys laucha* (*C. laucha*), um camundongo do sul da América do Sul.

Uma série de parâmetros foram investigados por Da Silva Júnior et al., (2012) em seu estudo com o roedor *M. spretus*, dentre eles: sinais clínicos de toxicidade aguda, incluindo a morte, peso dos órgãos (fígado, rins, pulmões, baço, testículos e coração), hematologia, corticosterona fecal, consumo de oxigênio, atividade locomotora e atividade exploratória. Por outro lado, no estudo de Da Silva Júnior e colaboradores (2013a) o foco de investigação foram os parâmetros de genotoxicidade e citotoxicidade, avaliados através do ensaio cometa em células do sangue periférico, do teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea e das anomalias espermáticas. Nos estudos realizados utilizando o roedor *C. laucha* para previsão de danos decorrentes do derrame simulado de petróleo há somente a avaliação das alterações hematológicas (Da Silva-Júnior et al., 2013b). Neste estudo, os autores revelam alterações na hemostasia de animais expostos a derivados de petróleo em dois tipos de solo: um derrame simulado de óleo bruto e um solo em processo de biorremediação (*landfarming*). Estes estudos anteriores realçaram a possibilidade de utilização destas duas espécies como organismos-sentinela para previsão de danos decorrentes de contaminação ambiental ou situações de desastre ambiental.

O Modelo biológico *Calomys laucha*

O *Calomys laucha* OLFERS 1818 é um roedor silvestre pertencente à família Cricetidae, e se distribui na América do Sul, ocorrendo em áreas do sul da Bolívia, sul do Brasil, centro da Argentina e Uruguai (Nowack E Paradiso, 1983). A espécie *C. laucha* é encontrada em pastagens, áreas agrícolas, margens de estradas e dunas costeiras, onde se alimentam e se reproduzem. São encontrados com frequência em culturas de milho e trigo, sendo assim considerados “praga” na Argentina por causarem grande prejuízo nas plantações, no entanto, possuem um papel ecológico importante como dispersores de sementes (De Villafañe *et al.*, 1988 e Colares, 1997). Esta espécie é hospedeira do vírus Junin, causador de febre hemorrágica na Argentina (Doyle *et al.*, 1998). Em seu ambiente natural, *C. laucha* apresenta expectativa de vida em torno de 7 meses (Cittadino *et al.*, 1994), enquanto que em cativeiro a média de vida é de 13,5 meses (Hodara *et al.*, 1989). Esse roedor de pequeno porte tem peso máximo de 40g, o que possibilita sua criação em biotérios. Em laboratório, quando encontra condições favoráveis de temperatura e alimento, reproduzem-se durante todo ano, enquanto que na natureza seu período reprodutivo ocorre entre os meses de setembro a junho (Colares, 1997). É uma espécie selvagem, capaz de suportar amplas variações de temperatura, predadores e influências antrópicas (Colares, 1997).

No Brasil, a área de ocorrência desta espécie está concentrada em dunas costeiras do litoral gaúcho, mais especificamente na praia do Cassino, no município de Rio Grande-RS (Colares, 1997) onde se alimenta e constrói ninhos para reprodução, estando suscetível aos efeitos de atividades antrópicas na região costeira e marinha, fazendo deste animal, um biomonitor

de interesse científico local para investigar diferentes aspectos fisiológicos frente a agentes tóxicos em que possam estar expostos na natureza.

O conhecimento dos aspectos fisiológicos de animais silvestres é um requisito básico para o entendimento biológico e manejo das espécies, tanto em seu habitat natural como em cativeiro. Este conhecimento é particularmente importante quando o animal é um transmissor ou um hospedeiro de doenças, como é o caso dos roedores silvestres. Roedores de laboratório possuem variabilidade genética muito baixa, fator que pode alterar a intensidade da resposta a agentes infecciosos e estressantes. Espécies silvestres, por geralmente apresentarem uma maior variabilidade genética, possuem maior resistência a esses agentes. Além disso, o roedor *Calomys laucha*, vivendo em ambientes próximos a instalações humanas, com forte influência industrial petrogênica, corre o risco de estar indireta ou diretamente expostos ao petróleo bruto ou seus constituintes. Desta forma, é necessário maior conhecimento a respeito dos fatores que afetam a fisiologia desses animais no ambiente, considerando sua sobrevivência à influência do homem em seu hábitat, bem como, definir critérios para eleger o roedor silvestre *C. laucha* como modelo para estudos ecotoxicológicos a partir de avaliação *ex situ*.

OBJETIVO GERAL

No presente estudo, foi realizada uma simulação de derramamento de petróleo no solo com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição aguda a esse solo contaminado artificialmente com diferentes concentrações de petróleo bruto, utilizando biomarcadores bioquímicos, fisiológicos, comportamentais, mutagênicos e reprodutivos em exemplares machos do roedor silvestre *Calomys laucha*.

Danos fisiológicos em roedor silvestre *Calomys laucha* exposto a solo contaminado por petróleo

De-Almeida, K. A., Colares, E. P., Da Silva-Júnior, F. M. R., Muccillo-Baisch, A. L.

LEFT - Laboratório de Ensaios Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brasil

E-mail: kris.toxico@gmail.com

A ser submetido ao periódico Cadernos de Saúde Pública

Resumo

Poluição por petróleo é um problema global que pode surgir acidentalmente ou operacionalmente no momento em que o óleo ou seus derivados são produzidos, transportados, armazenados, transformados ou utilizados no mar ou em solo. Em solo, derivados ou constituintes do petróleo podem representar uma grande parte dos produtos químicos encontrados em sítios contaminados. Uma vez no ambiente, estes contaminantes podem causar prejuízos à saúde dos organismos residentes. Dentre estes organismos, os pequenos mamíferos têm se destacado na previsão de danos ambientais causados por metais tanto em estudos de campo como em exposições em laboratório. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição a solos contaminados por diferentes concentrações de petróleo (0, 1, 2, 4 e 8% p/p) utilizando parâmetros fisiológicos, comportamentais e mutagênicos em machos do roedor silvestre *Calomys laucha*. A exposição causou severos danos à saúde dos animais já nos primeiros dias de exposição como perda de pêlos e até morte de alguns animais. Além disso, houve danos mutagênicos em células sanguíneas da medula óssea, alterações comportamentais (letargia e depressão) e morfológicas (aumento do peso relativo do fígado, baço e rins).

Este estudo demonstrou sensibilidade dos biomarcadores utilizados e evidencia que pequenos mamíferos silvestres como *Calomys laucha* são úteis para previsão de danos ambientais decorrentes da exposição ao petróleo.

Palavras-chave: Petróleo, roedores silvestres, *Calomys laucha*, dano fisiológico, mutagenicidade

Introdução

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos (HC), compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, e inúmeros metais tais como níquel e vanádio (Nadim et al., 2000). Dentre os contaminantes do petróleo, encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico, pois apresentam propriedades carcinogênicas e mutagênicas para homens e animais (Boffetta et al., 1997; Who, 1988; Pereira Netto et al., 2000; Gaspari et al., 2003; Armstrong et al., 2004).

Cada estágio do processo produtivo do petróleo como, exploração, perfuração, refino, transporte por oleodutos pode apresentar sérios riscos ao meio ambiente. A poluição causada por derrames de navio-tanque de petróleo e derivados representam apenas uma parcela do total de óleo derramado no meio ambiente. Por outro lado, os eventos responsáveis pela contaminação ambiental crônica por petróleo são causados principalmente, em ambientes próximos às refinarias, operações rotineiras dos navios ou terminais de reservatório (La Grega et al., 1994; Osuji et al., 2010).

No solo, a contaminação por petróleo e seus constituintes é um efeito comum da atividade antropogênica, devido aos processos de extração,

transporte, refino e armazenagem, à produção industrial dos HPAs e seus subprodutos (Bamforth & Singleton, 2005), bem como os acidentes que envolvem o derramamento direto de seus produtos e derivados (Yunker et al., 2002). Além disso, resíduos oleosos podem também ser deliberadamente espalhados sobre o solo, sob condições controladas, processo conhecido como *landfarming* (biorremediação). Um estudo que investigou a biodegradação de hidrocarbonetos (HC) de petróleo em cascalhos oriundos da perfuração, através da técnica de biorremediação, demonstrou que 10% da quantidade inicial de HC persistiram na superfície do solo (Chaineau et al., 1996). No entanto, os maiores eventos de contaminação do solo por petróleo ocorrem pelo rompimento de oleodutos, explosões de poços, perfuração ou erosão de tanques combustíveis (Burger, 1997).

Contaminantes ambientais podem tornar-se perigosos quando entram em contato com organismos vivos, onde as funções bioquímicas e fisiológicas podem sofrer alteração (Guengerich e Shimada, 1998). Pequenos mamíferos silvestres têm sido utilizados para previsão de danos ambientais causados por metais através do uso de biomonitores e biomarcadores (Da Silva et al., 2000; Tanzarella et al., 2001; Festa et al., 2003; Viegas-Crespo et al., 2003; Pereira et al., 2006; Raya-Rodriguez et al., 2006). Estes organismos também têm sido utilizados como modelos experimentais para investigar efeitos tóxicos de metais como cádmio, chumbo e zinco (Tapisso et al., 2009). Porém, recentemente, estudos simulando um derrame de petróleo no solo (8% v/v), utilizando biomarcadores fisiológicos, genéticos e comportamentais mostraram danos em camundongos silvestres *Mus spretus* (Da Silva-Júnior et al, 2012; 2013a).

O *Calomys laucha* OLFERS 1818 é um roedor silvestre pertencente à família Cricetidae, e se distribui na América do Sul, ocorrendo em áreas do sul da Bolívia, sul do Brasil, centro da Argentina e Uruguai (Nowack e Paradiso, 1983). São encontrados em pastagens, áreas agrícolas, margens de estradas e dunas costeiras, onde se alimentam e se reproduzem (Reis et al., 2006). Esses animais possuem papel importante como dispersores de sementes e servem de alimento para diferentes predadores. São encontrados com frequência em culturas de milho e trigo, sendo assim considerados “praga” na Argentina por causarem grande prejuízo nas plantações (De Villafañe et al. 1988; Colares, 1997). Além disso é uma espécie hospedeira do vírus Junin, causador de febre hemorrágica na Argentina. (Doyle et al., 1998).

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado esse modelo para prever os efeitos da contaminação do solo por petróleo, onde a exposição aguda causou alterações no perfil hematológico dos animais expostos (Da Silva-Júnior et al., 2013b). No entanto, estudos sobre efeitos de fontes orgânicas de contaminantes, tais como o petróleo com pequenos roedores silvestres ainda são escassos.

Tendo em vista a crescente preocupação de encontrar espécies nativas sensíveis para alertar sobre os problemas de contaminação ambiental, o presente estudo avaliou os efeitos da exposição ao solo contaminado por petróleo no roedor silvestre *Calomys laucha*, visando sua utilização como espécie sentinela para biomonitoramento da contaminação ambiental.

