

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICO EM MORCEGOS
(MAMMALIA: CHIROPTERA) NO CERRADO, BRASIL**

Autor: Marcelino Benvindo de Souza
Orientadora: Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos
Coorientadora: Dr.^a Susi Missel Pacheco

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2018

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICO EM MORCEGOS
(MAMMALIA: CHIROPTERA) NO CERRADO, BRASIL**

Autor: Marcelino Benvindo de Souza
Orientadora: Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos
Coorientadora: Dr.^a Susi Missel Pacheco

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

BSM314 Benvindo-Souza, Marcelino
aa ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICO EM MORCEGOS (MAMMALIA:
CHIROPTERA) NO CERRADO, BRASIL / Marcelino Benvindo-
Souza; orientadora Lia Raquel de Souza Santos; co-
orientadora Susi Missel Pacheco. -- Rio Verde, 2018.
81 p.

Dissertação (Graduação em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio
Verde, 2018.

1. Micronúcleo. 2. mucosa bucal. 3.
genotoxicidade. 4. quirópteros. 5. conservação. I. de
Souza Santos, Lia Raquel , orient. II. Missel
Pacheco, Susi , co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DE MORCEGOS
(MAMMALIA:CHIROPTERA) DO CERRADO, BRASIL

Autor: Marcelino Benvindo de Souza
Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Classius de Oliveira
Avaliador externo
UNESP/São José do Rio Preto



Prof. Dr. Maria Andréia Corrêa
Mendonça
Avaliadora interna
IF Goiano/Campus Rio Verde



Prof. Dr. Lia Raquel de Souza Santos
Presidente da banca
IF Goiano/Campus Rio Verde

Dedicatória

A Deus, por proporcionar a compreensão do amor e a paz. Aos meus humildes pais, meus primeiros mestres pela excelente criação e ensinamentos. Aos mestres cientistas que doam sua vida pesquisando e semeando conhecimento, e finalmente cultivando novos cientistas em prol da iluminação do mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Benvindo de Souza e Albertina Rodrigues de Souza, e todos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado apoiando e incentivado nessa minha carreira acadêmica.

A Professora Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos (orientadora), meu agradecimento todo especial, pela confiança, apoio em todo esse processo, pelo profissionalismo, sabedoria, amizade, insetivos, paciência e pelo compartilhamento de seus conhecimentos sendo o alicerce para este empreendimento (formação), em prol da minha decolagem acadêmico/profissional e pessoal. Minha eterna honra e gratidão.

A Professora Dr.^a Susi Missel Pacheco (coorientadora), pela disponibilidade desde o primeiro momento, pelo insentivo, confiança, apoio em todo esse processo. Minha eterna honra e gratidão por colaborar em prol da minha decolagem acadêmico/profissional e pessoal.

Ao Professor Doutorando Rinneu Elias Borges, por ter sido um forte mediador para esse acontecimento, pela disponibilidade, dedicação, amizade e sugestões feitas para enriquecimento deste estudo.

A todos os mestres que passaram na minha vida, desde a Graduação em Ciências Biológica do Centro Universitário Luterano de Palmas, no Tocantins. Em especial ao Professor Ms. Pedro Heber Estevam Ribeiro pelo seu profissionalismo,

motivação, amizade e por me fazer despertar a paixão pela Biologia e pelo meio acadêmico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBio) do IF Goiano – Campus Rio Verde e a todos os docentes. Em especial também, ao Laboratório de Biologia Animal da instituição, pela disponibilidade de recursos para minha formação.

A todos os membros do grupo de Pesquisa em Ecotoxicologia Animal do Laboratório de Biologia Animal, em especial a Bióloga e amiga Rhayane Alves de Assis, pela parceria acadêmica/contribuições.

À turma (amigos e colegas) de mestrado em Biodiversidades e Conservação 2016-2018 do Campus Rio Verde, pela amizade, pelos auxílios nos momentos difíceis que passamos e pelo forte laço de companheirismo durante esses dois anos de convivência.

Aos mestrandos (as), Carolina Emilia Santos, Seixas Rezende Oliveira e Antonio Olimpio de Souza, pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar ao longo de todo esse processo do mestrado.

Aos colaboradores de campo, Pedro Rady, Enderson Alves Nunes, Pâmella Oliveira, Silvana Benvindo e Claudia Sousa e Silva, obrigado a todos vocês.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

BIOGRAFIA

Marcelino Benvindo de Souza, natural de Porto Nacional-TO, filho de João Benvindo de Souza e Albertina Rodrigues de Souza. Sua formação profissional iniciou em 2008, no curso de Ciências Biológicas – Licenciatura Plena pelo Centro Universitário Luterano de Palmas, concluindo a graduação em 2012. De 2012 a 2016 foi instrutor do curso profissionalizante, Conductor Ambiental, do Sistema Nacional de Aprendizagem Rural – TO/Programa Nacional de Ensino Técnico e Emprego – TO. Em 2016/1, iniciou seu curso *Stricto sensu* - Mestrado em Biodiversidade e Conservação no IF Goiano – Campus Rio Verde, concluindo-o em março de 2018.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	vii
BIOGRAFIA	viii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xv
RESUMO GERAL	xv
GENERAL ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I	10
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM MORCEGOS INSETÍVOROS (MAMMALIA: CHIROPTERA): O EPITÉLIO ORAL COMO INDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
<i>Área de estudo e espécies estudadas</i>	14
<i>Teste de micronúcleo (MN)</i>	16
<i>Análise de dados</i>	17
RESULTADOS	18
<i>Micronúcleo e anormalidades nucleares</i>	18
DISCUSSÃO	20
<i>Micronúcleo e anormalidades nucleares</i>	20
<i>Dano genotóxico em morcegos</i>	21
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO II	36
GENOTOXICIDADE EM MORCEGOS DO CERRADO BRASILEIRO E OS REFLEXOS ENTRE GUILDAS TRÓFICAS	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39

MATERIAL E MÉTODOS	41
<i>Desenho amostral</i>	41
<i>Teste de micronúcleo em morcegos</i>	42
<i>Análise estatística</i>	44
RESULTADOS	44
<i>Genotoxicidade entre guildas tróficas de morcegos</i>	44
<i>O conjunto de anormalidades nucleares (ANs)</i>	47
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CONCLUSÃO GERAL	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I – AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM MORCEGOS INSETÍVOROS (MAMMALIA: CHIROPTERA): O EPITÉLIO ORAL COMO INDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL

- Figura 1.** Registro de morcegos (*Nyctinomops laticaudatus*) no município de Palmas, estado de Tocantins. A: Representante da colônia em voo para forrageio e B: Detalhe de um indivíduo da espécie; C: Ponte Fernando Henrique Cardoso que abriga a colônia de morcegos e D: Os pontos escuros no céu são morcegos e no fundo da imagem a cidade de Palmas..... 16
- Figura 2.** Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, coradas com Giemsa e ampliada 1000x. (A) Célula típica, (B) célula com micronúcleo; (C) botões nucleares; (D) célula binucleada; (E) célula picnótica; (F) célula com cromatina condensada; (G) célula cariorréxis; (H) cariólise..... 18
- Figura 3.** Frequência de micronúcleo entre morcegos insetívoros dos fragmentos florestais e da colônia da Ponte Fernando Henrique Cardoso (PFHC). A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. O asterisco mostra diferenças significativas entre os grupos (*P <0,01; Teste t de Student)..... 19

Capítulo II - GENOTOXICIDADE EM MORCEGOS DO CERRADO BRASILEIRO E OS REFLEXOS ENTRE GUILDAS TRÓFICAS

- Figura 1.** Espécies amostradas durante o estudo em suas respectivas áreas..... 42
- Figura 2.** Frequência de micronúcleo em mucosa bucal de morcegos em (A) Rio Verde Goiás e (B) Palmas Tocantins. A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. Letras diferentes representam diferença estatística, mas valores acompanhados da mesma letra são semelhantes entre si..... 44
- Figura 3.** Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, coradas com Giemsa e ampliada 1000x. A: Célula típica, B: célula com micronúcleo; C: célula com broto nuclear; D: célula binucleada; E: célula cariorréxis; F: célula com cromatina condensada; G: célula picnótica; H: célula cariólise. Seta: indicação do micronúcleo..... 45
- Figura 4.** Comparação da frequência de micronúcleo entre área agrícola em relação área urbana para guildas de nectarívoro, frugívoro e insetívoro. *Representa diferença significativa entre ambientes..... 46
- Figura 5.** Soma das anormalidades nucleares (ANs) em mucosa bucal de morcegos em (A) Rio Verde-GO e (B) Palmas-TO. A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. Letras diferentes representam diferença estatística, mas valores acompanhados de uma mesma letra são semelhantes entre si..... 47

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I – AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM MORCEGOS INSETÍVOROS (MAMMALIA: CHIROPTERA): O EPITÉLIO ORAL COMO INDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL

Tabela 1. Médias±desvio-padrão das alterações nucleares observadas em células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos.....	18
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo II – GENOTOXICIDADE EM MORCEGOS DO CERRADO BRASILEIRO E OS REFLEXOS ENTRE GUILDAS TRÓFICAS

Tabela 1. Critérios de pontuação utilizados para identificar anomalias nucleares [Adaptado de Bolognesi et al.(2013)].....	41
Tabela 2. Média±desvio padrão da frequência de cada ANs nas guildas tróficas de morcegos do Cerrado.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS, SGLAS, ABREVIACÕES

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

IF: Instituto Federal

n: Número

PFHC: Ponte Fernando Henrique Cardoso

g: Grama

MN: Micronúcleo

MNs: Micronúcleos

ANs: Anormalidades nucleares

BI: Binucleada

PI: Picnose

CA: Cariólise

CR: Cariorréxi

BE: Broto nuclear

CD: Cromatina condensada

NaCl: Cloreto de sódio

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Mp: Mega pixel

UCs: Unidade de Conservação

Km²: Quilômetros quadrado

Km: Quilômetro

DP: Desvio padrão

RESUMO GERAL

Os morcegos, por apresentarem alta plasticidade e longevidade e por forragearem diversos tipos de ambientes, podem ser considerados essenciais biomonitores na qualidade ambiental. Contudo, enfrentam uma série de ameaças em todo o mundo, dentre elas a exposição a substâncias químicas, como pesticidas e outros agentes estressores. Assim, para detectar a presença de danos genotóxicos, o teste de micronúcleo (MN) pode ser aplicado para verificar alterações induzidas por agentes xenobióticos. Desse modo, esse estudo abrange duas investigações, apresentadas em forma de capítulos, em que o primeiro descreve a frequência de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal entre morcegos insetívoros, no município de Palmas, TO. Os dados demonstraram maior sensibilidade genotóxica para *N. laticaudatus* da colônia na Ponte Fernando Henrique Cardoso (PFHC), em relação aos de fragmentos florestais. No segundo capítulo (*i*) realça guildas tróficas (insetívoros, frugívoros e nectarívoros, entre morcegos capturados em área agrícola, no cerrado goiano em Rio Verde, Goiás e morcegos da PFHC e fragmentos florestais, de área urbana no município de Palmas, estado do Tocantins. Nesse sentido, testa-se a hipótese da sensibilidade genotóxica entre esses diferentes hábitos alimentares, em relação aos ambientes. Além de MN, outras anormalidades nucleares foram identificadas, tais como, célula binucleada, célula com núcleo picnótico, célula com cromatina condensada e células anucleadas, para indicar a relação com a frequência de MN. Os dados obtidos demonstraram maior sensibilidade genotóxica em morcegos frugívoros de área agrícola e urbana, bem como insetívoros de área urbana. Assim, a partir das evidências com esse biomarcador, o trabalho proporciona embasamento para reforçar a importância da preservação e integridade de habitats para a manutenção da diversidade da fauna de quirópteros.

Palavras-chave: Micronúcleo, mucosa bucal, genotoxicidade, quirópteros, conservação.

GENERAL ABSTRACT

Bats, due to their high plasticity and longevity and foraging in different environments, can be considered essential biomonitors in environmental quality. However, they face a number of threats around the world, including exposure to chemicals such as pesticides and other stressors. Thus, to detect the presence of genotoxic damage, the micronucleus (MN) test can be applied to verify changes induced by xenobiotic agents. Thus, this study covers two investigations, presented in the form of chapters, where the first describes the frequency of micronucleus in exfoliated cells of buccal mucosa between insectivorous bats in the municipality of Palmas, TO. The data showed greater genotoxic sensitivity for *N. laticaudatus* of the colony in the Fernando Henrique Cardoso Bridge (PFHC) in relation to those of forest fragments. The second chapter (i) highlights trophic guilds (insectivores, frugivores and nectarivores) between bats captured in an agricultural area in the Goiano cerrado in Rio Verde, Goiás and PFHC bats, and forest fragments of an urban area in the municipality of Palmas, state of Tocantins. In this sense, the hypothesis of the genotoxic sensitivity between these different eating habits in relation to the environments is tested. In addition to MN other nuclear abnormalities have been identified, such as, binucleate cell, cell with pyknotic nucleus, cell with condensed chromatin and anucleated cells to indicate the relation with MN frequency. The data obtained showed greater genotoxic sensitivity in frugivorous bats of agricultural and urban area, as well as insectivores of urban area. Thus, based on the evidence with this biomarker, the work provides support to reinforce the importance of habitat preservation and integrity for the maintenance of the diversity of the bats' fauna.

Key words: Micronucleus, buccal mucosa, genotoxicity, chiroptera, conservation.

INTRODUÇÃO

Aos quirópteros são atribuídos elevados níveis de interação com o ambiente em que vivem (Williams et al., 2010). Estes animais de vida longa apresentam alta relevância ecológica, desempenhando um papel crucial como agentes polinizadores, dispersores de sementes, controladores de pragas e até mesmo como elementos-chave para a avaliação da qualidade dos ecossistemas (Hoenerhoff; Williams 2004; Walker et al., 2007; Williams et al., 2010). São os únicos mamíferos capazes de voo verdadeiro, com grande diversidade no mundo e com cerca de 1300 espécies descritas (Fenton; Simmons 2014). No Brasil há aproximadamente 179 espécies distribuídas em 68 gêneros e nove famílias (Nogueira et al., 2014). Para o cerrado registra-se em torno de 118 espécies, ou seja, 40% dos mamíferos do bioma, além disso, totalizam 25% da mastofauna brasileira, sendo também o grupo mais diversificado (Nogueira et al., 2014; Aguiar et al., 2016). Em se tratado de cerrado, este vem continuamente pressionado por efeitos antrópicos, os quais foram responsáveis pela conversão de áreas nativas em terras agrícolas e pastagens, restando apenas 50% de sua cobertura natural (Klink; Machado 2005).

O declínio populacional de morcegos pode ser visto em todo o planeta, sendo resultante de uma gama de fatores incluindo: perda de abrigos, mudanças na qualidade de recursos como a água, disponibilidade e qualidade das presas (Pacheco et al., 2010; Pilosof et al., 2014; Hernout et al., 2016), urbanização (Pacheco et al., 2010), industrialização, mudanças climáticas (Jones et al., 2009; Frick et al., 2010), pressão de doenças (Hayman et al., 2016), intensificação da agricultura, produtos químicos como pesticidas (Wickramasinghe et al., 2003; Berny 2007; Stechert et al., 2014) e metais pesados (Walker et al., 2007; Hernout et al., 2016). Dessa forma, avaliar os impactos de contaminantes na saúde desses mamíferos é um desafio em razão da presença de múltiplos estressores e da complexidade dos ambientes.