Material e métodos

Animais

Os roedores silvestres (machos da espécie *Calomys laucha*) foram procedentes do biotério de roedores não convencionais do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (21°C +/-3°C) e foto período (12h claro/12h escuro). Estes animais foram alimentados com ração comercial (Bio Base, Bio-Tec, Águas Frias, SC) para animais de laboratório e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/FURG) processo 23116.005277/2011-98, parecer 31/2011

Delineamento experimental

O solo artificial foi composto por 70% de areia, 20% de argila e 10% de matéria orgânica (fibra de coco). Aproximadamente 1 kg de solo foi colocado no fundo das gaiolas e os animais foram expostos, individualmente, durante 14 dias, sem renovação do solo. O solo foi misturado com petróleo leve tipo *Hydra* (p/p). Os tratamentos foram: Controle (somente solo artificial), 1% (solo controle + 1% de Petróleo), 2% (solo controle + 2% de petróleo), 4% (solo controle + 4% de petróleo) e 8% (solo controle + 8% de petróleo). Os grupos experimentais foram compostos por 6 animais.

Sinais externos e avaliação do peso corporal

Durante o período de exposição foram observados a ocorrência de sinais de letargia, perda de pelos, dificuldade de locomoção e mortalidade. A avaliação do peso corporal dos animais foi verificada nos dias 0, 4 e 14 de exposição.

Avaliação da ingestão de alimentos

Para avaliação de alterações na ingestão de alimento, o consumo de ração foi mensurado por 24h nos dias 0, 7 e 14.

Avaliação de volume de pata

Este teste foi empregado para avaliar possíveis alterações da massa muscular, a partir das variações do volume das patas dos animais tratados. Depois de anestesiados, o volume da pata direita traseira de cada animal foi medida com o auxílio de um Pletismômetro (precisão de 0,01 mL).

Avaliação do peso dos principais órgãos

Ao final do período de exposição, os animais foram anestesiados com Halotano e eutanasiados por exanguinação e os principais órgãos (fígado, pulmões, rins, coração e baço) foram removidos para controle do peso e visualização macroscópica de alterações.

Avaliação comportamental pelo teste do campo aberto

Os animais foram colocados individualmente no canto esquerdo superior do assoalho e foram observados durante um período de cinco minutos quanto ao número de cruzamentos nos quadrantes periféricos e centrais, o número de vezes que o roedor ficou na posição bípede (*rearing*), o tempo que o animal adotou o comportamento de auto-limpeza (*grooming*), bem como o tempo em que permanece imóvel (*freezing*). Este procedimento foi realizado em duas sessões, a primeira que é chamada de sessão de treino e a segunda sessão de teste e todos os testes foram registrados e analisados através de vídeos (Archer, 1973).

Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo

A medula óssea foi extraída dos dois fêmures de cada animal, onde a indução de micronúcleos foi medida na medula óssea como descrito em Ribeiro (2003). Foram feitas duas lâminas de cada animal a partir de

esfregações da suspensão contendo células da medula óssea dos fêmures, fixadas com Metanol P.A. e corados com corante Eosina-Azul de Metileno os eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs). De cada lâmina foram contados 1000 PCEs bem como a proporção de NCEs em 200 eritrócitos contados.

Análise de dados

Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão. Foi realizada análise de variância de via única (ANOVA) para comparação das médias entre os diferentes tratamentos ou teste não paramétrico correspondente. Quando necessário foi realizado o teste *a posteriori* Fischer para comparação entre os grupos, a 5% de significância estatística.

Resultados

A exposição ao solo contaminado com petróleo bruto causou danos à saúde do roedor *Calomys laucha*. Sinais de letargia e pelos eriçados foram observados em animais expostos as maiores concentrações (4 e 8%). No 5º dia de exposição, dois animais da maior concentração morreram. Ao final do experimento, os animais expostos ao solo contendo 8% de petróleo tiveram perda de pêlo na parte ventral e na região escrotal e possuíam dificuldade de locomoção. Por outro lado, os animais controles não apresentaram nenhuma alteração nesses parâmetros analisados. Por outro lado, o peso corporal dos animais do grupo controle e dos animais expostos às diferentes concentrações de petróleo no solo não se alterou significativamente durante o tempo de exposição, nem diferiu significativamente entre os tratamentos (dados não mostrados).

Tabela 1. Avaliação da ocorrência dos sinais externos de danos, onde X expressa a ocorrência de cada evento em determinado dia de exposição.

Danos externos	Tratamento	Dias de exposição													
		1° - 2° - 3° - 4° - 5° - 6° - 7° - 8° - 9° - 10° - 11° - 12° - 13° - 14°													
Letargia	4%	X	X	X	X	X	X	X							
	8%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Morte	1%				X										
	8%					xx									
Pêlos eriçados	4%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	8%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alopecia	4%														
	8%		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dificuldade de locomoção	4%	X	X	X	X	X	X								
	8%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

No dia 0 e 14 não houve nenhuma diferença significativa da ingesta entre os animais de todos os tratamentos quando comparado com o controle. No entanto, no dia 7 de exposição, os animais do tratamento 2 e 8% tiveram diminuição da ingestão de alimentos quando comparado ao controle.

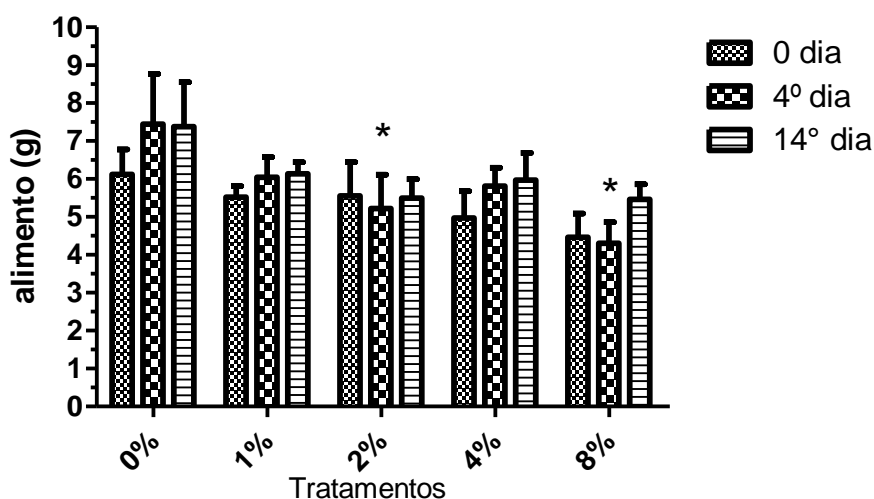


Figura 1. Média \pm erro padrão da ingestão de alimentos nos dia 0, 7 e 14 de exposição nos diferentes tratamentos. * indica diferença significativa

O peso relativo do fígado aumentou significativamente nos animais expostos ao solo contaminado com 4 e 8% de petróleo quando comparado aos dos animais do grupo controle. Além disso, o percentual do fígado dos animais

do grupo 8% foi maior quando comparados aos dos animais tratados com 1 e 2% de petróleo (Figura 2).

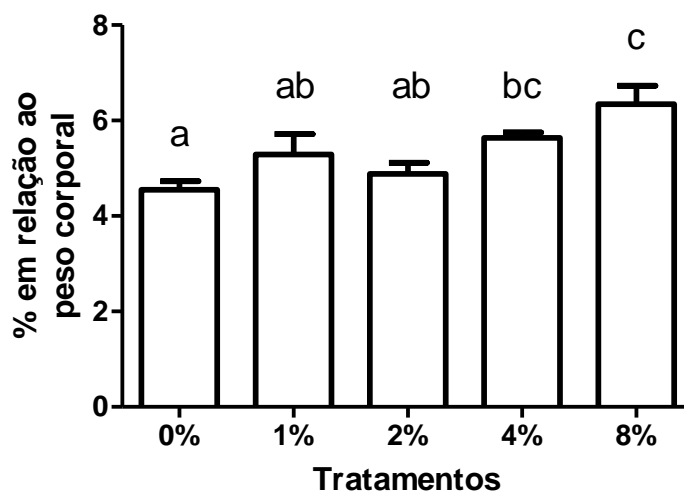


Figura 2. Média \pm erro padrão dos pesos relativos (g / 100 g de peso corporal) do fígado de *C. laucha* expostos ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferença significativa.

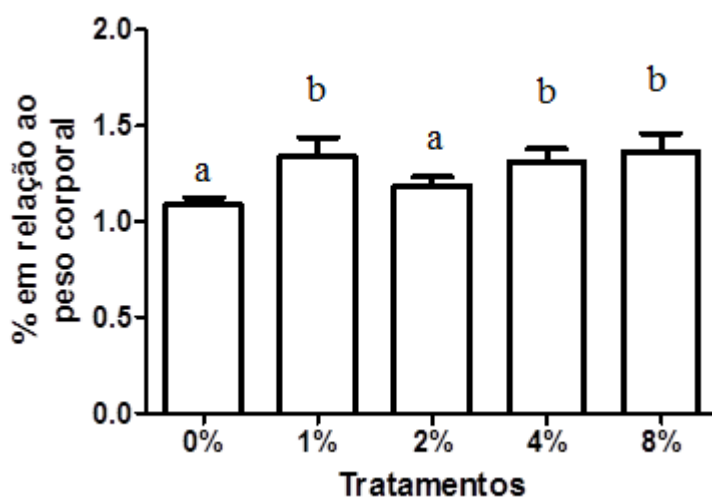


Figura 3. Média \pm erro padrão dos pesos relativos (g / 100 g de peso corporal) dos rins de *C. laucha* expostos ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferença significativa.

O peso dos rins dos animais expostos às concentrações 1, 4 e 8% aumentaram significativamente quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Outro órgão afetado pela exposição ao solo contaminado pelo petróleo foi o baço, onde os animais do grupo 4 e 8% aumentaram o peso relativo do baço em relação ao grupo controle (Figura 4). O peso relativo dos pulmões não

diferiu significativamente entre os animais expostos aos diferentes tratamentos (Figura 5).

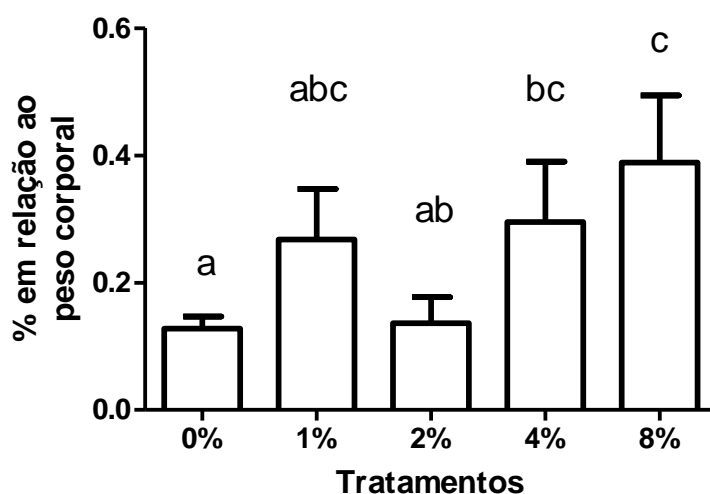


Figura 4. Média \pm erro padrão dos pesos relativos (g / 100 g de peso corporal) do baço de *C. laucha* expostos ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferença significativa.

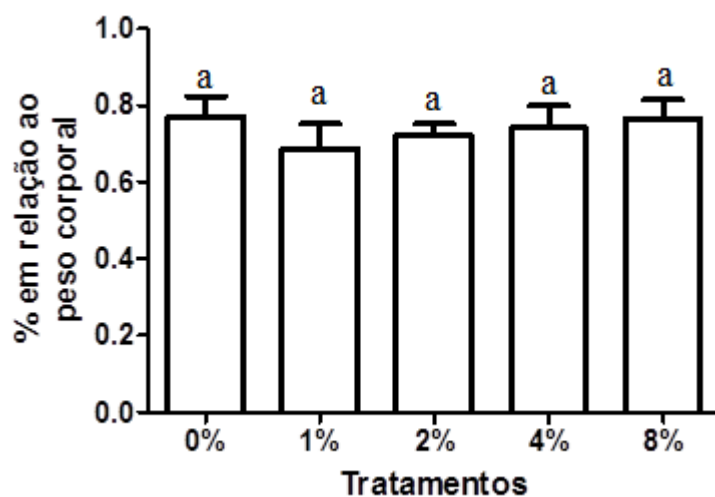


Figura 5. Média \pm erro padrão dos pesos relativos (g / 100 g de peso corporal) dos pulmões de *C. laucha* expostos ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferença significativa.

O volume de pata foi outro parâmetro utilizado nesse estudo visando associar esses resultados com alterações de massa muscular. O volume da pata dos animais expostos ao solo contaminado com 4 e 8% de petróleo

diminuiu quando comparado com os animais do grupo controle e aos expostos com 1% de petróleo. Além disso, nos animais do grupo 1% também houve uma diminuição do volume da pata em relação ao grupo controle (Figura 6).

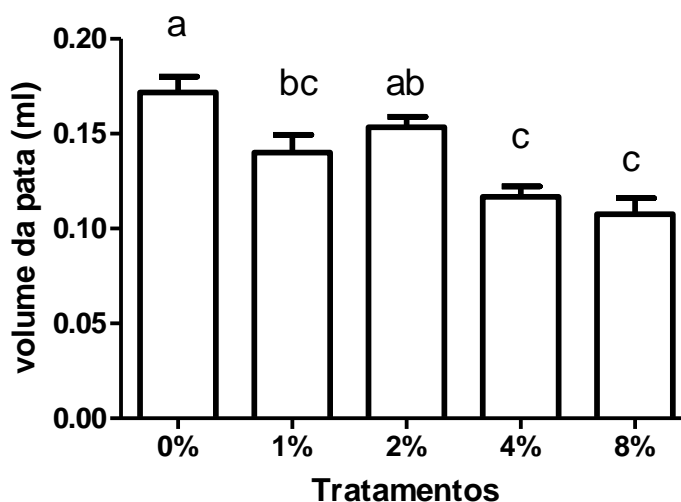


Figura 6. Média \pm erro padrão do volume da pata dos *C. laucha* expostos ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferença significativa.

Biomarcador comportamental

No teste comportamental de campo aberto, houve diferenças significativas no número de cruzamentos em quadrados periféricos no 4º dia de exposição. A tabela 2 (a) mostra que os animais do tratamento 1, 4 e 8% diminuíram o número de cruzamentos em relação ao dia 0. Nos dias 4 e 14 de exposição, o número de cruzamentos nos quadrados centrais diminuiu entre os animais expostos ao tratamento 8%. Além disso, no dia 14 de exposição os animais do grupo controle aumentaram o número de cruzamentos nos quadrados centrais em relação ao dia 0 e 4 do mesmo tratamento. Tabela 2 (b)

Tabela 2 (a) Média da quantidade de vezes em que houve cruzamento nos quadrados periféricos

<i>Quadrados periféricos</i>			
Tratamento	Dia 0	Dia 4	Dia 14
Controle	136,34 aA	103,33 aA	126,17 aA
1%	136,34 aA	85,5 bA	111,0 aA
2%	136,34 aA	91,5 aA	99,0 aA
4%	136,34 aA	76,83 bA	107,0 aA
8%	136,34 aA	59,5 bA	98,0 aA

Letra minúscula distinta indica diferença significativa na linha (mesmo tratamento).
Letra maiúscula distinta, diferença significativa na coluna (tratamento diferentes).

Tabela 2 (b) Média da quantidade de vezes em que houve cruzamento nos quadrados centrais.

<i>Quadrados centrais</i>			
Tratamento	Dia 0	Dia 4	Dia 14
Controle	15,345 aA	21,3 aA	27,83 bA
1%	15,345 aA	15 aA	19,6 aA
2%	15,345 aA	15,5 aA	16,3 aA
4%	15,345 aA	7,8 aA	13 aA
8%	15,345 aA	5 aB	4 aB

Letra minúscula distinta indica diferença significativa na linha (mesmo tratamento).
Letra maiúscula distinta, diferença significativa na coluna (tratamento diferente).

O tempo em *grooming* dos animais expostos ao solo contaminado com 8% de petróleo no dia 4 de exposição aumentou em relação às outras concentrações também do mesmo dia. No dia 14, esse mesmo comportamento foi obtido naqueles animais expostos às concentrações 2 e 4% de petróleo no solo, enquanto que os animais do tratamento 8% diminuíram o tempo gasto em auto-limpeza quando comparado com os outros tratamentos do respectivo dia de exposição. Os animais da concentração 1% não tiveram alterações significativas no tempo de *grooming* durante toda a exposição (Tabela 3 a).

Tabela 3 (a). Média do tempo (segundos) em que os animais adotaram o comportamento de auto limpeza (*grooming*).

<i>Grooming</i>			
Tratamento	Dia 0	Dia 4	Dia 14
Controle	32,14 aA	33,808 aA	48,483 aA
1%	32,14 aA	35,14 aA	52,828 aA
2%	32,14 aA	56,685 aA	119,49 bB
4%	32,14 aA	62,005 aA	121,07 bB
8%	32,14 aA	97,578 bB	41,18 aB

Letra minúscula distinta indica diferença significativa na linha (mesmo tratamento).
Letra maiúscula distinta, diferença significativa na coluna (tratamento diferentes).

O número de vezes em que o animal ficou na posição bípede (*rearing*) diminui nos animais expostos ao solo contaminado com 8% de petróleo no dia 14 em relação ao controle do mesmo dia (tabela 3b). O tempo de *freezing* não teve diferenças significativas em nenhum tratamento durante toda a exposição (dados não mostrados).

Tabela 3 (b) Média da quantidade de vezes em que os animais adotaram o comportamento de *rearing*.

<i>Rearing</i>			
Tratamento	Dia 0	Dia 4	Dia 14
Controle	35,517 aA	34,0 aA	51,667 aA
1%	35,517 aA	29,167 aA	30,6 aA
2%	35,517 aA	33,333 aA	32,5 aA
4%	35,517 aA	22,0 aA	39,0 aA
8%	35,517 aA	25,333 aA	13,0 bB

Letra minúscula distinta indica diferença significativa na linha (mesmo tratamento).
Letra maiúscula distinta, diferença significativa na coluna (tratamento diferentes).

Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*

A frequência de micronúcleo nas células da medula óssea dos animais expostos ao solo contaminado por petróleo na concentração de 8% aumentou em relação aos demais tratamentos (Figura 7). Além disso, houve aumento da frequência de micronúcleos nas células de medula óssea dos animais do grupo 1 e 4% quando comparado ao grupo controle. A citotoxicidade medida pela razão entre PCEs (eritrócitos imaturos) e NCEs (eritrócitos maduros) não foi

significativamente afetada pela exposição ao solo com petróleo (dados não mostrados).

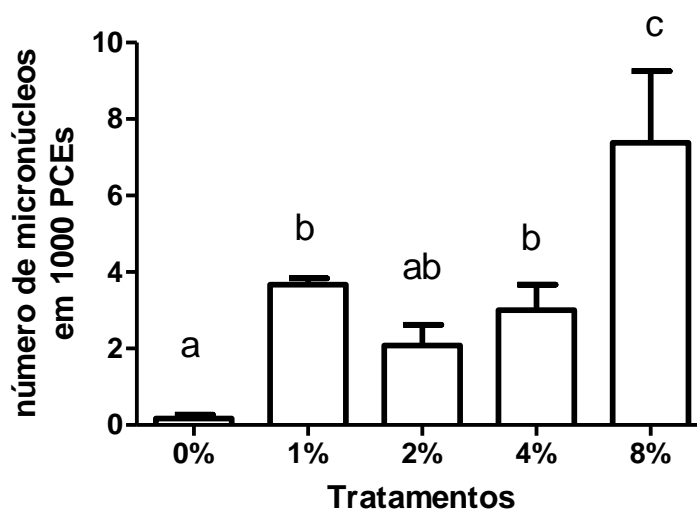


Figura 7. Indução de Micronúcleos em células da medula óssea de *C. laucha* expostos agudamente ao solo contaminado por diferentes concentrações de petróleo. Letras distintas indicam diferenças estatísticas.

Discussão

O petróleo e muitos dos seus componentes individuais foram relatados por causar efeitos deletérios em uma ampla variedade de organismos vivos como em invertebrados terrestres, plantas (Dorn et al., 1998, Tang et al., 2011), animais marinhos (Engelhardt, 1983) e vertebrados terrestres, como bovinos (Coppock & Christian, 2007). Embora existam estudos sobre os efeitos danosos do petróleo em diferentes organismos, principalmente em ambiente aquático (Couillard et al, 2005; Perkin et al, 2005; Martinez-Jeronimo et al, 2005), os efeitos tóxicos em animais expostos ao solo contaminado por óleo bruto, como os roedores silvestres, tem sido pouco abordados (Da Silva-Júnior et al, 2012, 2013a; 2013b).

No presente estudo, a exposição ao solo contaminado artificialmente por óleo bruto mostrou sinais evidentes de danos para a saúde de exemplares de

C. laucha expostos, tais como: letargia, perda de pêlos, sinais esses já mencionados em outros estudos relacionados à exposição por petróleo (Coppock & Christian, 2007 e Gradiski et al., 1983). Da Silva-Júnior et al., (2012) simulando um derramamento de petróleo bruto no solo com 8% (v/v), mostrou que além dos sinais de letargia, alopecia na região ventral, houve perda de pêlos na região da cabeça em exemplares fêmeas da espécie *Mus spretus*. Este fato pode ser causado por uma disfunção da glândula supra-renal em fêmeas (Da Silva Junior et al., 2012), enquanto as causas da perda de pêlo nos machos de *C. laucha* ainda não parecem esclarecidas (Camacho-Martinez, 2009).

Embora alterações na massa corporal já tenham sido utilizadas como um indicador de efeitos adversos (Gad et al., 1998) não houve alterações da massa corpórea dos animais expostos ao solo contaminado por petróleo durante os 14 dias de exposição, perfil semelhante ao encontrado por Da Silva-Júnior et al., (2012). Entretanto, o peso relativo dos órgãos é um indicador utilizado para mensurar os efeitos tóxicos relacionados com a exposição aos xenobióticos (Wolfsegger et al., 2009). O peso do fígado, rins e baço, é frequentemente utilizado como um indicador de estresse fisiológico relacionada à exposição a contaminantes (Pereira et al., 2006; Marques et al., 2008). Neste estudo, a exposição afetou o peso relativo de alguns órgãos: fígado, rins e baço.