Nesse contexto, o teste de MN como um marcador biológico em animais selvagens pode contribuir diretamente para detectar, quantificar e compreender as consequências da exposição a produtos químicos e riscos biológicos no meio ambiente (Torres-Bugarín et al., 2014). O teste é aplicável em qualquer célula em divisão, em tecidos ou órgãos (Uno et al., 2015). Os micronúcleos são pequenas massas de cromatina que são encontradas fora do núcleo principal das células (Ghisi et al., 2016),

e se originam de rupturas cromossômicas ou do mau funcionamento do fuso mitótico durante a divisão celular (Gómez-Arroyo et al., 2000; Fenech 2007; Angelieri et al. 2014). Durante esse processo de divisão celular, cromossomos inteiros ou cromossomos parciais que não foram incorporados no núcleo principal da célula-filha, aparecem como estruturas pequenas, redondas e escuras, com a mesma aparência e refração do material nuclear (Gómez-Arroyo et al., 2000; Fenech 2007).

Células com múltiplos micronúcleos são raras em indivíduos saudáveis (Tomas et al., 2009a), mas tornam-se mais comuns na presença de certos fatores exógenos (Torres-Bugarín et al., 2007; Bonassi et al., 2011) ou endógenos (Migliore et al., 1999; Rodríguez-Vázquez et al., 2000). A exposição a substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas como pesticidas, partículas de poeira e metais pesados, mostrou aumentar a frequência de formação de micronúcleos (Guilherme et al., 2010; Pastor et al. 2003, Tomas et al., 2009a; Castañeda-Yslas et al. 2016; Benvindo-Souza et al., 2017), sendo possível observar os efeitos genotóxicos entre a primeira e a terceira semana após a exposição aos xenobióticos (Tomas et al., 2009a).

Até o presente momento, não há registros da utilização do teste de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos. No entanto, esse teste utilizando linfócitos e reticulócitos periféricos de animais oriundos de ambiente com radiação ionizante foi detectado dano ao DNA (Meehan et al., 2004). Particularmente, o teste de MN em células esfoliadas de mucosa bucal, foi desenvolvido para aplicação em humanos (Thomas et al., 2009a; Benvindo-Souza et al., 2017). Contudo, mostrou satisfatório para organismos não humanos como aves (Shepherd; Somers 2012), e experimentos com roedores perante exposição de metais pesados e Alzheimer (Cavusoglu et al., 2009a,b; Thomas et al., 2009b; Morita et al., 2011). Ainda sobre alguns roedores cujo peso e tamanho corpóreo se assemelham ao de morcegos, em modelos experimentais laboratoriais, foram estudados diferentes tecidos, que incluíam o epitélio intestinal, pele, baço, pulmão, estômago, bexiga, mucosa bucal, vagina, tecido fetal/neonatal, fígado e eritrócitos (Morita et al., 2011; Uno et al., 2015). Estes tecidos foram escolhidos por serem locais alvo de agentes cancerígenos e/ou relevantes para uma via de exposição específica (Morita et al., 2011; Uno et al., 2015). Entretanto, o teste mais frequente de micronúcleos em roedores, é realizado usando células hematopoiéticas na medula óssea ou sangue periférico para avaliação de classificação de produtos químicos (Uno et al., 2015).

Considera-se a mucosa oral como a primeira linha de contato com diferentes agentes perigosos (Torres-Bugarín et al., 2014), torna-se um sítio ótimo para investigação. Em morcegos, estudos têm reportado dieta comprometida, com invertebrados e plantas que possivelmente tiveram contato direto ou indireto com agentes tóxicos, os quais têm gerado sérios efeitos tóxicos (Milton; Johnson 1999; Dietz et al., 2009; Williams et al., 2010; Hernout et al., 2011; Hernout et al., 2016). Além de alimentos menos saudáveis, também tem sido documentada ingestão de água contaminada, seguida por exposição cutânea e por inalação de xenobióticos (Pilosof et al., 2014; Losano 2015; Hernout et al., 2016), e pode resultar em danos letais ou subletais que a longo prazo podem levar ao declínio populacional de espécimes (Amaral et al., 2012a,b; Stechert et al., 2014; Losano 2015).

O teste de MN em mucosa bucal é um dos métodos bem estabelecidos e minimamente invasivos comparados a estudos com amostras de sangue para teste de linfócitos ou biópsia de tecidos, pode ser executado rapidamente (Thomas et al., 2009a; Dey et al., 2012; Torres-Bugarín et al., 2014). Nesse enfoque, o presente estudo reporta a genotoxicidade de morcegos do cerrado. Para isso, o trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o (i) primeiro abrangendo uma análise de morcegos insetívoros do município de Palmas-TO, para detectar MN e diferentes alterações nucleares (ANs), como, células com broto nuclear, células binucleadas, picnóticas, com cromatina condensada e cariólise, para estabelecer a eficiência da aplicabilidade do ensaio perante pressão genotóxica em morcegos. Vale salientar que o Tocantins é um dos estados brasileiros em que a quiropterofauna é pouco estudada (Gregorin et al., 2011). Já no (ii) segundo capítulo, a investigação é focada em dois municípios (Rio Verde-GO e Palmas-TO) e foi avaliado, se morcegos frugívoros, nectarívoros e insetívoros diferem quanto à frequência de micronúcleos, e se animais capturados em área agrícola diferem quanto à genotoxicidade dos coletados em fragmentos urbanos. Para o município de Rio Verde, Goiás, este é um dos municípios que mais utiliza pesticidas no Brasil (Pignati et al., 2017).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M. B., 2012a. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy

metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology*, 72:299-304.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012b. Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica*, 14:225-232.

Angelieri, F., Franchi, L., Cevidanes, L.H.S, Scanavini M.A., Mcnamara-Jr, J.A., 2014. Long-term treatment effects of the FR-2 appliance: a prospective evaluation 7 years post-treatment. *European Journal of Orthodontics* 36:192-199.

Benvindo-Souza, M.; Assis, R.A.; Oliveira, E.A.S.; Borges, R.E.; Santos, L.R.S. 2017. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0727-2>

Berny, P., 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30:93-100.

Bonassi, S, Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V.M., Demircigil, G.C., Domínguez, Odio, A., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montero, Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S, Favero Salvadori, D.M., Shaposhnikova, A., Stopper H., Thomas, P, Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., Zúñiga González, G., Fenech, M., 2011. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728:88-97.

Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalcxin, E., 2009a. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Journal of Medicinal Food* 12:1286-1292

Cavusoglu, K., Yapar K., Yalcxin E., 2009b. Antioxidant potential of *Ginkgo biloba* leaf extract against uranium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Fresenius Environmental Bulletin* 18:1551-1558

Castañeda-Yslas, I. J., Arellano-García, M. E., Garcia-Zarate, M. A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M. G. and Torres-Bugarín, O., 2016. Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, ID 7934257 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7934257>

Dietz, C., VON Helversen, O., Nill, D., 2009. *Bats of Britain, Europe and Northwest Africa*. London, A & C Black Publishers, London, 400p.

Dey, P., Samanta, S., Susheilia, S., 2012. Micronucleus assay in buccal smears of breast carcinoma patients. *Diagnostic Cytopathology*, 40:664-666.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2:1084-1104.

Fenton, M.B., Simmons, N. 2014. *Bats – A world of science and mystery*. New York: The University of Chicago Press, 323p.

Frick, W.F., Reynolds, d.S., Kunz, T.H., 2010. Influence of climate and reproductive timing on demography of little brown myotis *Myotis lucifugus*. *Journal of Animal Ecology*, 79:128-136.

Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M.A., Villalobos-Pietrini, R., De Leon-Rodriguez, J., 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466:117-124.

Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25:523-530.

Ghisi, N.C., Cestari, M.M., 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term environmentally low concentration exposure. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:3201-3207.

Gregorin, R., Gonçalves, E., Aires, C.C. & Carmignotto, A.P., 2011. Morcegos (Mammalia: Chiroptera) da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: composição específica e considerações taxonômicas. *Biota Neotropica*, 11:299-312.

Hayman, A. T. S., Pulliam, J. R. C., Marshall, J. C., Cryan, P. M., WEBB, C. T., 2016. Environment, host, and fungal traits predict continental-scale white-nose syndrome in bats. *Science Advances*, 2:1.

Hernout, B. V., Arnold, K. E., Mclean, C. J., Grimm, V. & Boxalt. A. B. 2011. Predicting the threats of chemicals to Wildlife: what are the challenges? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7:499-506.

Hernout, B.V., Arnold, K.E., Mcclean, C.J., Walls, M., Baxter, M., Boxall, A.B.A., 2016. A national level assessment of metal contamination in bats. *Environmental Pollution*, 214:847-858.

Hoenerhoff m. & Williams K. 2004. Copper-associated hepatopathy in a Mexican fruit bat (*Artibeus jamaicensis*) and establishment of a reference range for hepatic copper in bats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16:590-593.

Jones, G., Jacobs, D.S., Kunz, T.H., Willig, M.R., Racey, P.A. 2009. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endanger. Species Research*, 8:93-115.

Losano, N. F. Efeitos da exposição ao inseticida deltametrina em morcegos frugívoros. 2015. 31 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Truter, E. J., Parker, M. I. 2004. Evaluation of DNA damage in a population of bats (Chiroptera) residing in an abandoned monazite mine. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557:183-190.

Milton, A. & Johnson, M., 1999. Biomonitoring of contaminated mine tailings through age accumulation of trace metals in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Environmental Monitoring*, 1:219-225.

Migliore, L., Bevilacqua, C., Scarpato, R., 1999. "Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients," *Mutagenesis*, 14:227–231.

Morita, J.T, MacGregor, J.T, Hayashi, M., 2011. Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis*, 26: 223-230.

Nogueira, M.R., Lima, I.P., Moratelli, R., Tavares, V.C., Gregorin, R. & Peracchi, A.L. 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List Journal of species lists and distribution*, 10:808-821.

Pacheco, S.M., Sodré, M., Gama, A.R., Bredt, A., Cavallini - Sanches E.M., Marques, R.V., Guimarães, M.M, Bianconi, G. 2010. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de A o para a Conserva o no Brasil. *Chiroptera Neotropical*, 16:629-647.

Pignati, A.W., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C., Pignatti, M.G. 2017. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ci ncia & Saúde Coletiva*, 22:10.

Pilosof, S., Korinea, C., Moorec, M. S., Krasnova, B. R., 2014. Effects of sewage-water contamination on the immune response of a desert bat. *Mammalian Biology* 79:183-188.

Rodríguez Vázquez, M., Sánchez Ortiz, A., Ramos Remus, C., Zúñiga, G., Torres Bugarín, O., 2000. "Evaluación de la genotoxicidad de la ciclofosfamida mediante prueba de micronúcleos en pacientes con lupus eritematoso sistémico," *Revista Mexicana de Reumatología*, 15:41-45.

Shepherd, G.L. & Somers, C.M., 2012. Adapting the Buccal Micronucleus Cytome Assay for Use in Wild Birds: Age and Sex Affect Background Frequency in Pigeons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53:136-144.

Stechert, C., Kolb, M., Bahadir, M., Djossa, B. A. & Fahr, J., 2014. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:8812-8821.

Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Nava, A., Flores-García, A. & Ramos-Ibarra M.L., 2014. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers*, 2014: ID 956835. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/956835>

Torres-Bugarín, O., Covarrubias-Bugarín, R., Zamora-Perez, A.L., Torres-Mendoza, B.M., García-Ulloa, M., Martínez-Sandoval, F.G., 2007. "Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in bucca mucosa cells of bodybuilders," *British Journal of Sports Medicine*, 41:592–596.

Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. & Fenech, M. 2009a. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4: 825.

Thomas, P., Wang, Y.J., Zhong, J.H., Kosaraju, S.O., Callaghan, N.J., Zhou, X.F., Fenech, M. 2009b. Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability

events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Mutation Research*, 661:25-34

Uno, Y., Morita, T., Luijten, M., Beevers, C., Hamada, S., Itoh, S., Ohyama, W., Takasawa, H. 2015. Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group. *Mutation Research*, 783:19-22

Walker, L.A., Simpson, V.R., Rockett, L., Wienbeurg, C.L. & Shore, R.F., 2007. Heavy metal contamination in bats Britain. *Environmental Pollution*, 48:483-490.

Williams, M., Ramos, D., Butron, A., Gonzales-Zúñiga, S., Ortiz, N. & Torre, B., 2010. Concentraciones de metales pesados en murciélagos del lodge "cock of the rocks" y alrededores, Kosñipata, Cuzco, Perú. *Ecología Aplicada*, 9:133-139.

Wickramasinghe, L.P., Harris, S., Jones, G., Vaughan, N. 2003. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: impact of agricultural intensification. *Journal of Applied Ecology*, 40:984-993.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM MORCEGOS INSETÍVOROS (MAMMALIA: CHIROPTERA): O EPITÉLIO ORAL COMO INDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL

Avaliação genotóxica em morcegos insetívoros (Mammalia: Chiroptera): o epitélio oral como indicador da qualidade ambiental

RESUMO

O teste do micronúcleo (MN) vem sendo aplicado há mais de três décadas na mucosa bucal humana. No entanto, para mamíferos silvestres este estudo é pioneiro na avaliação genotóxica em células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos. O ensaio foi aplicado em quirópteros insetívoros (*Noctilio albiventris* e *Pteronotus parnellii*) coletados em fragmento florestal em Palmas, TO, comparado com insetívoros, *Nyctinomops laticaudatus*, de uma colônia em abrigo na Ponte Fernando Henrique Cardoso, no mesmo município, uma das maiores populações de molossidae já registrada no Brasil. Foi detectada frequência significativa de micronúcleos (MN) nos morcegos da colônia. Além da alta frequência de MN, outras anormalidades nucleares apresentaram aumento significativo como, células binucleadas, células com cromatina condensada e cariólises comparado aos animais dos fragmentos, demonstrando que os animais da colônia estão susceptíveis ao dano genotóxico. Resultados fornecem importante alternativa de replicabilidade do biomarcador na fauna silvestre, e visa somar aos esforços para compreensão do crescente declínio populacional de morcegos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Anormalidade nuclear, Insetívoros, Quirópteros, Cerrado.

Genotoxic evaluation of insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera): the oral epithelium as an indicator of environmental quality

ABSTRACT

The micronucleus (MN) test has been applied for more than three decades in the human oral mucosa. However for wild mammals this study is a pioneer in the genotoxic assessment in exfoliated cells of the buccal mucosa of bats. The experiment was carried out in insectivorous bats (*Noctilio albiventris* and *Pteronotus parnellii*) collected in Municipal Conservation Units in Palmas, compared to insectivorous, *Nyctinomops laticaudatus*, from a colony at the Fernando Henrique Cardoso Bridge in Palmas Tocantins, one of the largest populations of molossidae ever registered in Brazil. A significant frequency of micronuclei (MN) was detected in the bats of the colony. In addition to the high frequency of MN, other nuclear abnormalities showed significant increase as, pyknosis cells and cells with condensed chromatin, showing that the colony animals are susceptible to genotoxic damage. However, further studies are needed to predict which xenobiotic agents may have promoted the formation of MN in *Nyctinomops laticaudatus*. These results seek to provide an important biomarker replication alternative in wildlife, and aims to understand the increasing population decline of bats.

Key words: Ecotoxicology, nuclear abnormality, Insectivora, Chiroptera, Cerrado.

INTRODUÇÃO

Micronúcleos têm sido utilizados como biomarcadores de danos causados por exposições genotóxicas em vertebrados (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009a; Shepherd; Somers 2012; Bolognesi et al., 2013; Korsakov et al., 2014; Lima et al., 2016). O teste constitui um método não invasivo de quantificar a frequência de micronúcleos (MN) em humanos para monitoramento toxicológico, avaliação do impacto nutricional, estilo de vida, proliferação celular e morte celular (Holland et al., 2008; Bolognesi et al., 2013).

Os micronúcleos surgem durante a mitose de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não estão incluídos nos núcleos principais das células filhas (Majer et al., 2001; Angelieri et al., 2014; Sarpal et al., 2016). Eles podem ter origem clastogênica (induzida por substâncias que causam ruptura cromossômica) ou aneugênica (quando agentes afetam o aparelho do fuso mitótico) (Belien et al., 1995, Majer et al., 2001; Sarpal et al., 2016). Para Majer et al. (2001), independente da origem dos MNs, não há diferença quanto sua presença entre os indivíduos que foram expostos pelo período de muitos anos e outros que foram expostos apenas por um curto período de tempo, em ambos os casos há danos celulares.