O aumento relativo do peso do fígado foi um parâmetro que foi fortemente alterada pela exposição aguda ao petróleo sobre o solo; esta condição tem sido demonstrada em roedores expostos ao petróleo e derivados. Patrick-Iwauanyanwu et al., (2011) estudaram os efeitos de petróleo e

querosene e observaram o aumento do peso relativo do fígado de ratos expostos a 12 semanas. Além disso, nosso resultado é condizente com os obtidos por Da Silva-Junior et al., (2012), ao utilizar roedores silvestre expostos ao solo contaminado por petróleo.

O aumento do peso relativo do baço e dos rins contrasta com a diminuição do peso encontrado por Nunes et al., (2001) onde investigaram parâmetros morfológicos e hematológicos em ratos argelino (*Mus spretus*) coletados em área contaminada com metais pesados. Esta diminuição na massa do rim não aparece em outros estudos, como o Instito'ris et al., (2001) e Jadhav et al., (2007), que avaliaram a exposição de ratos laboratoriais para metais pesados e descobriram que o peso dos rins aumenta com a exposição a metais. Por outro lado, ao avaliar a exposição ao solo contaminado por petróleo em *M. spretus*, o peso relativo do baço aumentou e corrobora com o presente estudo (Da silva-junior et al., 2012). Já o peso relativo dos pulmões permaneceu inalterado, resultado esse que difere de Da Silva-Junior et al., (2012) onde houve uma diminuição no peso relativo do pulmão. No entanto, este resultado contrasta com o encontrado por Klonne et al. (1987).

A diminuição do peso dos órgãos podem ser um evento de morte celular em tecidos específicos, um fato que poderia causar uma diminuição no peso do órgão (Coppock & Christian, 2007), o que resulta numa redução da sua capacidade de reações rápidas em condições desfavoráveis como mencionado por Nunes et al., (2001). Enquanto que o aumento pode ser secundário relacionado com a resposta adaptativa associada com a biotransformação de contaminantes para combater a toxicidade sistêmica (Jadhav et al.2007). Ainda assim, como foram mencionados, resultados contraditórios podem ser

encontrado provavelmente relacionado com as diferenças no tipo de contaminante (metais pesados x petróleo) e na forma de exposição (exposição ambiental x aguda). De qualquer maneira, o estudo mostra que a massa dos órgãos, é parâmetro que pode ser usado como um indicador de dano fisiológico em animais expostos a agentes químicos.

Outro grupo de biomarcadores tem sido os testes comportamentais. Estas ferramentas como o campo aberto têm sido utilizados para avaliação da exposição de animais de experimentação a solos contaminados (Muccillo-Baisch et al., 2012). Este teste foi realizado para investigar efeitos neuro-comportamentais nos animais expostos ao solo contaminado por petróleo e os resultados mostraram diminuição da atividade exploratória e locomotora em relação aos animais do grupo controle. Além disso, o aumento do tempo gasto em auto-limpeza (*grooming*) no dia 4 de exposição revela um estado de ansiedade. No entanto, os animais do tratamento 8% diminuíram o tempo gasto de *grooming* no 14º dia de exposição, o que pode ser explicado pelo estado debilitado em que os animais desse tratamento se encontravam. Esses resultados também podem estar associados com as alterações de massa muscular da pata do animal onde o volume da pata dos *C. laucha* expostos ao solo contaminado com 4 e 8% de petróleo, diminuiu quando comparado com os animais do grupo controle. Da Silva-Junior et al., (2012), mostraram uma clara diminuição da atividade locomotora e exploratória, associada com uma diminuição no tempo de *grooming* e um aumento no tempo de *freezing*, revelando uma condição de letargia e depressão em animais *M. spretus* expostos ao petróleo. Assim, em uma situação no habitat natural, as alterações comportamentais resultantes da exposição ao petróleo bruto pode resultar em

riscos graves nas estratégias de colonização, sobrevivência e reprodução destes pequenos mamíferos.

O teste de micronúcleos (MN) em eritrócitos de medula óssea é um ensaio barato, rápido e validado para investigar danos mutagênicos em nível cromossômico (OCDE, 1997) O resultado do presente estudo é condizente com Da Silva-Júnior et al., (2012) onde também houve indução de MN nos roedores silvestres expostos ao solo contaminado com óleo bruto. Diante disso considera-se que o teste de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea é útil para a avaliação dos danos mutagênico relacionado com a exposição ao petróleo. No entanto, os resultados de Przygoda et al., (1999), não mostrou indução de micronúcleos em medula óssea de camundongos expostos a derivados do petróleo. A discrepância de resultados pode ser relacionada com a vários fatores: diferentes espécies de roedores, tipos de substâncias, vias de administração e tempo de exposição.

Ao simular um derrame de petróleo com diferentes concentrações no solo, o animal é exposto por diferentes vias (dérmica, inalação, ingestão) o que torna este tipo de exposição mais próxima da realidade para organismos silvestres. Os efeitos da exposição aguda a esse solo contaminado em *Calomys laucha*, demonstrou sensibilidade dos biomarcadores utilizados e evidenciou que pequenos mamíferos silvestres como *C. laucha* são úteis para previsão de danos ambientais decorrentes da exposição a contaminantes orgânicos como o petróleo.

Conclusão

O presente estudo buscou avaliar os efeitos de um derrame de petróleo em ambiente terrestre utilizando como modelo biológico o roedor silvestre

Calomys laucha. Essa exposição causou severos danos à saúde dos animais, dando sinais já nos primeiros dias de exposição como perda de pêlos e até morte de alguns animais. Além disso, foi capaz de causar danos mutagênicos em células sanguíneas na medula óssea, alterações comportamentais e morfológicas (aumento do peso relativo fígado, baço e rins). Portanto, os biomarcadores utilizados demonstraram ser sensíveis para previsão dos danos da contaminação por petróleo, assim como, o *C. laucha* mostrou ser uma espécie sentinela para uso em biomonitoramento da contaminação ambiental.

Referências bibliográficas

Archer, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behav.* 21(2), p. 205-35, 1973.

Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*; 112:970 – 8. 2004.

Bamforth, S.; Singleton, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex*, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

Boffetta, P.; Jourenkova, N. & Gustavsson, P.,. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes & Control*, 8:444-472. 1997.

Burger, R.M.H. *Oil Spill*. Rutgers University Press. New Jersey. 261p. 1997.

Camacho-Martinez, F.M., Hair loss in women. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 19-32. 2007

Chaîneau, C. H., Morel, J. L. And Oudot, J.: 'Land treatment of oil-based drill cuttings in na agricultural soil', J. Environ. Qual. 4, 858–867. 1996.

Colares, E.P. Aspectos da Fisiologia Reprodutiva de *Calomys laucha* (Mammalia, Rodentia). Tese (doutorado). Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo. 1997.

Coppock, R.W, Christian, R.G., Petroleum. In: Gupta, R.C. Veterinary Toxicology. Elsevier Science pp. 615-639.2007.

Couillard, C.M., Lee, K., Legare, B., King, T.L., Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish Environmental Toxicology and Chemistry, 24 (6), pp. 1496–1504. 2005

Da Silva, J.; De Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. Genetics and Molecular Biology, 23, 1, p. 241-245, 2000

Da Silva-Júnior, F. M. R.; De Almeida, K.A.; Silva, P. F.; Muccillo-Baisch, A. L. Hematological profile as a crude oil exposure-related marker in wild rodent. Journal of Bioscience and Biotechnology, v. 2, p. 89-94, 2013b.

Da Silva-Júnior, F.M.R; Monarca, Ri ; Dias, D. ; Ramalhinho, Mg ; Mathias, Mm ; Muccillo-Baisch, A. L. Physiological damage in Algerian mouse *Mus spretus* (Rodentia, Muridae) exposed to crude oil. Journal of Bioscience and Biotechnology, v. 1, p. 125-133, 2012.

Da Silva-Júnior, F.M.R; Monarca, Ri ; Dias, D. ; Ramalhinho, Mg ; Mathias, Mm ; Muccillo-Baisch, A. L. Geno- and Cyto-toxicity in Free-Living

Rodent *Mus spretus* Exposed to Simulated Onshore Oil Spill. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*; 91:465–468. (2013 a).

De Villafañe, G.; Bonaventura, S.M.; Bellocq, M.I.; Percich, RE. Habitat selection, social structure, density and predation in populations of Cricetine rodents in the pampa region of Argentina and the effects of agricultural practices on them. *Mammalia*; 52(3):339-359. 1988.

Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., Wisniewski, H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere* 37, 845-860.1998.

Doyle, T.J.; Bryan, R.T.; Peters, C.J. Viral Hemorrhagic Fevers and Hantavirus Infections In The Americas. *Emerg Infect Dis* 12(1):95-110.1998

Engelhardt, F.R. Petroleum effects on Marine Mammals. *Aquatic Toxicology*, 4, 119-217. 1983.

Festa, F.; Cristaldi, M.; Ieradi, L.A.; Moreno, S.; Cozzi, R. The comet assay for detection of DNA damage in *Mus spretus* from Doñana National Park, *Environmental Research*, 91, p.54-61, 2003.

Gad, S. & Chengelis C. *Acute Toxicology Testing*. Academic Press, San Diego. Lange Medical, C.A. 2. ed. 1998.

Gaspari L, Chang SS, Santella RM, Garte S, Pedotti P, Taioli E. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutation Research*; 535:155 – 60. 2003.

Gradiski, D., Vinot, J., Zissu, D., Limasset, J.C., Lafontaine, M., Blachere, A. The carcinogenic effect of a series of petroleum-derived oils on the skin of mice. *Environmental Research* 32, 258-268. 1983.

Guengerich F.P. and Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400:201–213.1998.

Institóris, L., Siroki, O., U nderger, U ., Basaran, N., Banerjee, B. D., & De ́si, I. Detection of the effects of repeated dose combined propoxur and heavy metal exposure by measurement of certain toxicological, haematological and immune function parameters in rats. *Toxicology*, 163, 185–193. 2001

Jadhav, S. H., Sarkar, S. N., Patil, R. D., & Tripathi, H. C. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 667–677. 2007.

Klonne DR, Burns JM, Halder CA, Holdsworth CE, Ulrich CE. Two-year inhalation toxicity study of petroleum coke in rats and monkeys. *Am. J. Ind. Med.*, 11(3): 375-389. 1987.

La Grega, M.D. et al. *The Environment resource management group: hazardous waste management*. 1 ed. Singapore: Mc Graw- Hill, 1146 p. 1994.

Marques, C. C., Gabriel, S. I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A. M., Mathias, M. L., & Bebianno, M. J. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere*, 71, 1340–1347. 2008.

Martinez-Jeronimo, F., Villasenor, R., Rios, G., Espinosa-Chavez F., Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48 (4) pp. 444–449. 2005.

Muccillo-Baisch AL, Mirlean N, Carrazzoni D, Soares MCF, Goulart GP, Baisch P. Health effects of ingestion of mercury-polluted urban soil: an animal experiment. *Environ. Geochem. Health.* 34(1): 43-53. 2012.

Nadim, F. N.; Hoag, G. E.; Liu, S.; Carley, R. J.; Zack, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *Journal of Petroleum Science & Engineering*, v. 26, p.169-178, 2000.

Nowack, R.M., Paradiso, J. Walker`s Mammals of the World. 4th ed., Baltimore: John Hopkins University Press. 1362 pp. 1983.

Nunes, A. C., Mathias, M. L., & Crespo, A. M. Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution*, 113, 87–93. 2001.

OECD-Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for the testing of chemicals—474 mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD, France. 1997.

Osuj, LC. Erundu, ES.; Ogali, RE. Degradação de petróleo Upstream de manguezais e praias intertidal: a experiência do Delta do Níger *Chemistry & Biodiversity*, 7 pp. 116-128. 2010.

Patrick-Iwauanyanwu KC, Onyemaenu CC, Wegwu MO, Ayalogu EO. Hepatotoxic and nephrotoxic effects of kerosene and petrol-contaminated diets in wistar albino rats. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5(1): 49-57. 2011.

Pereira Netto, A. D.; Moreira, J. C.; Dias, A. E. X. O.; Arbilla, G.; Ferreira, L. F. V.; Oliveira, A.S. & Barek, J., Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados

nitrados (NHPAs):Uma revisão metodológica. *Química Nova*, 23:765-773. 2000.

Pereira, R.; Pereira, M.L.; Ribeiro, R.; Gonçalves, F. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environmental Pollution*, 139, p.561-575, 2006.

Pereira, R., Pereira, M. L., Ribeiro, R., & Gonçalves, F. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from and abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environmental Pollution*, 139, 561–575. 2006.

Perkins, R.A.; Rhoton, S.; Behr-Andres, C., Comparative marine toxicity testing: A cold-water species and standard warm-water test species exposed to crude oil and dispersant *Cold Regions Science and Technology*, 42 (3), pp. 226–236. 2005.

Przygoda RT, McKee RH, Amoruso MA, Freeman JJ. Assessment of the utility of the micronucleus test for petroleum derived materials. *Mutat. Res.*, 438(2): 145-153. 1999.

Raya-Rodriguez, M.T.; Ferreira, C.J.S.; Moreira, J.C.F. Impacto automotivo em populações de *Ctenomys minutus* na planície costeira do RS; avaliação do teor de metais tóxicos e medida de lipoperoxidação. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1, p.177-183, 2006.

Reis, Nr.; Peracchi, Al.; Pedro, Wa., Lima, Ip. *Mamíferos do Brasil*. Londrina, Paraná. Universidade Estadual de Londrina, 2006.

Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

Tang, J.; Wang, M.; Wang, F.; Sun, Q.; Zhou, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 23, 845-851. 2011.

Tanzarella, C.; Degrassi, F.; Cristaldi, M.; Moreno, S.; Lascialfari, A.; Chiuchiarelli, G.; Ieradi, L.A. Genotoxic damage in free-living Algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster. *Environmental Pollution*, 115, p.43-48, 2001.

Tapisso, J.T.; Marques, C.C.; Mathias, M.L.; Ramalhinho, M.G. Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutation Research*, 678, p.59-64, 2009.

Viegas-Crespo, A.M.; Lopes, P.A.; Pinheiro, M.T.; Santos, M.C.; Rodrigues, P.D.; Nunes, A.C.; Marques, C.; Mathias, M.L. Hepatic Elemental contents and antioxidant enzyme activities in Algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal. *The Science of the Total Environment*, 311, p.101-109, 2003.

WHO (World Health Organization), Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva: 1988

Wolfsegger, M. J., Jaki, T., Dietrich, B., Kunzler, J. A., & Barker, K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240, 117–122. 2009.

Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D. & Sylvestre, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH

ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33.
2002.

Sperm alterations in Vesper mouse *Calomys laucha* exposed to crude oil contaminated soil**

De-Almeida, K. A., Da Silva-Júnior, F. M. R.*, Muccillo-Baisch, A. L.

LEFT - Laboratório de Ensaaios Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

*Corresponding author: f.m.r.silvajunior@gmail.com +55 53 32935249 LEFT - Laboratório de Ensaaios Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

** Formatado e submetido ao Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Abstract

Calomys laucha is a small wild rodent that living in the southern coastal dunes of Brazil, where it feeds and builds nests for breeding, being susceptible to the effects of human activities on coastal and marine region. This study aimed to evaluate the effects of a simulated oil spill on the soil using reproductive damage parameters in males of *C. laucha*. Exposure did not affect the relative weight of the testes, but decreased sperm viability and increased the presence of abnormalities in sperm, being the anomaly "lasso-like fold" the most commonly found. This study demonstrates that exposure to soil contaminated by oil caused damage in the germ cells, which may influence the reproduction and possible interference in the population of this species and evidence that small mammals as *C. laucha* are useful for prediction of environmental damage.

Keywords: *Calomys laucha*; sperm viability; crude oil exposure; sperm abnormalities

Introduction

The petroleum products may be responsible for much of the chemicals in contaminated sites (Oliver et al 1995; Park and Park 2011; Burgess 2013). This contaminant is characterized by a complex mixture of organic compounds, with the majority of hydrocarbon compounds containing sulfur, nitrogen, oxygen, and metals as nickel, vanadium, uranium and copper (Nadim et al 2000). It is known that aromatic hydrocarbons present in the oil, causing various damages, including mutagenic, carcinogenic, teratogenic (Kayal et al 1995) as well as reproductive damage (Feuston et al 1997).

Wild rodents have been used as a biological model for prediction of environmental damage resulting from exposure to metals (Tapisso et al 2009) and contaminants of organic origin (Da Silva-Junior et al, 2012; Da Silva-Junior et al 2013; Vilela et al 2013). The *Calomys laucha* Olfers 1818 is a wild rodent belonging to the family Cricetidae, and is distributed in South America, occurring in southern areas of Bolivia, southern Brazil, Uruguay and central Argentina (Nowack and Paradiso 1983). They are found in grasslands, agricultural areas, roadsides and coastal dunes, where they feed and reproduce (Reis et al 2006)

The species of the genus *Calomys* are terrestrial and nocturnal and are primarily granivorous. They build spherical nests with plant material in depressions in the soil or camouflaged among leaves or dead tree trunks. Play an important role as seed dispersers and provide food for different predators. Reproduce throughout the year, with less intensity in the winter and have harem-forming behavior (Necklaces 1997). They have a small size, weighing about 40g (Cittadino et al 1994), life expectancy average 13.5 months, in laboratory conditions (Hodara et al 1989).

The onset of sexual maturation in females *C. laucha* is on average at 16 days in summer and in winter at 22 days, with the first heat occurs around 23 days in the summer and winter days out of 36 in the presence the male. Gestation lasts on average 21 days, and the number of pups per litter is on average of 8 in the summer and 4 in winter, and the weaning of pups occurs at about 21 days of life (Necklaces 1997).

Males of *C. laucha* reach sexual maturity at around 25 days of age, when there is the opening of the seminiferous tubules and sperm can be seen in the germinal epithelium. Sexual maturation of males of this species also appears to be linked to the body weight of the animals. The first appearance of epididymal sperm in the channels was observed in animals weighing from 12 to 14g (Pederassi 2005).

It is extremely important to know the reproductive aspects of wildlife both in their natural habitat and in captivity, especially when the animal is a transmitter or host disease (Doyle et al 1998). The Vesper mouse *C. laucha* lives in the next strongest anthropogenic facilities and can be directly or indirectly exposed to contaminants such as oil environments. In addition to this species have some advantages over toxicology studies conventional rodent using because of its genetic variability and resistance to stressors (Vandenbergh 2004). Studies about the effects of soil contamination by oil using reproductive damage biomarkers in *C. laucha*, are nonexistent. Thus, the aim of this study was to investigate the occurrence of changes in reproductive parameters in male wild animals *Calomys laucha* exposed acutely to crude oil in the contaminated soil.

Material and methods

Animals

The wild rodents (*Calomys laucha* males) were coming from the animal house of unconventional rodents of Biological Sciences Institute at FURG. The animals were kept in standard conditions of temperature (21 ° C +/- 3 ° C) and photoperiod (12 h light / 12 h dark). The animals were fed with commercial feed (Bio Base, Bio-Tec, Águas Frias, SC) for laboratory animals and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/FURG) process 23116.005277 / 2011-98, 31/2011.

Treatment

The artificial soil consisted of 70% sand, 20% clay and 10% organic material (coconut fiber). Approximately 1 kg of soil was placed in the cages bottom and the animals were exposed individually for 14 days without renewal of the soil. The soil was mixed with *Hydra light* oil type (w/w). The treatments were: control (only artificial soil), 1% (control soil + 1% oil), 2% (control soil + 2% oil), 4% (control soil + 4% oil) and 8% (control soil + 8% oil). The experimental groups consisted of 6 animals.

Parameters Evaluated

At the end of the exposure period, the animals were anesthetized with Halothane, euthanized by exsanguination and testes were removed for weight control and macroscopic visualization.

Sperm cell shape abnormality

After dissection, the testis was removed and sperm capsule were placed in 2 ml Sorensen buffer (pH 7.0), homogenized and centrifuged gently (800 rpm, 10 min.). The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1 ml Sorensen's buffer. Then smear was prepared in clean slides, dried at room temperature and fixed in absolute methanol for 10 min. After drying, the slides were stained with 10% Giemsa for 1 hour in the oven (~ 32 ° C). A total of 1,000 sperm per animal was analyzed for the following morphological changes: head abnormalities, two tails and lasso-like fold (Da Silva Júnior et al, 2013).

Sperm viability by MTT assay

The other testicular capsule was removed and the spermatid content was placed in 5 ml PBS and resuspended. Then, in the dark, were pipetted 50 µL of cell suspension and 25µl with MTT reagent (5 mg/ml in PBS) in microplates (96 wells sterile) in triplicate and incubated at 37 ° C for 30 minutes. After, 200µl of DMSO was added to each well, resuspending to dissolve formazan crystals formed during the reaction. The negative control was added only 200µl of DMSO, and triplicate. The absorbance was read using a wavelength of 490 nm (Mosmann et al., 1983; Esfahani-Naser et al., 2002 and adjustments). Data were processed considering the average absorbance value of the negative control to 1.

Data analysis

The results were expressed as the mean \pm standard error. One-way analysis of variance was performed (ANOVA) to compare the means between the different treatments. Where necessary the test was performed retrospectively Fischer for comparison between groups, the 5% statistical significance.

Results and discussion

There was no statistically significant difference in the relative weight of the testes of animals exposed to different concentrations of crude oil in the soil (Figure 1). In a previous study, Da Silva-Junior et al (2012) showed similar results in the Algerian mouse *Mus spretus* exposed to oil.