Embora as características citogenéticas do epitélio bucal possam ser utilizadas como "dosímetro biológico" do nível total de poluição ambiental (Martins et al., 2009; Rosa et al., 2013; Korsakov et al., 2014; Espitia-Perez et al., 2016), o teste de MN em mucosa bucal não foi desenvolvido necessariamente para a fauna silvestre. No entanto, a aplicação desse teste foi adaptada para aves, com as mesmas anormalidades nucleares, relatadas em humanos (micronúcleo, célula com broto nuclear, binucleada, célula com cromatina condensada, cariólise, cariorréxi e picnótica), foram detectadas (Shepherd; Somers 2012). Pesquisas com roedores, encontraram micronúcleo e cariólise em mucosa bucal perante a exposição a Cádmiio e Urânio (Cavusoglu et al., 2009a,b), e assim, verifica-se a possível viabilidade do uso desse biomarcador para táxons selvagens.

Diante desse contexto, chamando a atenção aos morcegos, que de diversas espécies, em escala mundial, estão em declínio populacional (Hernout et al., 2016), e os contaminantes de origem agrícola principalmente organoclorados, além de metais pesados são considerados estressores potenciais para perturbação nas populações destes

organismos (Clark; Shore 2001; Jones et al., 2009; Bayat et al., 2014; Zukal et al., 2015; Hernout et al., 2016; Valdespino; Sosa 2017). Esses mamíferos são sensíveis às acumulações de pesticidas e metais pesados, enquanto fornecem serviços ecossistêmicos como predação de insetos (Hickey et al., 2001; Jones et al., 2009; Stechert et al., 2014). A exposição a estes contaminantes pode levar não apenas impactos agudos e letais, mas também efeitos subletais, como diminuição do peso corporal, dano no DNA, interferência na memória de voo, e comprometimento no sistema reprodutor dos machos (Thies et al., 1996; Miranda 2012; Amaral et al., 2012a,b; Stechert et al., 2014; Bayat et al., 2014; Losano 2015; Hsiao et al., 2016) podendo comprometer a estrutura populacional de morcegos.

Por serem considerados indicadores de saúde dos ecossistemas (Jones et al., 2009), uma gama de tecidos destes animais (fígado, rins, sangue, estômago, pele, ossos, carcaças) têm sido alvo das investigações toxicológicas, além do guano (Clark et al., 1982; Zocche et al., 2010; Bayat et al., 2014; Secord et al., 2015; Zukal et al., 2015; Hernout et al., 2016) para biomonitoramento de compostos químicos (pesticidas e metais) em diversos tipos de ambientes. No entanto, a detecção de agentes xenobióticos em morcegos, requer métodos muitas vezes complexos, uma vez que demandam recursos tecnológicos e técnicos altamente treinados para ler e interpretar os dados. Assim, empregou-se o teste de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal em morcegos insetívoros, com a finalidade de detectar micronúcleo e diferentes alterações nucleares e propor a eficiência desse biomarcador para avaliação da pressão genotóxica em morcegos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e espécies estudadas

Um total de 51 morcegos foram coletados (SISBIO nº 54101-1 e CEUA/IF Goiano - nº 8436060516) para os estudos ecotoxicológicos envolvendo o teste de micronúcleo em dois diferentes ambientes no período compreendido de julho de 2016 a junho de 2017. Destes, 30 morcegos insetívoros da espécie *Nyctinomops laticaudatus* (Família Molossidae) foram capturados com auxílio de puçá, em uma colônia localizada na Ponte Fernando Henrique Cardoso (PFHC) no município de Palmas, TO (S10 11'

05.76", W48 22' 02.23"), bioma Cerrado. Estima-se que a colônia possua entre 500 a 5000 indivíduos entre abril e junho e que esse número aumente para alguns milhares entre julho a setembro. Os animais permanecem neste local entre abril a outubro (Figura 1) quando posteriormente ocorre o deslocamento sazonal. Essa nossa observação está de acordo com a literatura especializada, que descreve o tamanho de colônia dessa espécie variando entre 150 a 1000 indivíduos de abril e outubro, ou alguns milhares entre junho e setembro (Vieira 2012; Villa 1960; Avila-Flores et al. 2002; Fabian; Gregorin 2007; Pacheco et al., 2010).

A outra amostra de morcegos também insetívoros, representada pela espécie *Noctilio albiventris* (Família Noctilionidae), foi capturada (n=12) por meio de redes de neblina em área com fitofisionomia de mata de galeria e ciliar na Unidade de Conservação Municipal Machado (S10°17'31.55", W048°19'32.81") (Palmas 2007). Outros espécimes de *Noctilio albiventris* (n=6) e *Pteronotus parnellii* (Família Mormoopidae, n=3) foram coletados na Unidade de Conservação Municipal Brejo Comprido (S10°12'08.95", W048°19'54.09"). Essas áreas estão inseridas no interior da cidade de Palmas e distantes a ±20km da área de influência de desenvolvimento agrícola, no entanto sofre influência direta com a urbanização. A UC Brejo Comprido apresenta 448,81 ha, sendo a área mais conservada, e forma um corredor por meio de mata de galeria até a Área Proteção Ambiental do Parque Estadual do Lajeado. Já a UC Machado, sua integridade ambiental é perturbada pela expansão urbana.

No que tange ao hábito alimentar, *Noctilio albiventris* é constituída principalmente insetos capturados durante o voo, como também de insetos aquáticos presentes nas superfícies da água de rios ou lagos (Nogueira; Pol 1998; Aguirre et al., 2003; Reis et al., 2007; Reis et al., 2013) e eventualmente pequenos peixes. Ambos, *Nyctinomops laticaudatus* e *Noctilio albiventris* são comuns em ambientes urbanos (Lima 2008). A espécie *Pteronotus parnellii*, também insetívora, apresenta sua dieta constituída principalmente de insetos representantes das ordens coleóptera e lepidóptera, e forrageia em áreas de vegetação espessa e sub-bosques (Chaves et al., 2012; Teixeira 2016).

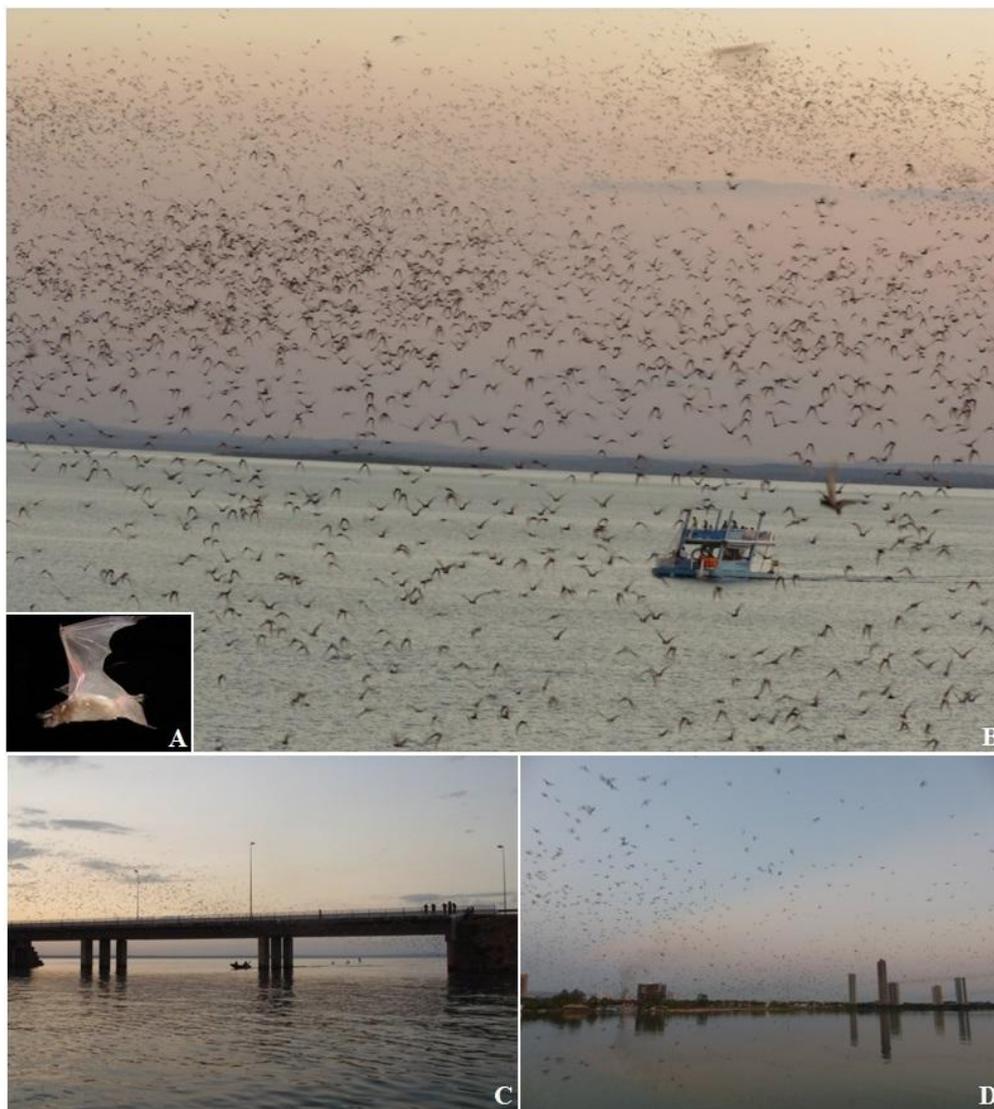


Figura 1. Registro de morcegos (*Nyctinomops laticaudatus*) no município de Palmas, TO. A: Detalhe de um indivíduo da espécie e B: Representantes da colônia em voo para forrageio; C: Ponte Fernando Henrique Cardoso que abriga a colônia de morcegos e D: Os pontos escuros no céu são morcegos e no fundo da imagem a cidade de Palmas.

Teste de micronúcleo (MN)

Após as capturas dos morcegos, foi realizada a raspagem da mucosa bucal para obter as células com auxílio de palinete de hastes flexíveis com pontas com algodão. Estes foram levemente friccionados contra a região da mucosa jugal direita e esquerda, assoalho e gengivas, de acordo com Thomas et al. (2009b) e Shaik et al. (2010). As células foram transferidas para uma lâmina de vidro limpa (duas lâminas por indivíduo) contendo previamente uma gota de solução fisiológica (NaCl a 0,9%), de acordo com

Shaik et al. (2010). Em seguida, os animais foram mensurados e foi feita a soltura dos espécimes no mesmo local de coleta. As lâminas foram fixadas em solução de metanol (Álcool Metílico P. A.) por cerca de 20 minutos e secas no ambiente. As lâminas foram coradas com solução Giemsa (5%) por 20 minutos e enxaguadas com água destilada (Grisolia et al., 2005).

Foi realizada análise de 500 células por animal, visto que em testes realizados anteriormente não foi possível uma amostragem padrão de 1000 células por indivíduo como é comum ser avaliado em mucosa bucal humana, bem como nos estudos com roedores realizados por Cavusoglu et al. (2009a,b). No entanto, avaliação de 500 células foi relatado pelos seguintes autores: Holland et al. (2008); Naderi et al. (2012); Jindal et al. (2013). Portanto, a quantidade de células analisadas neste estudo não inviabiliza os resultados, uma vez que também como proposto por Carrard et al. (2007) a frequência de MNs pode ser avaliada efetuando-se a contagem de MN/pelo total de células contabilizadas. Neste sentido a contagem e fotodocumentação das células (500 por indivíduo) foi executada por meio de visualização em microscópio óptico (Modelo Lab 1001 TB) com câmera digital acoplada (3.0Mp) em aumento de 100x.

Foram considerados micronúcleos (MNs): *i*) estruturas semelhantes ao núcleo principal, tendo entre 1/3 e 1/16 de tamanho deste; *ii*) ausência de conexão com o núcleo principal; *iii*) mesma textura e intensidade de coloração; *iv*) forma arredondada ou ovalada. Essas diretrizes de identificação estão de acordo com Carrard et al. (2007), Thomas et al. (2009a) e Bolognesi et al. (2013). Além das células micronucleadas, também foram avaliadas outras anormalidades nucleares (ANs) presentes em células da mucosa bucal, como: broto nucleares (botões nucleares), células binucleadas, picnóticas, com cromatina condensada, cariorréxis e cariólise (Carrard et al., 2007; Thomas et al., 2009; Bolognesi et al., 2013).

Análise de dados

O dano genotóxico foi analisado para dois diferentes ambientes amostrados. Foram considerados os morcegos da PFHC versus o conjunto de morcegos dos fragmentos florestais (Machado e Brejo Comprido). A análise estatística das células com MN e outras alterações nucleares, ocorreu de acordo com o proposto por Carrard et al. (2007), para insetívoros da colônia do abrigo na Ponte e os coletados em fragmentos florestais.

A título complementar, a massa corporal dos morcegos em ambos os locais foi correlacionada com a frequência de micronúcleo utilizando o coeficiente de Correlação de Spearman. Os testes estatísticos foram realizados em um nível significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Micronúcleo e anormalidades nucleares

Diferentes tipos de células esfoliadas, tais como célula com micronúcleo, botões nucleares, binucleada, picnótica, com cromatina condensada, cariorréxis e cariólise foram encontradas em mucosa bucal de morcegos (Figura 2).

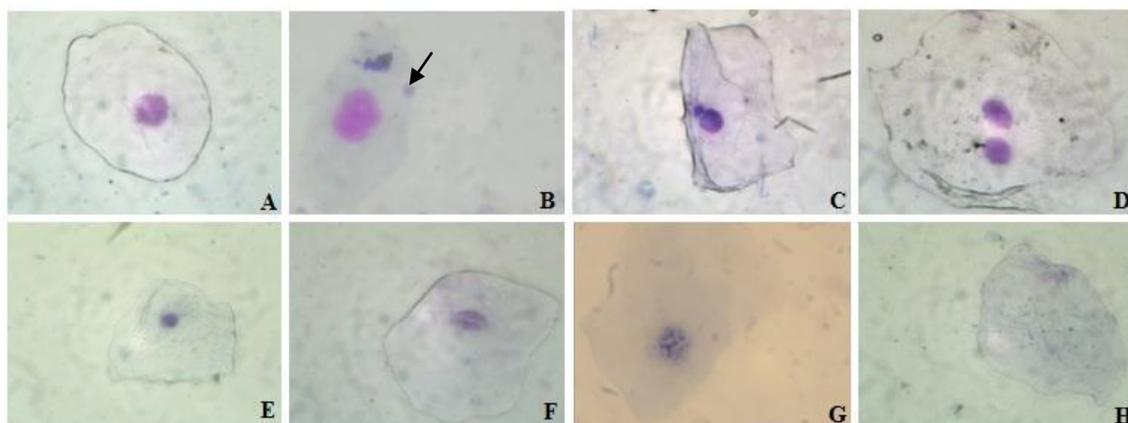


Figura 2. Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, coradas com Giemsa e ampliadas 1000x. (A) Célula típica, (B) célula com micronúcleo; (C) botão nuclear; (D) célula binucleada; (E) célula picnótica; (F) célula com cromatina condensada; (G) célula cariorréxis; (H) cariólise.

Os morcegos *N. laticaudatus* da PFHC apresentaram uma frequência maior de células micronucleadas ($1,30 \pm 1,47$, $t = 3,013$; $P < 0,01$, Figura 3), sendo esse valor três vezes maior em relação aos insetívoros dos fragmentos florestais ($0,29 \pm 0,56$). Além dos MNs, houve também maior frequência de ANs como células com picnose ($9,63 \pm 10,15$, $t = 2,561$; $P < 0,05$) e com cromatina condensada ($4,40 \pm 4,62$, $t = 3,920$; $P < 0,0001$) para os morcegos da PFHC. Outras anormalidades nucleares como células

binucleadas, cariólise, cariorréxis e botões nucleares também foram observadas (Tabela 1), porém não houve diferença significativa entre as populações amostradas.