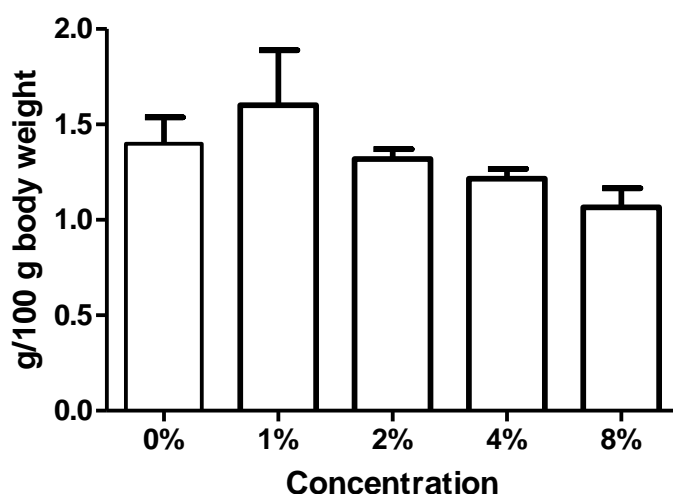


Figure 1 Percentage Of Testicles In Relation To Weight Bodied.

On the other hand, these data are contrary to the results reported by Orisakwe et al (2004) Male albino rats were exposed to different doses of crude oil dissolved in Tween 80 in drinking water for 7 days. The treatment with the crude oil showed a dependent-dose decrease in the absolute weight of testicles.

Sperm viability determined by MTT assay was significantly reduced in animals exposed to contaminated soil containing 2% oil compared to the other treatments. In this case, the endpoint of response appears to be not dependent-dose (Figure 2). There are many substances that are recognized worldwide as endocrine disruptors, among them are substances from oil as bisphenol A, Benzo (a) anthracene and benzo (a) pyrene. Many EDs cause different effects at different levels, including impacts at low doses which does not occur at high (Vandenberg et al 2009). Wang et al (2010) investigated the reproductive toxicity induced by organic extracts from petrochemical wastewater in rats where the results showed that organic extracts sperm viability decreased ($p < 0.01$), suggesting that the system in rat testicular cells can be useful for predicting potential reproductive toxicity of organic extracts in petrochemical effluents.

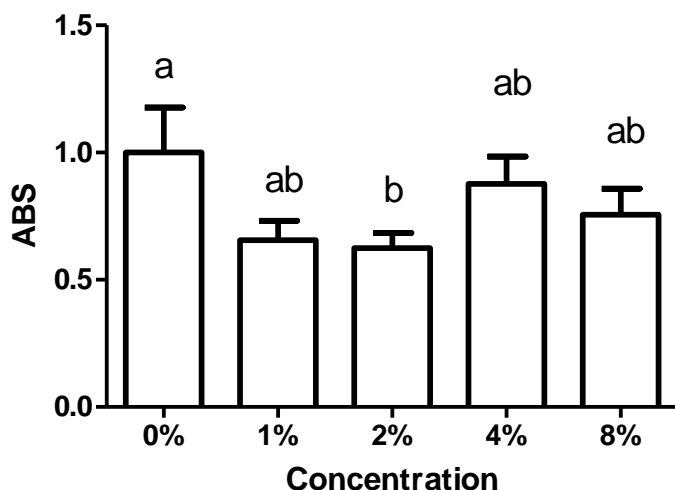


Figure 2. Sperm viability as determined by absorbance of MTT assay

Induction of sperm morphological abnormalities has been proposed as a rapid test for carcinogenic activity (Wyrobek et al 2005). In this assay, there was a decrease in the percentage of normal sperm in the concentrations 2, 4 and 8% (Table 1). Furthermore, the results demonstrated that sperm abnormalities type “lasso-like fold” are frequently observed following exposure to crude oil (Table 1).

Table 1. Percentage of normal sperm cells or different types of abnormality. The different letters in the column indicate significant difference

Treatment	Normal	Lasso-like fold	Two tails	Head abnormalities
0%	99.4±0.2a	0.6±0.2a	0a	0a
1%	92.1±5.8a	7.6±5.7a	0a	0.3±0.2a
2%	80.7±3.3b	19.1±3.3b	0a	0.2±0.1a
4%	69.2±7.8c	29.5±7.9c	0.1±0.1b	1.2±0.4b
8%	51.5±4.9d	46.4±6.2d	0.0±0.1ab	2.1±1.4b

Furthermore, the anomalies and the two tails type head sperm abnormalities are observed in the animals exposed to the two highest concentrations (4 and 8% of oil). (Table 1). A study using CD-1 mice showed that the concentration of 9.4 mg / kg of vanadium administered intraperitoneally for 60 days also caused a similar percentage of sperm abnormalities and changes as folded itself were more frequently observed (Aragon and Altamirano - Lozano, 2001). Silva-Junior et al (2013) evaluated the effects

of exposure to soil contaminated with oil in morphological changes in sperm from wild mouse *Mus spretus*. The frequency of banana and hook abnormalities was also higher in mice that were exposed to the contaminated soil. However, the frequency of sperm with two tails or amorphous head was similar between the control and mice exposed to oil, results that do not resemble the present study.

Although limited, there are some studies that evaluated the reproductive activity of the wild rodent *Calomys laucha*. Vilela et al (2014) evaluated the effects of administration *in utero* to bisphenol A (BPA) on seminal parameters of the offspring as sperm motility, acrosome integrity, membrane integrity, sperm morphology, where exposure caused a reduction in sperm parameters of *C. laucha*. Corcini et al (2012), aimed to evaluate *in vitro* the quality of sperm in *C. laucha*; to test for improvements in the *in vitro* penetration test (IVP). In turn, Heppe-Lopes et al (2011) show that the addition of copper to the drinking water causes significant changes in morphology, membrane integrity, and sperm acrosome *C. laucha*, but without affecting their fertilizing capacity *in vitro*. However, studies with *C. laucha* exposed to oil using sperm abnormalities parameters are non-existent.

In this study, we simulate the occurrence of an oil spill on the soil and the animal got into contact with various contaminants in the contaminant uptake pathways through the skin, by inhalation and geophagy. This exposure caused injuries in the germ cells which may have negative effects on reproductive performance and undermine the size and structure of the population. The results contribute to a better understanding of the damage caused in wild rodents from exposure to oil, important contaminant in coastal areas and urbanized regions. Finally, the *C. laucha* proves to be a good model to predict the biological impacts in the coastal zone / interface marine environment where it is constantly found.

Acknowledgments

The authors thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, CAPES, for the Master scholarship (K. A. De Almeida).

References

- Aragón AM, Altamirano-Lozano M (2011) Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 15:145-151
- Burgess LC (2013) Organic pollutants in soil. In: Brevik, E.C., Burgess, L.C. (Eds.), *Soils and Human Health*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 83-106.
- Cittadino EA, Carli PDE, Busch M, Kravetz FO (1994) Effects of food supplementation on rodents in winter. *J Mammal* 75:446-453.
- Colares EP (1997) Aspectos da Fisiologia Reprodutiva de *Calomys laucha* (Mammalia, Rodentia). Tesis, Universidade de São Paulo.

- Corcini CD, Stephan MHL, Colares EP, Santos ECS, Varela AS, Bongalhardo DC, Lucia T. *In vitro* assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from nonrodent species. *J Exp Zool A* 317:96–102. 2012
- Da Silva-Júnior FMR; De Almeida KA; Silva PF; Muccillo-Baisch AL (2013) Hematological profile as a crude oil exposure-related marker in wild rodent. *J BioSci Biotech* 2:89-94.
- Da Silva-Júnior FMR; Monarca RI; Dias D; Ramalhinho MG, Mathias MM; Muccillo-Baisch AL (2012) Physiological damage in Algerian mouse *Mus spretus* (Rodentia, Muridae) exposed to crude oil. *J BioSci Biotechn* 1:125-133.
- Da Silva-Júnior FMR; Monarca RI; Dias D; Ramalhinho, MG; Mathias, MM; Muccillo-Biasch (2013) A. L. Geno- and Cyto-toxicity in Free-Living Rodent *Mus spretus* Exposed to Simulated Onshore Oil Spill. *Bull Environ Contam Toxicol* 91:465–468.
- Doyle TJ; Bryan RT; Peters CJ (1998) Viral Hemorrhagic Fevers And Hantavirus Infections In The Americas. *Emerg Infect Dis* 12 :95-110.
- Feuston MH; Hamilton CE; Schreiner CA; Mackerer CR (1997) Developmental toxicity of dermally applied crude oil in rats. *J Toxicol Environ Health* 52:79–93.
- Heppe-Lopes M (2011) Effects of copper exposure via drinking water on sperm quality in the sand dune mouse *Calomys laucha* Olfers, 1818 (Rodentia: Muridae). Tesis, Universidade Federal do Rio Grande.
- Hodara VL; Espinosa MB; Merani MS; Quintans C (1989) *Calomys laucha* (Rodentia, Cricetidae): Growth and breeding in laboratory conditions. *Lab. Anim* 23:340-344.
- Kayal S; Connell DW (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons in biota from the Brisbane River Estuary, Australia. *Estuar Coast Shelf Sci* 40:475-493.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Nadim FN; Hoag GE; Liu S; Carley RJ; Zack P (2000) Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *J Petrol Sci Eng* 26:169-178.
- Naser-Esfahani MH; Aboutorabi R; Esfandiari E; Mardani M (2002) Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. *Journal of Assist Reprod Gen* 19:477–482.
- Nowack RM; Paradiso J (1983) Walker`s Mammals of the World. 4th ed. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Oliver T; Kostecki P; Calabrese E. (1995) State summary of soil and groundwater cleanup standards. Massachusetts Department of Environmental Protection.

Orisakwe OB; Akumka DD; Njan AA (2004) Testicular toxicity of Nigerian bonny light crude oil in male albino rats. *Reprod Toxicol* 18:439–442.

Park IS; Park JW (2011) Determination of a risk management primer at petroleum-contaminant sites: developing new human health risk assessment strategy. *J Hazard Mater* 2:1374-1380.

Pederassi GC (2005) Desenvolvimento sexual de *Calomys laucha* (Rodentia: Muridae) macho durante a puberdade. Dissertation, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Reis NR; Peracchi AL; Pedro WA; Lima IP (2006) Mamíferos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Tapisso JT; Marques CC; Mathias ML; Ramalhinho MG (2009) Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutat Res* 678:59-64.

Vandenberg LN; Maffini MV; Beverly SC; Rubin S; Soto AM (2009) Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocr Rev* 30:75–95.

Vandenbergh JG (2004) Animal models and studies of in utero endocrine disruptor effects. *ILAR J* 45:438–442.

Vilela J; Hartmann A; Silva EF; Cardoso T; Corcini CD; Varela-Junior AS; Martinez PE; Colares EP. (2014) Sperm impairments in adult vesper mice (*Calomys laucha*) caused by *in utero* exposure to bisphenol A. *Andrologia*. 46:971-978.

Wyrobek AJ; Bruce WR (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci* 72:4425-4429.

Wang X Shi W; Wu J; Hao Y; Hu G; Liu H; Han X; Yu H (2010) Reproductive toxicity of organic extracts from petrochemical plant effluents discharged to the Yangtze River, China. *J Environ Sci* 22:297–303.

Oxidative damage markers in Vesper mouse (*Calomys laucha*) exposed to a simulated oil spill**

Krissia Aparecida de Almeida^{a,b}, Ana Luíza Muccillo-Baisch^{a,b,c}, Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior^{a,c*}

^aLEFT - Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

^bPrograma de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

^cPrograma de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rua Visconde de Paranaguá, 102, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

*Corresponding author: f.m.r.silvajunior@gmail.com +55 53 32935249 LEFT - Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS CEP 96203-900, Brazil

**Formatado e submetido ao Environmental Toxicology and Pharmacology como short communication (Submitted: Apr 06, 2015)

Abstract

Small wild mammals have been used to measure damage caused by exposure to soil contaminated by oil, however, the study of toxic effects of oil using oxidative damage biomarkers in wild rodent *Calomys laucha* are nonexistent. This study aimed to evaluate the effects of acute exposure to contaminated soil by different concentrations of crude oil, simulating an accidental spill, using biomarkers of oxidative stress in different tissues of *C. laucha*. The animals exposed to petroleum contaminated soil showed an increase in lipid peroxidation and carbonyl group in protein in the three analyzed homogenized (liver, testes and blood cells), but the responses of total antioxidant capacity are tissue dependent. These results showed that acute exposure to soil contaminated by oil caused oxidative damage in *C. laucha* and showed that these small mammals may be useful for prediction of environmental damage resulting from exposure to organic contaminants such as oil.

Hightlights: *C. laucha* males were exposed to crude oil; Oil exposure caused oxidative damage in different tissues of this rodent; The exposure stimulated the antioxidant defenses in liver and lymphocytes.

Keywords: *Calomys laucha*, oxidative damage, crude oil, proteins carbonylation; Lipid peroxidation; Total antioxidant capacity.

Introduction

The toxicity of the crude oil is related to its hydrophobicity, because the lipid solubility is an important factor in the passage of oil components through the plasma membrane of cells, besides the degree of rupture of the membrane (Freedman et al, 1995). Moreover, it can have a direct consequence of metabolic activation by cytochrome P450, or indirectly, mainly related to the production of reactive oxygen species (ROS) as byproducts of metabolism (Baussant et al., 2009). Oxidative stress, resulting from an imbalance between prooxidant molecules, including antioxidants and ROS molecules in the body can affect cellular macromolecules (DNA, lipids and proteins) altering their function, causing oxidative stress inducing mutations or other molecules (Hanzalova et al., 2010).

It is known that in the case of exposure to environmental contaminants, some specific target organs can be affected in different ways and to analyze these parameters can assist in the more detailed prediction of injury induced in the body. The liver is one of the most important organs due to its biological functions such as the metabolism of drugs. Therefore, the liver is considered to be the common target organ for xenobiotic toxic and environmental. It plays an important role against toxic compounds that induce free radical damage because of a variety of enzymes having antioxidant which helps to maintain a reducing environment and preventing potentially toxic effect (Dhalla et al., 2000).

Whereas other organs, some environmental contaminants have a deleterious effect on the reproductive function, or directly affect stem cells, including damage to sperm DNA and increased production of ROS, or hormonal dysfunction (Saradha and Mathur, 2006). Such changes may cause damage on a systemic level, such as the immune system. The human body has the capacity to resist almost all types of organisms or toxins that tend to damage the tissues and organs. The immune system comprises various organs, including the spinal cord, spleen, thymus, and lymph nodes. Moreover, Abbas and Lichtman (2003) reported that lymphocytes produced in bone marrow are the most important cells of this system.

Our research group has used small mammals, such as *Mus spretus* Lataste 1883 (Rodentia: Muridae), to predict damage caused by acute exposure to soil contaminated by crude oil (Da Silva Júnior et al, 2012, 2013). Similarly, another wild rodent *Calomys laucha* Olfers 1818 (Rodentia: Cricetidae) was used to assess the effects of exposure to contaminated soil by different crude oil concentrations in

physiological, behavioral, hematological, mutagenic and reproductive parameters (De Almeida, 2012; Da Silva Júnior et al., 2013). However, the investigation of the toxic effects of crude oil using biomarkers of oxidative damage to this rodent is absent.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of acute exposure to contaminated soil by different concentrations of crude oil, simulating an accidental spill, using biomarkers of oxidative stress in different tissues of wild rodent *Calomys laucha*.

Material and methods

The wild rodents (*Calomys laucha* males) were coming from the animal house of unconventional rodents Biological Sciences Institute at FURG. The animals were kept in standard conditions of temperature ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) and photoperiod (12 h light / 12 h dark). These animals were fed with commercial feed (Bio Base, Bio-Tec, Águas Frias, SC) for laboratory animals and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA / FURG) process 23116.005277 / 2011-98, 31/2011.

The artificial soil consisted of 70% sand, 20% clay and 10% organic material (coconut fiber). Approximately 1 kg of soil was placed in the bottom of the cages and the animals were exposed individually for 14 days without renewal of the soil. The soil was mixed with *Hydra light* oil type (w / w). The treatments were: control (only artificial soil), 1% (control soil + 1% oil), 2% (control soil + 2% oil), 4% (control soil + 4% oil) and 8% (control soil + 8% oil). The experimental groups were composed of 6 animals. At the end of the experimental period, the animals were anesthetized with halothane, blood collected to obtain lymphocytes and euthanized by exsanguination. After dissection, the liver and testes were collected, weighed and stored ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) until analysis. Lymphocytes were obtained by lymphocyte isolation method, where the blood is diluted with saline and placed on Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS - GE Healthcare), followed by centrifugation for separating lymphocytes by a density gradient.

The antioxidant capacity against peroxy radical (ACAP) was measured as described by Amado et al. (2009). The relative difference among the areas of fluorescence curves obtained by samples in the absence and presence of ABAP (ROS generator) allowed us to calculate the antioxidant capacity of samples. Data are expressed as a

1/relative area. The final products of lipid peroxidation, including malondialdehyde were evaluated by TBARS method (thiobarbituric acid), as Oakes and Van Der Kraak (2003). The concentration of TBARS was expressed as nmol / mg tissue. The concentration of the carbonyl proteins was determined according to Hawkins et al. (2009) using the spectrophotometric method and the concentration of carbonyl protein carbonyl group measured in nmol / mg protein.

The results were expressed as the ratio between the mean of the different treatments and the control average. To evaluate the statistical significance was performed one-way analysis of variance (ANOVA). Where necessary the test was performed the Fischer test for comparison between groups, the 5% statistical significance.

Results and discussion

Animals exposed to oil-contaminated soil shows an increase in antioxidant capacity against peroxy radical in liver cells and lymphocytes in higher oil concentrations, but without being able to prevent lipid and protein damage. Thus, the results showed increased lipid peroxidation in the three analyzed homogenized (liver, testes and lymphocytes), and increasing the content of carbonyl groups (Table 1). The distinct magnitude suggests differences in the responses of contaminants distribution in the body and / or in the ability of target tissue to respond to the presence of toxic agents and can be useful for understanding the mechanisms of oil toxicity in wild mammals. The main molecular target of oxidative stress may vary depending on the cell, the type of exposure and the severity of stress (Fridovich, 1998). Oxidative stress in proteins can damage receptors, enzymes, signal transduction, enzymes and protein transport, and damage in other biomolecules. Oxidation of protein can activate the immune system by inducing the formation of antibodies and auto-immune diseases (Handy and Galloway, 2003). The detection of carbonyl groups being widely used as an indicator of oxidative damage to proteins (Bear and Clarkson, 2003). This type of damage is associated with numerous pathological disorders, including rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease, respiratory distress syndrome, Parkinson's disease and atherosclerosis (Zwart et al., 1999).

Moreover, damage to lipids are related to toxic effects of various chemicals, tissue injury and the development of diseases. There is evidence that the membrane peroxidation in liver and erythrocytes cause the formation of protein aggregates with

a high molecular weight membrane, causing the erythrocytes deformation (Akhgari et al., 2003).

In the current study, although the homogenized liver and lymphocytes have demonstrated an increase in the antioxidant capacity account peroxy radical damage to lipids and proteins were detected revealing losses of oil exposure. This preliminary study underscores the importance to investigate further the effects of damage to macromolecules found in systemic level, beyond the role of enzymatic and non-enzymatic antioxidants defenses to combat the generation of ROS.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, for the Master scholarship (K. A. De Almeida).

References

Abbas, A. K, Lichtman, A. H., 2003. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imune*. Revinter, Rio de Janeiro.

Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., Sabzevari, O., 2003 Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 205-211.

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.B., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009 A method to measure total capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.

Baussant, T., Bechmann, R.K., Taban, I.C., Larsen, B.K., Tandberg, A.H., Bjornstad, A., Torgrimsen, S. Naevdal, A., Oysaed, K.B., Jonsson, G., Sanni. S., 2009. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: a case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1796–1807.

Da Silva-Júnior, F. M. R., De Almeida, K.A., Silva, P. F., Muccillo-Baisch, A. L., 2013 Hematological profile as a crude oil exposure-related marker in wild rodent. *J BioSci Biotechn.* 2, 89-94.

De Almeida, K.A., 2012 Avaliação da toxicidade de solos contaminados por petróleo através de biomarcadores fisiológicos em *Calomys laucha* Olfers Monography, Universidade Federal do Rio Grande.

Dhalla, N.S, Temsah, R.M., Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18, 655-673.

Freedman, B., 1995. Oil pollution in: Environmental ecology: The ecological effects of pollutions, disturbances and other stresses. Academic Press, San Diego.

Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Bio.* 201,1203-1209.

Galloway, T., Handy, R., 2003 Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology.* 12,345-363.

Hanzalova, K., Rossner, P., Sram, RJ, 2010. Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 696, 114-121.

Hawkins, C.L.; Morgan, P.E.; Davies, M.J., 2009. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Bio Med.* 46, 965-988.

Oakes, K. D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS 235 assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*, 63, 447-463.

Saradha, B., Mathur, P.P., 2006. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 34–41.

Victor, V. M., De La Fuente, M., 2003. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-B. *Free Radical Res.* 37, 19-27.

Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Bio Med.* 26,202-226.

DISCUSSÃO GERAL

A estratégia deste estudo foi simular um derrame de diferentes concentrações de petróleo no solo e acompanhar durante 14 dias e avaliar os efeitos dessa exposição em roedores silvestres *Calomys laucha* que habitam regiões com grande aporte de contaminantes oriundos das atividades relacionada com o petróleo. Ao expor o animal diretamente ao solo contaminado, a soma de diferentes vias de exposição atuando conjuntamente para o aparecimento de efeitos adversos (absorção dermal, inalação, ingestão), tornou este tipo de exposição mais real para organismos silvestres.

Os roedores da espécie *Calomys laucha* demonstraram sinais de intoxicação aguda, tais como pelos eriçados, perda de pelo na porção ventral, letargia e dificuldade de locomoção, além de morte de alguns organismos logo no início da exposição ao solo contaminado com diferentes concentrações de petróleo. Por outro lado, a perda significativa de peso não foi observada em nenhum dos roedores

Embora o peso corporal pareça não ser um parâmetro alterado pela exposição ao petróleo em um derrame simulado, as medidas dos órgãos internos foram parâmetros eficazes para indicar prejuízos decorrentes da exposição ao petróleo

O estudo com esta espécie foi o primeiro a avaliar alterações a partir de testes comportamentais com roedores silvestres, no que tange os efeitos neurotóxicos de contaminantes ambientais. O aparato utilizado (teste do campo aberto) é capaz de medir alteração da atividade locomotora e exploratória, além de sugerir comportamento relacionado a medo e ansiedade. Enquanto a exposição ao petróleo parece ter diminuído a atividade locomotora (quadrados

periféricos) e estimulado medo e ansiedade (*grooming e freezing*), a exposição ao petróleo esteve primariamente relacionada à diminuição da atividade exploratória do animal.