Não houve correlação entre o peso corporal e a frequência de micronúcleo em ambas as áreas estudadas (UCs $r = 0,18$, $P > 0,05$ e colônia da PFHC $r = -0,03$, $P > 0,05$).

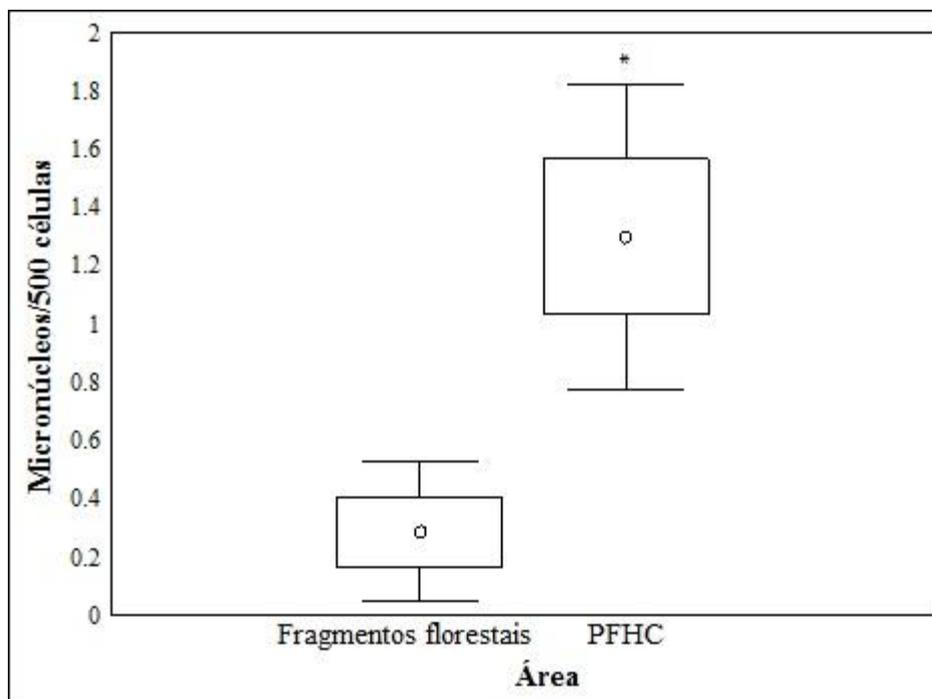


Figura 3. Frequência de micronúcleo entre morcegos insetívoros dos fragmentos florestais e da colônia da Ponte Fernando Henrique Cardoso (PFHC). A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. O asterisco mostra diferenças significativas entre os grupos (* $P < 0,01$; Teste t de Student).

Tabela 1. Médias±desvio-padrão das alterações nucleares observadas em células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos.

MN e outras alterações nucleares	Fragmento (n21)	Colônia Ponte (n30)
	Média±DP	Média ±DP
Micronúcleo	0,29±0,56	1,30±1,47**
Binucleada	0,86±1,15	1,43±1,81
Picnose	3,81±2,68	9,63±10,15*
Cariólise	6,81±11,11	4,60±6,80
Cariorréxis	0,67±1,62	0,10±0,31

Botões nucleares	0,62±1,02	0,90±1,56
Cromatina condensada	0,38±0,92	4,40±4,62 ^{***}

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, indica o nível de significância entre as anormalidades nucleares (Teste t de Student).

DISCUSSÃO

Micronúcleo e anormalidades nucleares

Ao longo dos últimos 47 anos, vários estudos em todo o mundo avaliaram riscos de exposição de morcegos a contaminantes ambientais, em que pesticidas e metais pesados são os mais investigados (Bayat et al., 2014; Zukal et al., 2015). O teste de micronúcleo já foi documentado em morcegos para a detecção de dano ao DNA, no entanto utilizando linfócitos e reticulócitos periféricos de animais oriundos de ambiente com radiação ionizante (Meehan et al., 2004). Até a presente data, não há estudos com o biomarcador em células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos. Nosso estudo, portanto, faz uma avaliação do uso do referido teste entre morcegos insetívoros de ambiente florestal em relação a animais de abrigo artificial para verificar o dano genotóxico.

A principal vantagem do ensaio de micronúcleo em células esfoliadas é a facilidade de pontuação e a precisão obtida com a análise de um número maior de células (Tolbert et al., 1991; Martins et al., 2009). É minimamente invasivo comparado aos estudos com amostras de sangue para teste de linfócitos ou biópsia de tecidos, pode ser executado rapidamente, é relativamente barato, e tem sido considerado indicador de contaminação química em organismos (Thomas et al., 2009a; Dey et al., 2012; Torres-Bugarín et al., 2014). Essas vantagens também foram verificadas nesse trabalho, e, portanto, a presença da MN pode ser usada como biomarcador de danos em morcegos.

Os resultados evidenciam ainda que além dos MNs, outras anormalidades nucleares foram observadas e devem ser consideradas no momento da avaliação e interpretação do ensaio como também apresentado por Thomas et al. (2009a), Bolognesi et al. (2013), Gómez-Meda et al. (2017). As células com botões nucleares contêm corpos nucleares conectados ao núcleo principal por uma ponte nucleoplasmática larga ou fina (Carrard et al., 2007; Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013). Células

binucleadas possuem dois núcleos, normalmente com mesma textura e tamanho (Bolognesi et al., 2013). O significado dessas células ainda é desconhecido, mas pode ser indicativo de falha na citocinese após a última divisão nuclear (Thomas et al., 2009a).

As células picnóticas têm um pequeno núcleo encolhido, com diâmetro nuclear geralmente um a dois terços de um núcleo em células normais (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013). Sua frequência normalmente é correlacionada com cromatina condensada e cariorréxi (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013). Células de cromatina condensada são caracterizadas por um núcleo com um padrão estriado por causa das áreas paralelas de cromatina condensada que são intensamente manchadas (Bolognesi et al., 2013) e estão associadas ao processo de apoptose. Quanto à cariorréxis, sua principal característica são os fragmentos do núcleo (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013). É uma das etapas da morte celular, seja por apoptose ou necrose (Carrard et al., 2007).

Cariólises são células nos quais o núcleo está totalmente empobrecido de DNA e aparente como uma imagem “fantasma” que não tem nenhuma mancha de coloração (Majno; Joris 1995; Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013). Neste estágio observa-se a desintegração completa do núcleo e ocorre nos estágios posteriores de necrose e apoptose (Majno; Joris 1995; Bolognesi et al., 2013). A presença de MN e brotos nucleares está relacionada ao efeito genotóxico (Gómez-Meda et al., 2017) ou seja a instabilidade cromossômica ou dano no DNA. No entanto, a presença de células binucleadas está relacionada aos danos no fuso mitótico, e leva ao efeito aneugênico (Gómez-Meda et al., 2017) e as outras observações aqui apresentadas (picnose, cariólise, cariorréxi e cromatina condensada) podem estar associadas à morte celular como também relatado por Bolognesi et al. (2013) e Castañeda et al. (2016).

Dano genotóxico em morcegos

Uma frequência significativa de MNs e de outras ANs (células picnóticas e células com cromatina condensada) foi observada em *N. laticaudatus* da colônia PFHC, quando comparada as espécies dos fragmentos florestais. Essa mesma observação já foi revelada em estudos com humanos sobre exposição de pesticidas e metais pesados (Benedetti et al., 2013; Silverio et al., 2017; Gómez-Meda et al., 2017). De acordo com

Gómez-Meda et al. (2017) essas ANs estão associadas a danos citotóxicos. Uma das possíveis explicações para o aumento de MN e ANs nesse estudo pode ser a exposição dessa espécie aos recursos alimentares encontradas na cidade ou nas propriedades agrícolas de seu entorno, as quais estão em um raio de 15 a 20 km do abrigo da colônia.

Morcegos da família Molossidae são mamíferos de rápido voo que possuem capacidade de dispersão potencialmente alta (Speer et al., 2017), em que algumas espécies podem voar mais de 50km em única noite enquanto forrageiam (Best; Geluso, 2003). Os morcegos insetívoros são expostos à contaminação direta de níveis tróficos mais baixo como resultado de sua alta taxa de consumo metabólico e alimentar (Sánchez-Chardi; Nadal 2007). Estudos mostram que os insetos podem bioacumular inseticidas ou metais e passar para a próxima cadeia trófica (Hickey et al., 2001; Stansley et al., 2001; Naidoo et al., 2013; Hernout et al., 2016). Assim, as principais vias de exposição dos morcegos ocorrem através da ingestão de alimentos e águas contaminadas, seguidas por exposição cutânea e por inalação (Clark; Shore, 2001; Allinson et al., 2006; Lilley et al., 2012; Hernout et al., 2016).

Os morcegos são particularmente sensíveis às cargas de pesticidas (Thies et al., 1996; Stechert et al., 2014), uma vez que prestam serviços substanciais aos ecossistemas como predadores de insetos (Hickey et al., 2001; Stechert et al., 2014). Neste contexto, o teste de MN está amplamente voltado para análises humanas (Benvindo-Souza et al., 2017). Assim, em mucosa humana, tem se mostrado sensível para biomonitoramento de risco genético (Ramírez; Cuenca 2001; Bolognesi et al., 2002; Bolognesi et al., 2010; Montaña-Soto et al., 2014; Bernardi et al., 2015; Silverio et al., 2017). Em outras ocasiões do uso do teste de MN diante a exposição de pesticidas em anuros, demonstrou frequência significativa de células micronucleadas bem como de outras anormalidades eritrocitárias nucleares (Candiotti et al., 2010; Pérez-Iglesias et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2015) mostrando, portanto a sensibilidade do ensaio para a detecção desse estressor para alterações citogenéticas.

Naidoo et al. (2013) ao avaliar morcegos insetívoros que forrageiam em áreas de tratamento de águas residuais, constatou que estes animais podem, ao longo do tempo, apresentar sérios riscos decorrentes da dieta de insetos (Diptera) nesse ambiente. A espécie *Neoromicia nana* (família Vespertilionidae) apresentou altas concentrações de metais essenciais (Cobre, Zinco e Ferro) em todas as amostras de tecidos (rins, fígado e músculos) além de metais tóxicos, como Cádmio, Cromo e Níquel (Naidoo et al., 2013).

Metais pesados, incluindo o Cádmio e Urânio foram relacionados à presença MN em mucosa bucal de roedores (Cavusoglu et al., 2009a,b), no entanto, há ainda uma lacuna de conhecimento para essa avaliação em células esfoliadas de mucosa animal (Benvindo-Souza et al., 2017), devido aos poucos relatórios realizados.

Estudos realizados no Brasil que avaliaram mutagênese em células sanguíneas de *N. laticaudatus* por meio do Ensaio Cometa demonstraram valores significativamente altos de dano no DNA em indivíduos coletados em área de mineração de carvão no Sul do Brasil, decorrente da ação deletéria de metais pesados (Zocche 2008). Por vez, ainda são poucas as evidências científicas para a descrição de contaminantes em morcegos isetívoros no País. No cerrado brasileiro, amostras da espécie frugívora *Artibeus planirostris* também avaliadas pela mesma técnica, o dano ao DNA foi atribuído ao ambiente urbano, e parece estar associado ao efeito de borda, além de outros fatores estressores típicos desse ambiente; e que, em ambiente rural, os valores mais elevados de dano ao DNA podem estar relacionados aos pesticidas utilizados nas atividades agrícolas (Assunção 2016).

No caso de *N. laticaudatus*, outra hipótese levantada para explicar a alta frequência de MN na PFHC é a localidade do abrigo, pois os morcegos estão suscetíveis à exposição de partículas de petróleo provenientes da combustão dos automóveis nesse local. Desta forma, não se rejeita o fato de que partículas de petróleo possam somar a outros xenobióticos estressores e poder induzir a formação de MN e outras anormalidades nucleares em morcegos, como observado nesse estudo.

Relatórios anteriores com teste de MN em células esfoliadas de mucosa bucal humana têm demonstrado uma tendência positiva em alterações citogenéticas oriundas da inalação e aspiração da fração volátil de petróleo (Martins et al., 2009; Rosa et al., 2013). O biomonitoramento genético, tem registrado frequência positiva para dano no DNA bem como para poluentes atmosféricos (Rainho et al., 2016) e resíduos de mineração (Espitia-Pérez et al., 2016), sendo esse primeiro agente químico disponível para ambientes urbanos, como na PFHC que abriga a colônia de *N. laticaudatus*.

Relata-se ainda que a frequência de micronúcleo nos morcegos da colônia foi associada às células entrando em morte celular, tais como, picnose e cromatina condensada. A baixa frequência de anormalidade nuclear observada para os insetívoros nas UCs pode ser decorrente da qualidade de oferta alimentar disponível na área

amostrada. Mesmo que os locais estejam circundados por matriz urbana, porém parece haver menos exposição a poluentes comparados aos morcegos da PFHC.

O estudo com *Noctilio leporinus* (espécie pertencente ao mesmo gênero de *Noctilio albiventris*, aqui investigado), que se alimenta de peixes e insetos aquáticos, encontrou níveis significativos de acúmulo de metais pesados (Manganês, Ferro, Zinco, Cobre e Chumbo) no fígado de animais coletados em ambientes relativamente não perturbados e pouco poluídos (Méndez; Alvarez-Castañeda 2000). Assim, para os insetívoros dos fragmentos investidos, considera-se a necessidade de novos trabalhos, e, sobretudo com amostras maiores para aplicação desse biomarcador. Tal fato pode ser útil como indicador de contaminação por metais pesados (Méndez; Alvarez-Castañeda, 2000) em ecossistemas aquáticos.

Finalmente, mesmo com a constatação da presença de alterações nucleares ainda são necessários novos estudos com o teste de MN em morcegos para reforçar sua eficiência para a fauna selvagem. No obstante, o emprego da técnica de MN para verificação de dano ao DNA pode ser aplicado e as células da mucosa bucal utilizada como biomarcadores morfológicos de danos genotóxicos, foi possível detectar alterações nucleares. Diante dessas implicações, a avaliação à exposição direta na cadeia alimentar pode ser realizada por meio do guano (Clark et al., 1982) e prever se a dieta está comprometida com agentes químicos e se estes têm relação com a frequência de MNs.

CONCLUSÃO

Morcegos insetívoros são importantes agentes de controladores de pragas urbanas e agrícolas e considerados bons indicadores de qualidade ambiental. A partir desse estudo foi provado que o teste de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal é um biomarcador sensível para detecção de dano celular e de outras anormalidades nucleares em quirópteros. Os morcegos *N. laticaudatus* estão em risco de desenvolver danos de efeitos subletais, que podem comprometer a estrutura populacional desses animais. É de extrema importância novos monitoramentos no intuito de detectar os agentes xenobióticos responsáveis pela frequência de MN.

Amostras de guano são consideradas uma alternativa para determinar a possível existência de elementos químicos e correlacionar com os dados observados na presente

pesquisa. Por ser uma colônia com milhares de indivíduos, há uma lacuna de conhecimento quanto aos seus serviços ecossistêmicos na região e status de conservação. Nessa perspectiva, monitoramento toxicológico para formular indicadores da saúde dos morcegos e do ambiente, são algumas alternativas iniciais e urgentes para entendimento e proteção desses morcegos no Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, L.F., A. Herrel, R. Van Damme, E. Matthysen. 2003. The implications of food hardness for diet in bats. *Functional Ecology*, 17: 201-212.

Allinson, G., Mispagel, C., Kajiwara, N., Anan, Y., Hashimoto, J. Laurenson, L., Allinson, M., Tanabe, S. 2006. Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. *Chemosphere*, 64:1464-1471.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012a. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology*, 72:299-304.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012b. Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica*, 14:225-232.

Angelieri, F., Franchi, L., Cevidanés, L.H.S., Scanavini, M.A., Mcnamara-Jr, J.A., 2014. Long-term treatment effects of the FR-2 appliance: a prospective evaluation 7 years post-treatment. *European Journal of Orthodontics*, 36:192-199.

Assunção, D. Avaliação do dano genético em células sanguíneas de quirópteros de áreas urbanas e não urbanas. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) apresentada a Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Avila-Flores, R, Flores-Martínez J.J, Ortega J. 2002. *Nyctinomops laticaudatus*. Mammalian Species, 697:1-6.

Bayat, S., Geiser, F., Kristiansen, P., Wilson, S.C., 2014. Organic contaminants in bats: trends and new issues. Environment International, 63:40-52.

Benedetti, D., Nunes E., Sarmiento M., Portoa C., Santos, C.E.L., Dias J.F., Silva, J., 2013. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. Mutation Research, 752:28–33.

Bernardi, N.B.S., Gentile, N.B.S., Mañas, F.M.D., Méndez, Á.M.D., Gorla, N.M.D., Aiassa, D.M.D., 2015. Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Córdoba. Arch Argent Pediatr, 113:126-132.

Belien, J.A.M., Copper, M.P., Braakuis, B.J.M., Snow, G. B., Baak, J.P.A., 1995. Standardization of counting micronuclei - definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. Carcinogenesis, 16:2395-2400.

Benvindo-Souza, M., Assis, R.A., Oliveira, E.A.S., Borges, R. E., Santos, L. R. S., 2017. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. Environmental Science and Pollution Research, 24:27724-27730.

Best, T.L., & Geluso, K.N., 2003. Summer foraging range of Mexican freetailed bats (*Tadarida brasiliensis mexicana*) from Carlsbad Cavern, New Mexico. The Southwestern Naturalist, 48, 590-596.

Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A.; Thomas, P., Fenech, M., 2013. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 753:100-113.

Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R., 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, Oxford, 26:19-26.

Bolognesi, C., Perrone, E., Landini, E., 2002. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis*, 7:391-397.

Candiotti, J.V., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, R.L., 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere*, 78:249-255.

Castañeda-Yslas, I.J., Arellano-García, M.E., Garcia-Zarate, M.A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M.G. and Torres-Bugarín, O., 2016. Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, ID 7934257 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7934257>

Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalcxin, E., 2009a. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Journal of Medicinal Food*, 12:1286-1292.

Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalcxin, E., 2009b. Antioxidant potential of *Ginkgo biloba* leaf extract against uranium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Fresenius Environmental Bulletin* 18:1551-1558.

Chaves, P.M.R., Franco, P.A.D., Pereira, V.C.R., 2012. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em gruta de formação calcária localizada na Fazenda Cantinho, Município de Formosa – Goiás (GO). *Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade*, 1:1.

Clark, D. R. J. 2001. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40:537-43.

Clark, D.R., Shore, R.F., 2001. Chiroptera. In: Shore RF, Rattner BA (eds) *Ecotoxicology of wild mammals*. Wiley, London, 159–214.

Clark, D.R., Jr., Laval, R.K., Tuttle, M.D. 1982. Estimating pesticide burdens of bats from guano analyses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 214-220.

Carrard, V.C.; Costa, C.H., Ferreira, L.A.; Lauxen, I.S., Rados, P.V., 2007. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal, *Rev Fac Odontol Porto Alegre, Porto Alegre*, 18:77-81.

Dey, P., Samanta, S., Susheilia, S., 2012. Micronucleus assay in buccal smears of breast carcinoma patients. *Diagnostic Cytopathology*, 40:664-666.

Espitia-Perez, L., Sousa, M.Q., Salcedo-Arteaga, S., Leon-Mejia, G., Hoyou-Giraldo, L.S., Brango, H., Kvitko, K., Silva, J., Henrique, J. A. P., 2016. Polymorphisms in metabolism and repair genes affects DNA damage caused by open-cast coal mining exposure. *Mutation Research*, 808:38-51.

Fabian, M.E., Gregorin, R., 2007. Família Molossidae. In: Reis, N. R.; Perachi, A. L., Pedro, W.A., Lima, I.P. (Eds). *Morcegos do Brasil*. Londrina: Nélio, R. dos Reis, 2007, 149-165.

Gomez-Meda, B.C., Zuniga-Gonzalez, G.M., Sanchez-Orozco, L.V., Zamora-Perez, A.L., Rojas-Ramirez, J.P., Rocha-Munoz, A.D., Sobrevilla-Navarro, A.A., Arellano-Avelar, M.A., Guerrero-de Leon, A.A., Armendariz-Borunda, J.S., 2017. Buccal micronucleus cytome assay of populations under chronic heavy metal and other metal exposure along the Santiago River, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189:522.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.D.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and Molecular Biology*, 28:334-338.

Hernout, B.V.; Arnold, K.E., Mcclean, C.J., Walls, M., Baxter, M., Boxall, A. B. 2016. A national level assessment of metal contamination in bats. *Environmental Pollution*, 214:847-858.

Hickey, M. B.C., Fenton, M.B., MacDonald, K.C., Soulliere, C. 2001. Trace elements in the fur of bats (Chiroptera: vespertilionidae) from Ontario and Quebec, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66:699-706.

Hsiao, C.J., Lin, C.L., Lin, T.Y.; Wang, S.E., Wu, C.H. 2016. Imidacloprid toxicity impairs spatial memory of echolocation bats through neural apoptosis in hippocampal CA1 and medial entorhinal cortex areas. *Neuroreport*, 27:462-8.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring. DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutation Research*, 659:93-108

Jones, G., Jacobs, D.S., Kunz, T.H., Willig, M.R., Racey, P.A. 2009. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators *Endanger. Species Res.*, 8: 93-115.

Jindal, S., Chauhan, I., Grewal, H.K., 2013. Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organiser regions and micronuclei. *Journal of Cytology*, 30:174-178

Korsakov, A.V., Yablokov, A.V., Troshin, V.P. and Mikhalev, V.P. 2015. The Buccal Epithelium as Environmental Indicator. *Biology Bulletin*, 42:273-277.

Lima, R.C., Ferraz, P., Chaiben, C.L., Fernandes, A., Gregio, A.M.T., Machado, M.A. N., Azevedo-Alanis, L.R., Lima, A.A.S., 2016. Genotoxic and Cytotoxic Potential of Smoke Crack Cocaine on the Epithelium of the Human Oral Mucosa. *Journal of Dentistry Indonesia*, 23:33-39.

Lima, I.P., 2008. Espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. p. 71-85, In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L; Santos, G.A.S.D. (Org.). Ecologia de Morcegos. Londrina: Technical Books Editora.

Little, M.A., Derefinko, K.J., Bursac, Z., Ebbert, J.O., Colvin, L., Talcott G.W., Hryshko-Mullen AS, Richey, P.A., Klesges, R.C., 2015 Prevalence and correlates of tobacco and nicotine containing product use in a sample of United States Air Force trainees. *Nicotine & Tobacco Research*, 18:416-23

Losano, N.F. 2015. Efeitos da exposição ao inseticida deltametrina em morcegos frugívoros. Viçosa, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, 42p.

Majer, B. J., Laky, B., Snasmuller, S., Kaissie, F., 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, 489:147-172.

Martins, R.B., Gomes, G.A.S., Aguiar Jr, O., Ribeiro, D.A. 2009. Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: Comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environment International*, 35: 1062-1065.

Majno, G., Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 146:3-15.

Meehan, K.A., Truter, E.J., Slabbert, J.P., Parker, M.I. 2004. Evaluation of DNA damage in a population of bats (Chiroptera) residing in an abandoned monazite mine. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557:183-190.

Méndez, L.S., Alvarez-Castañeda, T., 2000. Comparative Analysis of Heavy Metals in Two Species of Ichthyophagous Bats *Myotis vivesi* and *Noctilio leporinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65:51-54.

Miranda, D.C., 2012. Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Viçosa, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, 61.

Montaño-Soto, T., Arellano-García, E., Ojinaga, L.C., Vonglascoe, C., Ruiz-Ruiz, B. 2014. Genotoxic Biomonitoring and exposure to pesticides in women laborers at maneadero valley in Baja California, Mexico. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3:89-96.

Naidoo, S., Vosloo, D., Schoeman M.C., 2013. Foraging at Wastewater Treatment Works Increases the Potential for Metal Accumulation in an Urban Adapter, the Banana Bat (*Neoromicia nana*). *African Zoology*, 48:39-55.

Naderi, N.J., Farhadi, S., Sarshar, S., 2012. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. 55:433-438.

Nogueira, M.R., and POL. A., 1998. Observações sobre os hábitos de *Rhynchonycteris naso* (Wied-Neuwied, 1820) e *Noctilio albiventris* Desmarest, 1818 (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira Biologia*, 58: 473-480.

Pacheco, S.M., Sodré, M., Gama, A.R., Bredt, A., Cavallini, E. M.; Sanches E.M., Marques, R.V., Guimarães, M.M, Bianconi, G. 2010. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de A o para a Conserva o no Brasil. *Chiroptera Neotropical* 16:629-647.

Palmas. Lei complementar n  155, de 28 de dezembro de 2007. Art. 29. Dispõe sobre a Política Urbana do Município de Palmas. Disponível em: <<http://legislativo.palmas.to.gov.br/media/leis/LEI%20COMPLEMENTAR%20N%C2%BA%20155%20de%2028-12-2007%2011-53-26.pdf>> Acesso em: 23 de Janeiro de 2018.

Pérez-Iglesias, J. M., Arcaute, C. R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S., Larramendy, M. L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation GlacoxanImida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104:120-126.

Pérez-Iglesias, J.M. Biomarcadores para avaliação dos efeitos da atrazina em girinos de *Rhinella schneideri* (Bufonidae) e *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae): utilização de parâmetros tradicionais e pigmentação visceral. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

Rainho, C.R., Correia, S.M., Aiub, C.A.F., Felzenszwald, L., 2016. Biomonitoring of tunnel workers exposed to heavy air pollution in Rio de Janeiro, Brazil. *AIR Quality Atmosphere and Health*, 9:881-886

Rosa, J.C.F., Fiegenbaum, M., Soledar, A.L., Claus, M.S., Nunes, A.D.D., Cardoso, V.V., 2013. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:5883-5890

Sarpal, R.S., Taneja, N., Shergill, N.K., Ravindra, S.V., 2016. Biomonitoring of Buccal Mucosa Cells in Chronic Smokers and Nonsmokers. *World Journal of Dentistry*, 7:189-194.

Sánchez-Chardi, A., Nadal, J., 2007 Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere*, 68:703-711

Silverio, A.C.P., Machado, S.C., Azevedo, L., Nogueira, D.A., Gracianod, M.M.D., Simoes, J.S., Viana, A.L.M., Martins, I., 2017. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 55:99-106.

Secord, A.L., Patnode, K.A., Carter, C., Gefell, J.G., Andrew, R.M., Sparks, D.W., 2015. Contaminants of Emerging Concern in Bats from the Northeastern United States. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69:411-421.

Speer, K.A., Petronio, B.J., Simmons, N.B., Richey, R., Magrini, K., Soto-Centeno, J.A., Reed, D.L., 2017. Population structure of a widespread bat (*Tadarida brasiliensis*) in an island system. *Ecology and Evolution*, 7:19.

Stansley, W.D., Roscoe, D.E., Hawthorne, E., Meyer, R., 2001. Food Chain Aspects of Chlordane Poisoning in Birds and Bats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40:285-29.

Stechert, C., Kolb, M., Djossa, B.A., Fahr, J., 2014. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21:8812-21.

Shepherd, G.L., Somers, C.M., 2012. Adapting the Buccal Micronucleus Cytome Assay for Use in Wild Birds: Age and Sex Affect Background Frequency in Pigeons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53:136-144.

Shaik, N.A., Shaik, J.P., Ali, A., Imran, A.; Rao, D.K., 2010. Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination. *Food and Chemical Toxicology*, 48:3432-3435.

Teixeira, P; G. 2016. O hábito alimentar dos morcegos (mammalia, chiroptera) e sua relação com a diversidade viral. Dissertação (Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas), Universidade de Brasília. Brasília: Distrito Federal.

Tolbert, P.E, Shy, C.M., Allen, J.W., 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff user. *American Journal of Epidemiology*, 13:840-850.

Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Nava, A., Flores-García, A. & Ramos-Ibarra M.L., 2014. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers*, 2014: ID 956835. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/956835>

Thies M.L., Thies, K., McBee K., 1996. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology*, 30:178-187.

Thomas, P., Wang, Y.J., Zhong J.H., Kosaraju, S.O., Callaghan, N.J., Zhou, X.F., Fenech, M., 2009. Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Mutation Research*, 661:25-34

Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4: 825.

Ramírez, V., Cuenca, P. 2001. Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Revista De Biología Tropical*, 49:1-8.

Rainho, C.R., Corrêa, S.M., Aiub, C.A.F., Felzenzwalb, I. 2016. Biomonitoring of tunnel workers exposed to heavy air pollution in Rio de Janeiro, Brazil. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 9:881-886.

Reis, N.R., Peracchi, A.L., Lima I.P., W.A. 2007. Pedro (ed.). *Morcegos do Brasil*. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 253.

Rosa, J.C.F, Fiegenbaum, M., Soledar, A.L., Claus, M.S., Souza Nunes, A.D., Cardoso, V.V., 2013. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms of the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:5883-5890

Valdespino, C., Sosa, V.J., 2017. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere*, 175:373-382.

Villa-R.B., 1960. *Tadarida yucatanica* in Tamaulipas. *Journal of Mammalogy* 41:314-319.

Vieira, L.F.P. 2012. Epidemiologia molecular do gene da glicoproteína entre isolados do vírus da raiva provenientes de morcegos e herbívoros domésticos do estado do Espírito Santo no período de 2006 a 2010. Tese (Doutorado – Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 110 f. il.; f. 67-80.

Zocche, J.J. 2008. Efeitos da mineração de carvão sobre os morcegos no sul de Santa Catarina: a presença de metais pesados e a ocorrência de danos celulares. Anais do IV Congresso Brasileiro de Mastozoologia, 18 a 22 de agosto de 2008, São Lourenço, MG.

Zocche, J.J., Leffa, D.D., Damiani, A.P., Carvalho, F., Mendonca, R.A., Dos Santos, C.E.I., Bouffleur, L.A., Dias, J.F., Andrade, V.M., 2010. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin. *Brazilian Environmental Research*, 110:684-691.

Zukal, J., Pikulla, J., Bandouchova, H., 2015. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect. *Mammalian Biology*, 80:220-227.

CAPÍTULO II

GENOTOXICIDADE EM MORCEGOS DO CERRADO BRASILEIRO E OS REFLEXOS ENTRE GILDAS TRÓFICAS

GENOTOXICIDADE EM MORCEGOS DO CERRADO BRASILEIRO E OS REFLEXOS ENTRE GUILDAS TRÓFICAS

RESUMO

O teste de micronúcleo (MN) em células esfoliadas de mucosa bucal é um método minimamente invasivo para monitorar populações expostas a risco genotóxico. No presente estudo, esse biomarcador foi empregado entre guildas tróficas de morcegos no cerrado brasileiro em que foram constatadas as mesmas anormalidades nucleares detectadas em relatórios com mucosa de aves e humanos. Houve maior frequência de MN em guilda trófica de morcegos frugívoros de área agrícola e urbana, bem como insetívoros de abrigo em ambiente urbano. Além de MN, foram constatadas outras anormalidades nucleares (ANs) como, células binucleadas e cariólise em frugívoros de área agrícola. Binucleadas também foram expressivas em frugívoros e insetívoros de área urbana, além de cariólise para insetívoros. Morcegos nectarívoros não foram observados aumento significativo em MN e ANs nos ambientes estudados, e sem resposta para sua susceptibilidade genotóxica. Os resultados corroboram com a hipótese de que ambiente agrícola e urbano pode está associado ao aumento de xenobióticos e que potencializar a frequência de dano genotóxico em morcegos. Embora esse biomarcador tenha sido desenvolvido para humanos, demonstrou ser satisfatório para a quiropterofauna. Assim, recomenda-se sua utilização em avaliação de outras espécies silvestres.