Os biomarcadores de mutagenicidade e cito-toxicidade utilizados para investigação dos efeitos adversos da exposição ao petróleo ao roedor silvestre *C. laucha* demonstraram ser extremamente sensíveis. Os bioensaios foram realizados em células de diferentes linhagens (leucócitos, eritrócitos e espermatozoides) e todos os tipos celulares testados foram lesados por substâncias contidas no petróleo. De fato, a sensibilidade a agentes geno- e citotóxicos elevam esta espécie a condição de biomonitores de risco genético de populações naturais expostas ao petróleo em casos de desastres ambientais.

Por fim, as medidas relacionadas ao estresse oxidativo mostraram que o roedor silvestre *C. laucha* quando exposto ao derrame simulado de petróleo exibe um aumento da capacidade antioxidante contra o radical peroxil, sem conseguir, no entanto impedir os danos lipídico e proteico. Este perfil pró-oxidativo foi constatado no fígado e embora seja razoável acreditar que este perfil seja compartilhado com outros órgãos, este tipo de resposta bioquímica é estritamente tecido- ou órgão-dependente, sendo necessários estudos em outros órgãos.

De uma maneira geral, a preocupação em utilizar biomarcadores em diferentes níveis e escalas de avaliação toxicológica foi útil, pois foi capaz de identificar prejuízos em diferentes órgãos ou moléculas-alvo, bem como aqueles sinais externos que foram observados logo no início da exposição, indicando que além dos biomarcadores utilizados, a própria espécie

demonstrou ser sensível à contaminação. Os dados obtidos com a execução destes trabalhos contribui de forma inédita para a melhor compreensão dos danos fisiológicos, causados em roedores silvestres decorrentes da exposição ao petróleo, importante contaminante em áreas costeiras e regiões urbanizadas e estabelecer essa espécie como modelo biológico para o uso em biomonitoramento de contaminação ambiental.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Adesanya, OA; Shittu, LA; Omonigbehin, EA; Tayo, AO. Spermatotoxic impact of bonny light crude oil (BLCO) ingestion on adult male Swiss albino mice. *International Journal of Physical Sciences*, v. 4 (5), p. 349-353. 2009.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Case Studies in Environmental Medicine. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia, USA. 2009.

Bone, J., Head, M., Barraclough, D., Archer, M., Scheib, C., Flight, D., Voulvoulis, N. Soil quality assessment under emerging regulatory requirements. *Environ Int.*, 36, 609-22. 2010.

Broddle, WD; Dennis, MW; Kjtchen, DN; Vernot, EH. Chronic Dermal Studies of Petroleum Streams in Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 30, p. 47-54. 1996.

Cittadino, E.A., Carli, P.D.E., Busch, M., Kravetz, F.O., Effects of food supplementation on rodents in winter. *J. Mammal.* 75, 446-453. 1994.

Colares, E.P. Aspectos da Fisiologia Reprodutiva de *Calomys laucha* (Mammalia, Rodentia). Tese (doutorado). Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo. 1997.

Culbertson, J.B.; Valiela, I.; Peacock, E.E.; Reddy, C.M.; Carter, A.; Kruik, R.V. Long-term biological effects of petroleum residues on fiddler crabs in salt marshes *Mar. Pollut. Bull.* 54, pp. 955–962. 2007

Da Silva, J.; De Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. An alkaline single-cell gel eletrophoresis (comet) assay for

environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 1, p. 241-245, 2000

Da Silva-Júnior, F. M. R.; De Almeida, K.A.; Silva, P. F.; Muccillo-Baisch, A. L. Hematological profile as a crude oil exposure-related marker in wild rodent. *Journal of BioScience and Biotechnology*, v. 2, p. 89-94, 2013b.

Da Silva-Júnior, F.M.R; Monarca, R.I; Dias, D. ; Ramalhinho, M.G ; Mathias, M.M; Muccillo-Baisch, A. L. Geno- and Cyto-toxicity in Free-Living Rodent *Mus spretus* Exposed to Simulated Onshore Oil Spill. *Bull Environ Contam Toxicol.*; 91:465–468. (2013 a).

Da Silva-Júnior, F.M.R; Monarca, RI ; Dias, D. ; Ramalhinho, MG ; Mathias, MM; Muccillo-Baisch, A. L. Physiological damage in Algerian mouse *Mus spretus* (Rodentia, Muridae) exposed to crude oil. *Journal of BioScience and 208 Biotechnology*, v. 1, p. 125-133, 2012.

De Villafañe, G.; Bonaventura, S.M.; Bellocq, M.I.; Percich, RE. Habitat selection, social structure, density and predation in populations of Cricetine rodents in the pampa region of Argentina and the effects of agricultural practices on them. *Mammalia*; 52(3):339-359. 1988.

Di Toro, D.M.; McGrath, J.A.; Stubblefield, W.A. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: toxic potential and the toxicity of saturated mixtures *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, pp. 24–36. 2007.

Doyle, T.J.; Bryan, R.T.; Peters, C.J. Viral Hemorrhagic Fevers and Hantavirus Infections in the Americas. *Emerg Infect Dis* 12(1):95-110. 1998.

Easley, JR; Holland, JM; Gipson, LC; Whitaker, MJ. Renal toxicity of middle distillates of shale oil and petroleum in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 65, p. 84-91. 1982.

Espinosa-Reyes, G; Torres-Dosal, A; Ilizaliturri, C; Gonzalez-Mille, D; Diaz-Barriga, F; Mejia-Saavedra, J. Wild rodents (*Dipodomys merriami*) used as biomonitors in contaminated mining sites. Journal of Environmental Science and Health Part A, v. 45, p. 82–89. 2010.

Feuston, M.H.; Hamilton, C.E.; Schreiner, C.A.; Mackerer, C.R. Developmental toxicity of dermally applied crude oil in rats. J Toxicol Environ Health; 52:79–93. 1997.

Fine, P.; Graber, E. R.; Yaron, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. Soil Technology, v. 10, p. 133-153, 1997.

Gardner, G.R.; Yevich, P.P. ; Harshbarger, J.C; Malcolm, A.R. Carcinogenicity of Black Rock Harbor sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder Environ. Health Perspect. 90 (1991), pp. 53–66. 1991.

Gogoi, B.K.; Dutta, N.N.; Goswami, P.; Krishna Mohan, T.R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Advances in Environmental Research 7, 767–782. 2003.

Gonzalez, XI; Aboal, JR; Fernandez, JA; Carballeira, A. Evaluation of some sources of variability in using small mammals as pollution biomonitors. Chemosphere, v. 71, p. 2060–2067. 2008.

Heuser, VD; Silva, J; Moriske, H; Dias, JF; Yoneama, ML; Freitas, TRO. Genotoxicity Biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutes* Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 40, p. 227–235. 2002.

Hodara, V.L., Espinosa, M.B., Merani, M.S., Quintans, C., Calomys laucha (Rodentia, Cricetidae): Growth and breeding in laboratory conditions. Lab. Anim. 23, 340-344. 1989.

IARC: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Occupational exposures in petroleum refining: crude oil and major petroleum fuels. Lyon, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.1989.

Jacques, R.J.S.; Okeke, B.C.; Bento, F.M.; Peralba, M.C.R.; Camargo, F.A.O. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. Bioremediation Journal, v.11, n.1, p.1-11, 2007.

Khan, AA; Coppock, RW; Schuler, MM; Geleta, L. Biochemical changes as early stage systemic biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in rats. Toxicology Letters, v. 134, p.195-202. 2002.

Lemiere, S; Cossu-Leguille, C; Bispo, A; Jourdain, M; Lanhers, M; Burnel, D; Vasseur, P. DNA damage measured the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. Mutation Research, v. 581, p. 11-21. 2005.

Lockard, JM; Prater, JW; Viau, CJ; Enoch, HG; Sabharwal, PS; Hansberger, NS; Gleason, JR; Kamber, SJ; Lambert, CE; Carter, JC. Comparative study of the genotoxic properties of Eastern and Western U.S shale oils, crude petroleum, and coal-derived oil. Mutation Research, v. 102, p. 221-235. 1982.

Malins DC, Ostrander GK. Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives. Chelsea, MI: Lewis Publishers; 1994.

Mille, G.; Asia, L.; Guiliano, M.; Malleret, L.; Doumenq, Z. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France) *Mar. Pollut. Bull.*, 54, pp. 566–575. 2007.

Nakayama, SM; Ikenaka, Y; Hamada, K; Muzandu, K; Choongo, K; Yabe, J; Umemura, T; Ishizuka M. Accumulation and biological effects of metals in wild rats in mining areas of Zambia. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 185, p.4907-4918. 2013. Nowack, R.M., Paradiso, J., Walker`s *Mammals of the World*. 4th ed., Baltimore: John Hopkins University Press. 1362 pp. 1983.

Park, I.S., Park, J.W., 2011. Determination of a risk management primer at petroleum-contaminant sites: developing new human health risk assessment strategy. *J. Hazard. Mater.* 2e3, 1374e1380.

Parker, GA; Bogo, V; Young, RW. Acute Toxicity of Conventional versus Shale-Derived JP5 Jet Fuel: Light Microscopic, Hematologic, and Serum Chemistry Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 57, p. 302-317. 1981.

Patrick-Iwauanyanwu, KC; Onyemaenu, CC; Wegwu, MO; Ayalogu, EO. Hepatotoxic and nephrotoxic effects of kerosene and petrol-contaminated diets in wistar albino rats. *Research Journal of Environmental Toxicology*, v. 5, p. 49-57. 2011.

Shafir, S.; Rijn, J.V.; Rinkevich, B. Short and long term toxicity of crude oil and oil dispersants to two representative coral species. *Environ. Sci. Technol.*, 41, pp. 5571–5574. 2007.

Shubik, P; Saffiotti, U; Lijinsky, W; Fetra, G.; RaPaport, H.; Toth, B; Raha, CR; Tomatis, L; Feldman, R; Raiuaiix, H. *Studies on the Toxicity of*

Petroleum Waxes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. four, p. 1-62. 1962.

Van De Waile, T.R.; Verstraete, W.; Siciliano, S.D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Release from a Soil matrix in the In Vitro Gastrointestinal Tract. *Journal of Environmental Quality*, v. 33, p. 1343-1353, 2004.

Veldre, A; Janes, HJ. Toxicological Studies of Shale Oils, Some of Their Components, and Commercial Products. *Environmental Health Perspectives*, v. 30, p. 141-146. 1979.

Watanabe, T.; Hirayama, T. Genotoxicity of Soil. *Journal of Health Science*, v.47 (5), p.433-438, 2001.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety - IPCS. Selected petroleum products. Geneva, (Environmental Health Criteria, v. 20). 1982.

Wilson, JS; Holland, LM. Periodic response difference in mouse epidermis chronically exposed to crude oils or B (a) p: males vs. females. *Toxicology*, v. 50, p. 83-94. 1988.

Yamato O, Goto I, Maede Y. Hemolytic anemia in wild sea ducks caused by marine oil pollution. *J Wildlife Dis*; 32:381–4. 1996.