Palavras-chave: Genotoxicidade, micronúcleo, células esfoliadas, guilda trófica, quiropterofauna.

GENOTOXICITY IN BATS OF THE BRAZILIAN CERRADO AND THE REFLECTIONS BETWEEN TROPICAL GUILDAS

ABSTRACT

The micronucleus (MN) test in exfoliated cells of the buccal mucosa is a minimally invasive method to monitor populations exposed to genotoxic risk. In the present study, this biomarker was used among trophic guilds of bats in the Brazilian cerrado where it was observed the same nuclear abnormalities detected in reports with mucosa of birds and humans. There was a higher frequency of MN in the trophic guild of frugivorous bats from agricultural and urban areas, as well as insectivores of shelter in urban environment. In addition to MN, other nuclear abnormalities (ANs) such as binucleate cells and karyolysis were observed in frugivores of agricultural area. Binucleates were also expressive in frugivores and insectivores of urban area, besides kariolysis for insectivores. Nectarivorous bats did not show significant increase in MN and ANs in the studied environments, and no response to their genotoxic susceptibility was observed. The results corroborate the hypothesis that the agricultural and urban environment may be associated to the increase of xenobiotics and to increase the frequency of genotoxic damage in bats. Although this biomarker was developed for humans, it has been shown to be satisfactory for chiropterofauna. Therefore, it is recommended to use them in evaluation of other wild species.

Key words: Genotoxicity, micronucleus, exfoliated cells, trophic guild, chiropterofauna.

INTRODUÇÃO

O teste de micronúcleo (MN) em células esfoliadas em mucosa bucal tem sido considerado uma abordagem pouco invasiva para mensurar o dano do DNA, proliferação celular, diferenciação e morte celular (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2015a,b). Por ser um ensaio desenvolvido para humanos (Stich et al., 1983a; Thomas et al., 2009a; Benvindo-Souza et al., 2017), diferentes aspectos são apontados para genotoxicidade, tais como: o estilo de vida, impactos sobre a nutrição e etiologias (Thomas et al., 2009a; Naderi et al., 2012; Klaric et al. 2013; Kalaev et al., 2014; Rocha et al., 2014; Gomes-Meda et al., 2016; Souza et al., 2016). Para Bolognesi et al. (2015b) cerca de 53% dos estudos de micronúcleo em humanos investigam relação com doenças bucais pré-malignas, e de câncer de boca, cabeça e pescoço, demonstrando a importância clínica para temas etiológicos e seus estressores potenciais. O ensaio foi utilizado com sucesso para variáveis como poluição atmosférica, partículas de poeira, metais pesados (Leon-Mejia et al., 2014; Espitia-Perez et al., 2016), pesticidas (Korsakov et al., 2015; Castaneda-Yslas et al., 2016) e partículas de petróleo (Rosa et al., 2013), e com isso esses xenobióticos podem ser compartilhados no ambiente para outros grupos de organismos (Benvindo-Souza et al., 2017).

Nesse contexto o teste de MN aplicado como biomarcador em células esfoliadas de mucosa bucal também mostrou satisfatório em organismos não humanos, entre os quais roedores (Cavusoglu et al., 2009a,b; Thomas et al., 2009b) e aves (Shepherd; Somers 2012) para detecção de anormalidade celular. No entanto, com base na escassez de estudo para a fauna selvagem e aliado a facilidade de pontuação desse biomarcador, surge a necessidade exploratória de estudos com outros mamíferos selvagens, como os morcegos, visto que estes organismos compreendem cerca de 20% dos mamíferos do mundo (Bayat et al, 2014). No Brasil, representam 25% da mastofauna com aproximadamente 179 espécies, distribuído em 68 gêneros e nove famílias (Nogueira et al., 2014) e para o Cerrado é estimado em torno de 118 espécies, ou mais de 40% da fauna de mamíferos do bioma (Aguiar et al., 2016). Em se tratado deste bioma é um dos 34 hotspots globais para a conservação da biodiversidade mundial (Myers et al. 2000; Nogueira et al., 2011), no entanto, vem sendo destruído. Klink; Machado (2005) alertaram que cerca 50% dos seus 2 milhões de km² estão sendo transformados em

terras agrícolas e pastagens plantadas em culturas comerciais nos últimos 35 anos, tornando preocupante a conservação de sua biodiversidade.

Morcegos apresentam uma dieta bastante diversificada e ampla ocupação em ambientes silvestres e antropizados, consumindo alimentares potencialmente expostos a contaminantes químicos (Hickey et al., 2001; Damiani, 2010; Zoche et al., 2010; Hernout et al., 2016) de origem urbana, mineral ou agrícola (Thies et al., 1996; Zoche et al., 2010; Assunção 2016; Hernout et al., 2016) que podem reduzir sua longevidade e impactar seus serviços ecossistêmicos. Somando-se a isso amostras de células esfoliadas podem ser obtidas na mucosa bucal, que está em constante contato com agentes ambientais durante a alimentação, tornando um sítio alvo importante para substâncias tóxicas ingeridas ou até mesmo inaladas (Bartolotta et al., 2011; Rosa et al., 2013; Bernardi et al., 2015; Rainho et al., 2016; Espitia-Perez et al., 2016).

Diante disso, as principais vias de exposição a substâncias genotóxicas pelos morcegos são através da ingestão de alimentos contaminados, água, inalação ou exposição cutânea (Clark; Shore 2001; Allinson et al., 2006; Little et al., 2015; Hernout et al., 2016). Os efeitos tóxicos no organismo têm diversas implicações para os danos, tanto em nível de DNA como de biacumulação em tecidos, com comprometimento de rins, fígado, estresse oxidativo, alterações fisiológicas e histopatológicas (Zoche et al., 2010; Pikula et al., 2010; Nam et al., 2012; Amaral et al., 2012a,b; Pilosof et al., 2014; Assunção 2016; Hernout et al., 2016).

Conhecer os efeitos de natureza toxicológica em morcegos é fundamental para detectar as possíveis alterações genotóxicas oriundas de agentes xenobióticos. Estes animais desempenham serviços ecossistêmicos como agentes polinizadores, dispersores de sementes, controladores de pragas (Kunz; Feton 2003) e até mesmo como biomonitores para determinar os níveis de poluição em um determinado ecossistema com importantes consequências econômicas e médico sanitárias (Hoenerhoff; Williams 2004; Walker et al., 2007; Williams et al., 2010; Brinati et al., 2016).

De acordo com essas questões, foi aplicado o teste de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos, com base em guildas tróficas (frugívoros, nectarívoros e insetívoros), e quantificado a frequência de micronúcleos. Basicamente buscou-se saber: (i) se morcegos frugívoros, nectarívoros e insetívoros diferem quanto a frequência de micronúcleos, e (ii) se animais capturados em área agrícola diferem quanto a genotoxicidade dos coletados em fragmentos urbanos. O presente estudo é o

primeiro a relatar dano genotóxico por meio do teste de micronúcleo entre guildas tróficas de morcegos.

MATÉRIAL E MÉTODOS

Desenho amostral

Para esse estudo, obteve-se amostras biológicas representadas por células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos coletados em duas cidades no Cerrado brasileiro. Palmas, capital do estado do Tocantins e Rio Verde, no estado de Goiás. No município de Rio Verde, os morcegos foram amostrados em fragmentos florestais com influencia de matriz agrícola (± 100 metros da área de plantio) (S17°46'55.81", W050°58'01.37"; S17°47'04.75", W050°57'58.87"; S17°48'12.82", W050°53'57.94"). Nos ambientes, foram capturados espécimes adultos de nectarívoros (*Glossophaga soricina*, n=45), frugívoros (*Artibeus lituratus*, n=82 e *Artibeus planirostris*, n=93) e *Molossus molossus* (n=30), cuja dieta é insetívora. As condições ambientais de Rio Verde constam de um histórico agrícola, no qual as principais culturas comerciais que circundam os fragmentos são soja e milho (Pignat et al., 2017), em sistema de rodízio em plantio anual.

O município de Palmas é considerado urbano e não agrícola, em remanescentes florestais de cerrado (mata de galeria, S10°12'27.07", W048°18'55.58"; S10°12'08.95", W048°19'54.09"; S10°18'50.15", W048°18'31.79") determinadas como Unidade de Conservação Municipal (Palmas 2007). Neste ambiente foram amostradas: *Glossophaga soricina* (n=32), nectarívora; *Artibeus lituratus* (n=47) e *Artibeus planirostris* (n=100), ambas frugívoras. As espécies frugívoras compartilham áreas de forrageio semelhantes e portanto, foram analisadas em conjunto para a avaliação da genotoxicidade. Nos fragmentos florestais, os animais (Figura 1) foram capturadas por meio de quatro a nove redes de neblina com malha 20 mm e extensão de 7x2,5 e 9x2,5 metros dispostas a partir do por do sol, sendo essas amostragens ocorridas entre julho de 2016 a junho de 2017.

Para os insetívoros, *Nyctinomops laticaudatus* (n=40), foram obtidos em abrigo na Ponte Fernando Henrique Cardoso – PFHC (S10 11'05.76", W48 22'02.23"). Esses morcegos formam uma colônia com milhares indivíduos, observado principalmente

entre julho a outubro, quando saem para forrageio entre 18h10min às 19h15min. Nesse sítios os animais foram coletados com auxílio de puçá.

Em ambos os pontos de amostragens, os animais capturados passaram por biometria a título de identificação em nível de espécies e coleta das células esfoliadas da mucosa bucal. Posteriormente às triagens, foi feito registro fotográfico dos animais coletados com auxílio da câmera fotográfica digital modelo Sony Cyber Shot 16mp (Figura 1) e, em seguida, os animais foram soltos no mesmo local de captura. Dois indivíduos de cada espécie foram coletados, mortos e depositados no laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano sob licença SISBIO (nº 54101-1) e CEUA/IF Goiano (nº 8436060516).

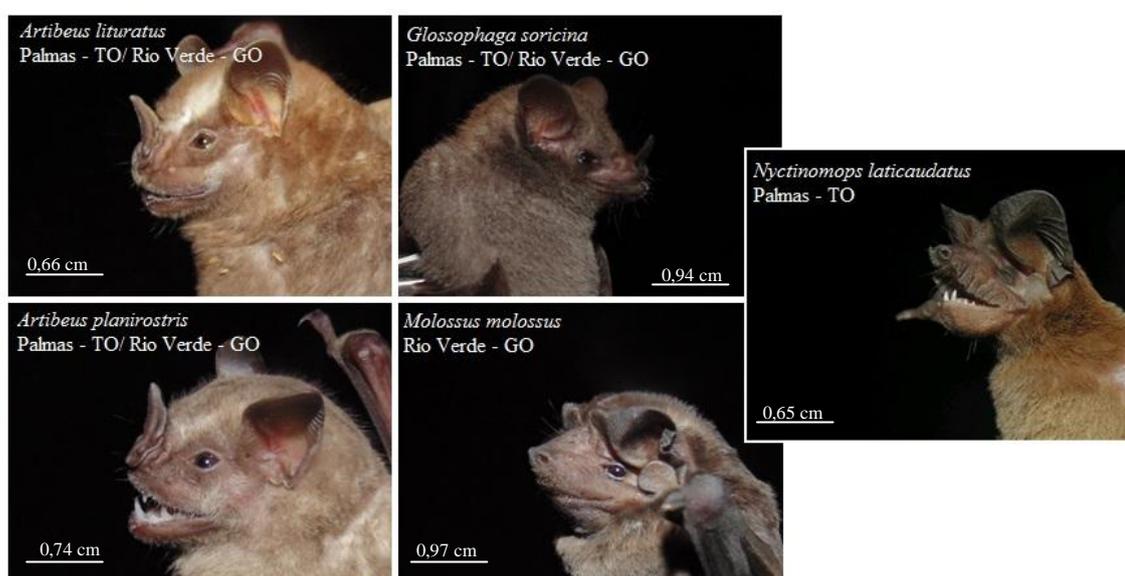


Figura 1. Espécies amostradas durante o estudo em suas respectivas áreas.

Teste de micronúcleo em morcego

Após a captura dos espécimes, as células bucais foram obtidas por raspagem com auxílio de palinete de hastes flexíveis com pontas de algodão, o qual foi levemente friccionado contra a região da mucosa jugal direita e esquerda, assoalho e gengivas, com base nas técnicas propostas por Thomas et al. (2009b) e Shaik et al. (2010). Células da mucosa oral foram transferidas para lâminas de vidro limpas (duas lâminas por indivíduo) contendo previamente uma gota de solução fisiológica (NaCl 0,9%), de acordo com Shaik et al. (2010). As lâminas foram fixadas em solução de metanol 100% (Álcool Metílico P. A.) por cerca de 20 minutos e secas as condições ambientais, e

foram posteriormente coradas com solução Giemsa (5%) por 20 minutos e enxaguadas com água destilada para retirar o excesso da solução corante (Grisolia et al., 2005).

A contagem e fotodocumentação das células (500 por indivíduo) foi executada com auxílio de microscópio óptico (Modelo Lab 1001 TB) com câmera digital acoplada (3.0Mp) em aumento de 100x. Foram considerados MNs as (i) estruturas semelhantes ao núcleo principal, tendo entre 1/3 e 1/16 de tamanho deste (ii) não conectadas ao núcleo principal e que (iii) apresentam a mesma textura e (iv) intensidade de coloração e (v) forma ovalada ou arredondada (Carrard et al., 2007, Thomas et al. 2009a; Bolognesi et al., 2013). Além das células micronucleadas, também foram avaliadas outras anormalidades nucleares (ANs) presentes em células da mucosa bucal (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de pontuação utilizados para identificar anomalias nucleares [Adaptado de Bolognesi et al.(2013)].

Célula com broto nuclear	O núcleo principal tem uma forte constrição formando um botão nuclear. Os brotos nucleares são anexados ao núcleo principal por uma estreita ou larga ponte nucleoplasmática. E apresentam similar intensidade de coloração.
Célula binucleada	As células binucleadas possuem dois núcleos com o mesmo tamanho, morfologia, textura e intensidade de coloração. Os núcleos podem estar separados ou se tocarem.
Célula com cromatina condensada	O núcleo apresenta padrão estriado e algumas porções do núcleo com coloração mais intensa.
Cariorréxi	O núcleo exibe uma fragmentação nuclear avançada (densamente salpicado).
Picnose	O núcleo é pequeno e encolhido com um diâmetro de 1/3 a 2/3 de uma célula típica normal.
Cariólise	Observa-se a desintegração completa do núcleo (imagem “fantasma” sem mancha de coloração).

Análise estatística

As contagens de MNs e das ANs são expressas como média±desvio padrão e relatadas pela frequência de ocorrência em 500 células. As análises estatísticas para MN e ANs entre as três guildas e os ambientes amostrados foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado na comparação da frequência de micronúcleo entre as guildas semelhantes em relação aos ambientes. Um valor de $p < 0,05$ foi utilizado para considerar significância estatística.

RESULTADOS

Genotoxicidade entre guildas tróficas de morcegos

A análise de micronúcleo entre as guildas tróficas de morcegos em cada área amostradas é apresentada na figura 2. Uma diferença foi encontrada para área agrícola (município de Rio Verde-GO, $H = 13,9316$, $P = 0,0009$), e animais frugívoros apresentaram maior frequência de MNs ($P = 0,002$) em relação aos organismos nectarívoros, porém estes frugívoros não diferiram ($P > 0,05$) dos insetívoros (Figura 2 A). Uma diferença também foi encontrada em Palmas ($H = 26,6889$, $P = 0,0001$), e frugívoros apresentou maior frequência de MNs ($P = 0,03$) em relação à nectarívoros. Além disso, uma taxa maior de MNs ($P < 0,01$) foi observada para insetívoros, quando comparado a frugívoros e nectarívoros (Figura 2 B).

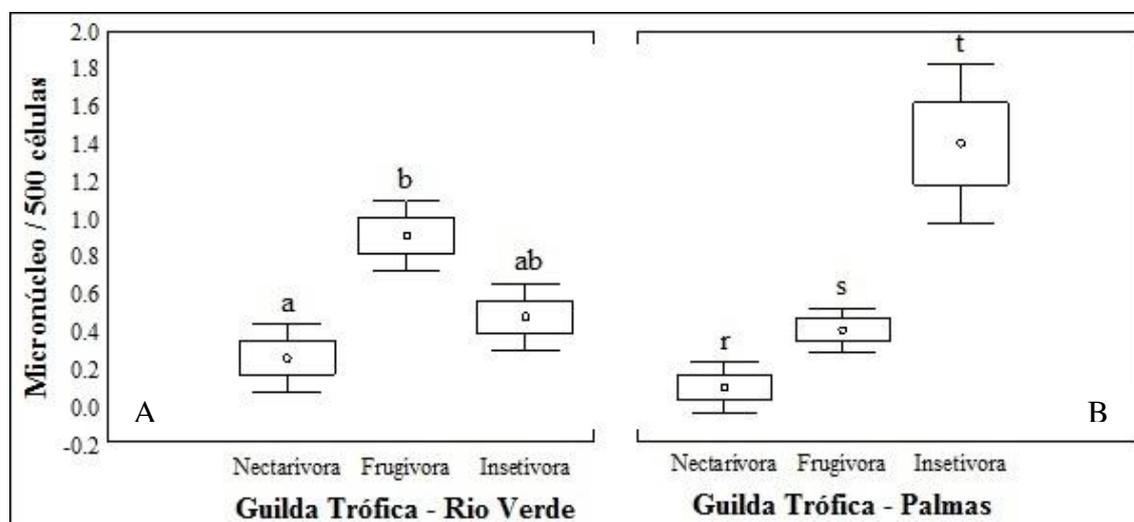


Figura 2. Frequência de micronúcleo em mucosa bucal de morcegos em (A) Rio Verde Goiás e (B) Palmas Tocantins. A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. Letras diferentes representam diferença estatística, mas valores acompanhados da mesma letra são semelhantes entre si.

Para a análise individual das anormalidades nucleares (ANs, Figura 3), entre as guildas tróficas, em área agrícola os valores mais altos encontrados e com significância estatística ($P < 0,05$) foram frugívoros, como células binucleadas e cariólise (Tabela 2). Em Palmas o hábito alimentar com maior taxa de ANs ($P < 0,05$), foram evidenciadas nos animais insetívoros (célula binucleada e cariólise), e frugívoros com células binucleadas.

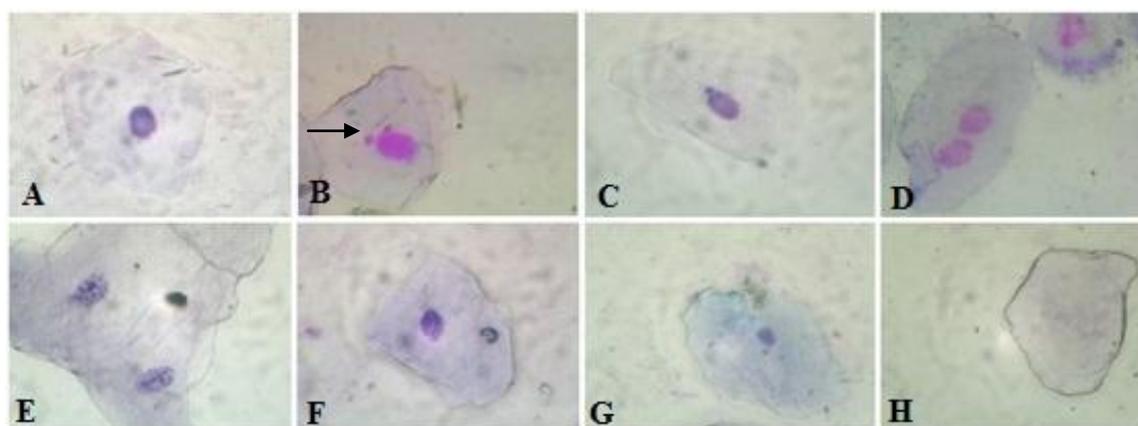


Figura 3. Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, coradas com Giemsa e ampliada 1000x. A: Célula típica, B: célula com micronúcleo; C: célula com broto nuclear; D: célula binucleada; E: célula cariorrêxis; F: célula com cromatina condensada; G: célula picnótica; H: célula cariólise. Seta: indicação do micronúcleo.

Tabela 2. Média±desvio padrão da frequência de cada ANs nas guildas tróficas de morcegos do Cerrado.

	Anormalidades nucleares em células esfoliadas de mucosa bucal					
	BE	BI	CR	CD	PI	CA
Rio Verde						
Nectarívora	0,53±0,87a	0,40±0,69a	0,13±0,40a	1,62±3,05a	5,82±7,26a	12,98±18,91ab
Frugívora	0,79±1,38a	1,58±1,81b	0,50±1,24a	2,13±4,32a	5,55±9,46a	15,62±22,90b

Insetívora 0,58±1.02a 0,94±1,25a 0,49±0,95a 1,84±2,62a 3,12±5,41a 7,49±13,66a

Palmas

Nectarívora 0,34±0,90a 0,34±0,79a 0,31±0,97a 0,75±1,46a 7,94±12,05a 9,47±13,54ab

Frugívora 0,48±1,11a 0,94±1,13b 0,42±0,94a 1,50±2,33a 3,85±6,17a 12,75±21,08a

Insetívora 0,63±1.17a 1.80±2.47bc 1.13±2.15a 1.23±1.75 4.35±6.93a 61.15±2.60b

Letras diferentes representam diferença estatística, mas valores acompanhados de uma mesma letra são semelhantes entre si. BI=binucleada, BE=broto nuclear, CR=cariorréxi, CD=cromatina condensada, PI=picnose e CA=cariólise.

Resultados da comparação par a par das guildas tróficas semelhantes de área agrícola em relação à urbana são evidenciadas na figura 4. Nectarívoros não apresentou diferença significativa ($P>0,05$), já frugívoros de área agrícola apresentou duas vezes mais micronúcleo do que frugívoros de área urbana ($P<0,001$). Diferença também foi observada entre insetívoros, com maior taxa de micronúcleo nos morcegos de área urbana ($P<0,01$) em relação à área agrícola.

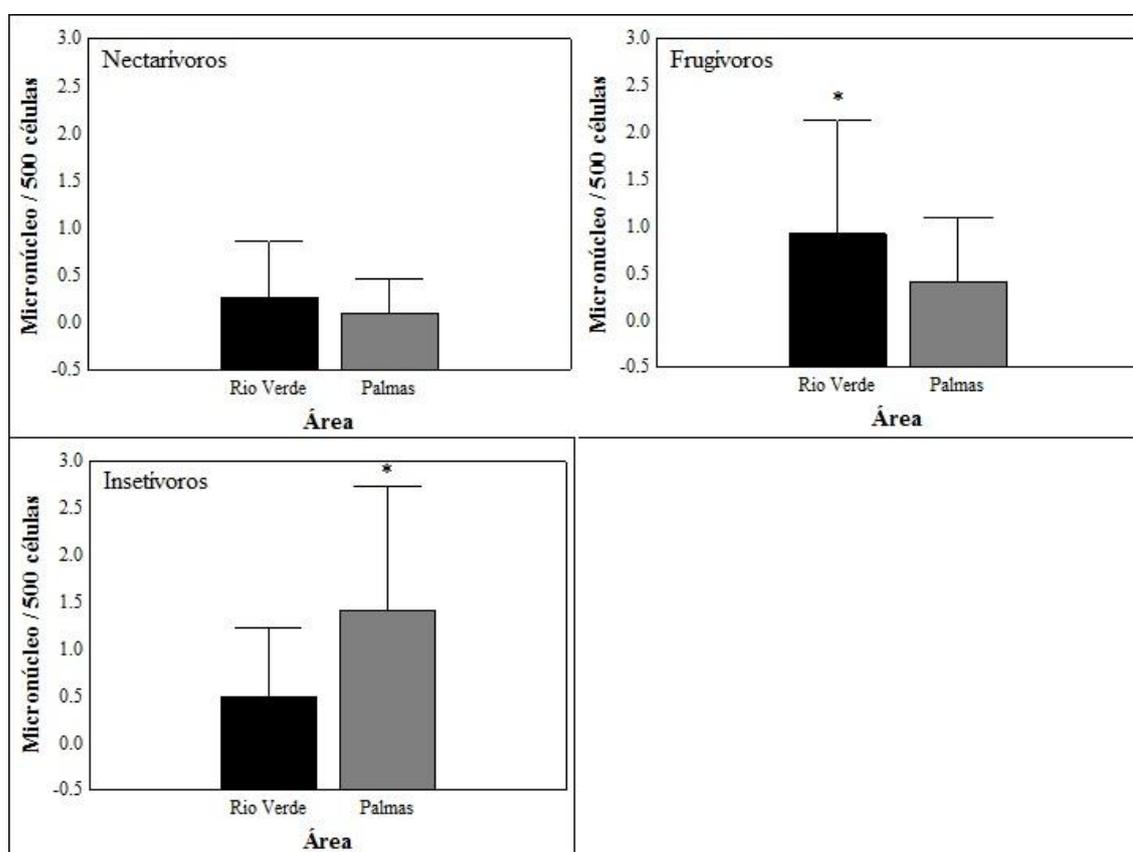


Figura 4. Comparação da frequência de micronúcleo entre área agrícola em relação área urbana para guildas de nectarívoro, frugívoro e insetívoro. * Representa diferença significativa entre ambientes.

O conjunto de anormalidades nucleares (ANs)

As anormalidades nucleares observadas neste estudo (BE, BI, CR, CD, PI e CA) foram somadas para a avaliação dos danos. Para área agrícola (Rio Verde) uma diferença significativa foi observada entre as guildas ($H = 17.0484$, $P = 0,01$), em que frugívoros diferiu de insetívoros ($P < 0,05$), porém manteve semelhança estatística com nectarívoros (Figura 5). Em área urbana (Palmas) foi detectado uma diferença entre as guildas tróficas ($H = 15.3234$, $P = 0,0005$), com maior taxa para insetívoros ($P < 0,05$).

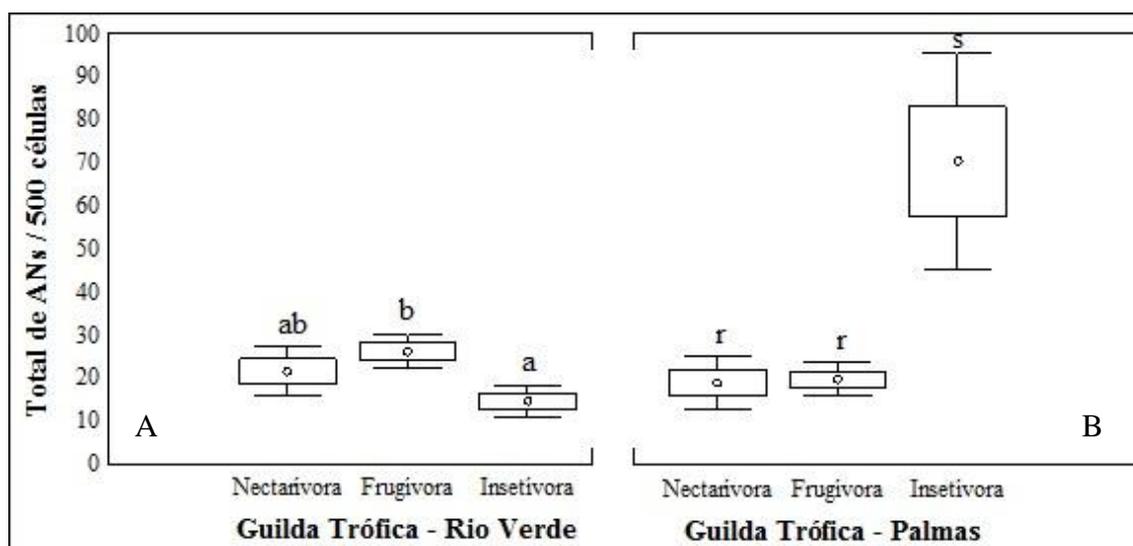


Figura 5. Soma das anormalidades nucleares (ANs) em mucosa bucal de morcegos em (A) Rio Verde-GO e (B) Palmas-TO. A média é indicada pelo círculo, desvio padrão pelas barras verticais e a caixa representada pelo primeiro e terceiro quartil. Letras diferentes representam diferença estatística, mas valores acompanhados de uma mesma letra são semelhantes entre si.

DISCUSSÃO

A aplicação do teste de micronúcleo requer um protocolo padronizado para coleta de células bucais (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2015b) com respectiva

preparação de lâminas, coloração e critérios de pontuação detalhados para identificar e quantificar os diferentes tipos de células e anomalias nucleares (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2015b). Embora seja um teste amplamente utilizado para humanos, verificou-se neste estudo que o ensaio de MN em células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos, pode ser aplicado como biomarcador valioso para análise genotóxica, uma vez que foi possível detectar danos. Esses danos, foram mais expressivos para guilda de frugívoros, cuja frequência de ocorrência foi especialmente alta em ambiente agrícola e urbano, além disso, insetívoros de área urbana também mostrou alta taxa de micronúcleo. De acordo com alguns autores, a presença de um número aumentado de células micronucleadas indica danos ao DNA, e normalmente está relacionado com a presença de agentes genotóxicos (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2013; Bolognesi et al., 2015b), sendo detectado a presença de MN muito antes do desenvolvimento de sintomas clínicos (Stich et al., 1984).

Os micronúcleos em células bucais esfoliadas refletem eventos que ocorreram na camada basal entre a primeira a terceira semanas antes da obtenção do esfregaço (Stich et al., 1983b; Stich et al., 1984; Thomas et al., 2009a). Estes, são formados por dano ao cromossomo (Gómez-Arroyo et al., 2000; Thomas et al., 2009a) quando essas células se dividem, e portanto fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não possuem conexão no aparelho do fuso, é excluído do núcleo principal nas células filhas e aparecem como corpos específicos denominados de micronúcleos (Gómez-Arroyo et al., 2000). O teste de MN além de ser aplicado para quantificação de células esfoliadas de mucosa bucal, também tem sido utilizado para avaliar a quebra cromossômica em células esfoliadas do esôfago, colo do útero, pulmão, cavidade nasal e bexiga urinária (Rosin 1992). Essas células amadurecem mais tarde e depois esfoliam (Rosin 1992) e são sempre substituídas por divisão celular nas células basais do tecido (Rosin 1992; Yadav; Jaggi 2015).

Além da maior frequência de células contendo MN, animais frugívoros de área agrícola detiveram maior taxa de células binucleadas e cariólise quando relacionado a animais nectarívoros ou insetívoros do mesmo ambiente. Uma frequência duas vezes mais de MN observada na comparação entre frugívoros de área agrícola e urbano reforça a hipótese de que a prática agrícola, geralmente acompanhada pelo uso excessivo de agrotóxicos, promovendo impactos em organismos não alvos (Minasi et al., 2011; Stechert et al., 2014; Bayat et al., 2014; Carbajal-Lopez et al., 2016), como já observado

dano genético em células esfoliadas de mucosa bucal humana (Guilherme et al., 2010; Minasi et al, 2011; Martinez-Valenzuela et al., 2017).

Apesar dos morcegos frugívoros estarem potencialmente expostos a pesticidas durante todo o período de vida, o impacto desta exposição ainda é pouco investigada (Oliveira et al., 2017). Diante desse contexto dados ecotoxicológicos são essenciais para a avaliação de riscos e a tomada de decisões na conservação de morcegos (Zukal et al., 2015). No presente estudo, foi observado aumento de danos ao DNA em ação à formação de MN, células binucleadas, e manifestações de efeitos citotóxicos nos processos de necrose ou morte celular (cariólise), no entanto, para a constatação da origem destes danos (clastogênica ou aneugênica) novas investigações deverão ser realizadas. Dados como estes também foram relatados em estudos em células esfoliadas de mucosa bucal humana (Gomez-Arroyo et al., 2000; Minasi et al, 2011; Castañeda-Yslas et al., 2016; Martinez-Valenzuela et al., 2017). Portanto, área agrícola potencializa o aumento de dano genotóxico entre morcegos frugívoros, quando comparado a fragmentos urbanos.

Estudos anteriores denunciaram a ação de pesticidas em morcegos frugívoros relacionado ao dano oxidativo, alterações metabólicas e morfológicas no fígado (Amaral et al., 2012a,b; Losano 2015; Oliveira et al., 2017), e esses danos podem vir a comprometer a sobrevivência das populações (Bayat et al., 2014; Valdespino; Sosa 2017). Dado que, os resíduos de pesticidas contaminam o ar, o solo, a água, as plantas e animais (Bayat et al., 2014; Martinez-Valenzuela et al., 2017). Aliado a esses relatos científicos, favoreceu nossa investigação para estado de Goiás, que é o quinto na categoria nacional que mais utiliza agrotóxico, sendo Rio Verde o décimo município brasileiro que mais emprega pesticidas em seus cultivos (Pignat et al., 2017).

Embora haja poucos relatos toxicológicos para a fauna do bioma, avaliações de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* no cerrado Goiano já reportaram maior dano no DNA atribuído ao ambiente agrícola quando comparado a ambiente urbano por meio de análise de biomarcadores genotóxico (Ensaio Cometa) (Assunção 2016). Trabalhos com aves do Cerrado utilizando mesmo teste em células sanguíneas constataram maior frequência de MN em animais de área agrícola com influência urbana, em comparação com as áreas mais isoladas e menos antropizadas (Baesse et al., 2015). Assim, as evidências toxicológicas comprovadas por técnicas de detecção de dano genotóxico sugerem que o aumento na frequência de MN em células esfoliadas de mucosa bucal de

morcegos frugívoros de área agrícola, bem como aumento das demais ANs pode ser atribuído a baixa qualidade ambiental decorrente da antropização e uso de agrotóxicos.

Os aspectos fitogeográficos em Palmas, TO, são caracterizados por mata de galeria no interior da cidade, em que um dos pontos forma corredor ecológico ligando até a Área de Preservação Ambiental do Parque Estadual do Lajeado (UC). Essas áreas sofrem pressão do efeito de borda pela expansão urbana, poluição do ar e dos cursos hídricos. Os morcegos frugívoros desse ecossistema apresentaram resultados semelhantes para a frequência de micronúcleo, daqueles frugívoros de área agrícola. Células binucleas também mostraram frequência significativa, essa que está associada a defeito na citocinese. O dano genotóxico aqui relatado pode ter sido atribuído à pressão de expansão urbana, dado que em estudos toxicológicos recentes, morcegos de área urbana têm apresentado estresse perante a poluição atmosférica, águas residuais, metais pesados (Naidoo et al., 2013; Flache et al., 2015, 2016; Nighat et al., 2016), e dano no DNA atribuído a provável pressão do efeito de borda (Assunção 2016).

Os insetívoros capturados em abrigo na PFHC em Palmas, à frequência de MN foi maior do que frugívoros e nectarívoros nos dois municípios. Essa alta taxa de MN observada em insetívoros na ponte, pode estar relacionado a insetos que possivelmente tiveram contato com agentes químicos. Embora propriedades agrícolas estejam em um raio de 20 km do abrigo. Entretanto, morcegos da família Molossidae possuem alta capacidade de dispersão (Speer et al., 2017), forrageando mais de 50 km em uma única noite (Best; Geluso, 2003). Além disso, no abrigo os morcegos estão susceptíveis a poluentes atmosféricos, estes que tem sido indicado para efeito genotóxico (Ciarrocca et al., 2012; Goethel et al., 2014; Sposito et al., 2017), assim como, partículas de petróleo provenientes da combustão dos automóveis (Goethel et al., 2014; Kowalska et al., 2017).

Aqui, chamando atenção para novos estudos com essa colônia por ser uma população de milhares de indivíduos, e que os danos genotóxicos observados pode ser indicativos de estresse ambiental nessa população. De modo geral, os morcegos fornecem serviços essenciais no ambiente e uma população sustentada e próspera é vital para a saúde do ecossistema (Bayat et al., 2014) e que compreender as questões que ameaçam a sua sobrevivência é crucial para a sua proteção e conservação.

Vale pontuar que a guilda trófica de morcegos insetívoros é a mais estudada no mundo para exposições toxicológicas (Bayat et al., 2014; Zukal et al. 2015), no entanto,

no Brasil as avaliações ainda são incipientes. Dentre os poucos estudos, cita-se o trabalho de Zocche et al. (2010), realizados no sul do Brasil, demonstrando dano no DNA em morcegos insetívoros decorrente da ação de metais pesados. Zukal et al. (2015) enfatizam que a bioacumulação de metais pesados em morcegos insetívoros têm valores médios de contaminantes mais baixos em tecidos do que espécies frugívoras e nectarívoras. Todavia, é o grupo trófico mais apontado para o declínio populacional decorrente das ações antrópicas e de impacto químico ambiental.

Outros resultados obtidos neste estudo são apresentados apenas como critério de investigação e replicação, isto é, a soma das ANs (BE, BI, CR, CD, PI e CA). O total de ANs corroborou que, em área agrícola, animais frugívoros apresentaram aumento na frequência de anormalidades, porém em relação a insetívoros. Em Palmas a taxa maior de ANs ocorreu para insetívoros. Esse tipo de análise embora não seja muito comum em estudos com células esfoliadas de mucosa bucal, é bastante frequente em teste de MN em eritrócitos em anfíbios e peixes (Arcaute et al., 2014; Lajmanovich et al., 2014; Seriani et al., 2015; Vieira et al., 2016; Montalvão et al., 2017) e, portanto, podem estar associadas ao aumento da frequência de micronúcleos (Gómez-Meda et al., 2006). O aumento da frequência de ANs é um sinal de reações adversas a célula e/ou de mecanismos de controle utilizados para eliminar células com danos ao DNA (Rosin, 1992; Fijan 2002; Yadav; Jaggi 2015), sendo registradas quando o organismo está em situações de estresse, mudanças na dieta, condições de doença e danos no metabolismo energético entre outros atributos biológicos e ambientais (Thomas et al., 2009a; Bolognesi et al., 2015b; Peteffi et al., 2016; Vieira et al., 2016; Gómez-Meda et al., 2016; Gómez-Meda et al., 2017).

Morcegos estão frequentemente expostos aos múltiplos estressores antropogênicos ao mesmo tempo, e podem mostrar efeitos tanto antagônicos quanto, mais frequentemente, combinados ou sinérgicos (Zukal et al., 2015), e assim fatores de risco genotóxico, que induzem aberrações cromossômicas, não podem ser vistos de forma isolada (Stich et al., 1983a). Os estressores podem incluir toxinas naturais, poluentes antropogênicos, pesticidas, metais pesados e doenças (Bayat et al., 2014; Zukal et al., 2015).

Finalmente, neste trabalho, foi evidenciado maior susceptibilidade a dano genotóxico para o hábito frugívoro e insetívoros. Chamando atenção também para *Glossophaga soricina*, espécie nectarívora neotropical generalista (Zortéa 2003;

Nogueira et al., 2007; Oprea et al., 2012; Aguiar et al., 2014), com dieta diversificada, incluindo frutos, partes florais e até mesmo insetos (Gardner 1977; Zortéa 2003) em que não foi observado aumento significativo em MN e ANs nos ambientes estudados, e sem resposta para sua susceptibilidade genotóxica. Estudos futuros podem avaliação frequência MN em células esfoliadas da mucosa bucal, em paralelo com técnicas de detecção de bioacumulação em morcegos. Nesse sentido, contribuindo para conhecimento dos xenobióticos que afetam dano no DNA como a formação de MN e ANs.

CONCLUSÃO

Nesse estudo, foi apresentado pela primeira vez MN e outras ANs em células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos para avaliação de genotoxicidade entre guildas tróficas, demonstrando eficiente biomarcador para a quiroptero fauna. Morcegos frugívoros apresentaram frequência significativa MN em área agrícola e urbana. Além disso, insetívoros de abrigo em área urbana detiveram taxa maior de MN quando comparado a nectarívoros e frugívoros. Os dados alertam para susceptibilidade de formação de dano genotóxico em mucosa bucal de morcegos no cerrado. Esses achados estão relacionados a baixa qualidade ambiental dos ecossistemas e esses animais foram investigados. Mais estudos empregando a análise da sensibilidade ecotoxicológica por meio do teste de micronúcleo, ajudará na padronização do biomarcador, bem como auxiliar na compreensão de áreas perturbadas, em busca de proteção dos ecossistemas e na conservação de morcegos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, L.M.S., Bernard, E. Machado, R.B., 2014. Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Neotropical savannah. *Zoologia*, 31:223-229.

Aguiar, L.M.S, Bernard E., Machado R.B., Jones G., 2016. Should I stay or should I go? Climate change effects on the future. *Global Ecology and Conservation*, 5:22-33.

Allinson, G., Mispagel, C., Kajiwara, N., Anan, Y.; Hashimoto, J.; Laurenson, L.; Allinson, M.; Tanabe, S. 2006. Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. *Chemosphere*, 64:1464-1471.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M. B., 2012a. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology*, 72:299-304.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picaço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012b. Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica*, 14:225-232.

Assunção, D. Avaliação do dano genético em células sanguíneas de quirópteros de áreas urbanas e não urbanas. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) apresentada a Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Arcaute, C.R., Pérez-Ingles, J.M., Nikoloff, N., Natale, G. S., Soloneski, S., Larramendy, M. L., 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators*, 45:632-639.

Bayat, S., Geiser, F., Kristiansen, P., Wilson, S.C., 2014. Organic contaminants in bats: trends and new issues. *Environment International*, 63:40-52.

Bartolotta, S.A, Pacskowski, M.G., Hick, A., Carballo, M.A., 2011. Micronuclei Assay in Exfoliated Buccal Cells from Individuals Exposed to Arsenic in Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61:337-343.

Baesse, C.Q., Magalhães Tolentino, V.C., Silva, A.M., Silva, A.A., Ferreira, G.Â.; Paniago, L.P.M., Nepomuceno, J.C., Melo, C., 2015. Micronucleus as biomarker of

genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115:223-8.

Bernardi, N., Gentile, N., Manas, F., Mendez, A., Gorla, N., Aiassa, D., 2015. Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Cordoba. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 113:126-131.

Best, T.L., & Geluso, K.N., 2003. Summer foraging range of Mexican freetailed bats (*Tadarida brasiliensis mexicana*) from Carlsbad Cavern, New Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 48, 590–596.

Benvindo-Souza, M., Assis, R.A., Oliveira, E.A.S., Borges, R. E., Santos, L. R. S., 2017. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:27724-27730.

Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., Fenech, M., 2013. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753: 100-113.

Bolognesi, C., Roggieri, P., Ropolo, M., Thomas, P., Hor, M., Fenech, M., Nersesyan A., Knasmueller, S., 2015a. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*, 30:545-555.

Bolognesi, C., Bonassi S., Knasmueller, S., Fenech, M., Bruzzone, M., Lando, C., Ceppi, M., 2015b. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 766:20-31.

Brinati, A., Oliveira, J.M., Silva Oliveira, B., Soares Barros, M., Marques Carvalho, B., Silva Oliveira, L., Lopes Queiroz, M.E., Pinto Matta, S.L., Bontempo Freitas, M., 2016. Low, chronic exposure to endosulfan induces bioaccumulation and decreased carcass

total fatty acids in neotropical fruit bats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97:626-631.

Carrard, V.C., Costa, C.H., Ferreira, L.A., Lauxen, I.S., Rados, P.V., 2007 Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal, *Rev Fac Odontol Porto Alegre, Porto Alegre*, 18:77-81.

Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalcxin, E., 2009a. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Journal of Medicinal Food*, 12:1286-1292.

Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalcxin, E., 2009b. Antioxidant potential of *Ginkgo biloba* leaf extract against uranium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18:1551-1558.

Clark, D.R., Shore R.F., 2001. Chiroptera. In: Shore RF, Rattner BA (eds) *Ecotoxicology of wild mammals*. Wiley, London, 159-214.

Carbajal-Lopez, Y., Gomez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderon-Segura, M.E., Martinez-Arroyo, A., 2016. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:2513-2520.

Castañeda-Yslas, I.J., Arellano-García, M.E., Garcia-Zarate, M.A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M.G. & Torres-Bugarín, O., 2016. Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, ID 7934257 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7934257>

Ciarrocca, M., Tomei, G., Palermo, P., Caciari, T., Cetica, C., Fiaschetti, M., Gioffre, PA., Tasciotti, Z., Tomei, F., Sancini, A. 2012. Environmental and biological monitoring of arsenic in outdoor workers exposed to urban air pollutants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215:555-561.

Damiani, A. P. Metais pesados e danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da bacia carbonífera catarinense. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) apresentado ao curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, CRICIÚMA, 2010.

Espitia-Perez, L., Sosa, M.Q., Salcedo-Arteaga, S., Leon-Mejia, G., Hoyos-Giraldo, L.S.; Brango, H., Kvitko, K; da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2016. Polymorphisms in metabolism and repair genes affects DNA damage caused by open-cast coalmining exposure. *Mutation Research-genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 808:38-51.

Fijan, N., 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 60:999-1014.

Flache, L., Czarnecki, S., During, R.A., Kierdorf, U., Encarnacao, J.A., 2015. Trace metal concentrations in hairs of three bat species from an urbanized area in Germany. *Journal of Environmental Sciences*, 31:184-193.

Flache, L., Ekschmitt, K., Kierdorf, U., Czarnecki, S., During, R.A., Encarnacao, J.A., 2016. Reduction of metal exposure of Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) following remediation of pond sediment as evidenced by metal concentrations in hair. *Science of the total Environment*, 547:182-189.

Gómez-Meda, B.C, Zúñiga-González, G.M., Sánchez-Orozco, L.V., Zamora-Perez, A.L., Rojas-Ramírez, J.P., Rocha-Muñoz, A.D., Sobrevilla-Navarro, A.A., Arellano-Avelar, M.A., Guerrero-de León, A.A., Armendáriz-Borunda, J.S., Sánchez-Parada, M.G., 2017. Buccal micronucleus cytome assay of populations under chronic heavy metal and other metal exposure along the Santiago River, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189:522.

Gomez-Meda, B.C., Zamora-Perez, A.L., Munoz-Magallanes, T., Sanchez-Parada, M.G., Banuelos, J.J.G., Gerrero-Velazquez, C., Sanches-Orozco, L.V., Vera-Cruz, J.M.,

Armendariz-Borunda, J., Zuniga-Gonzales, G.M., 2016. Nuclear abnormalities in buccal mucosa cells of patients with type I and II diabetes treated with folic acid. *Mutation Research*, 797:1-8.

Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, MA., Villalobos-Pietrini, R., De Leon-Rodriguez, J., 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466:117-124.

Goethel, G., Brucker, N., Moro, A.M., Charao, M.F., Fracasso, R., Barth, A., Bubols, G., Durgante, J., Nascimento, S., Baierle, M., Saldiva, P.H., Garcia, S.C. 2014. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 770:61-65.

Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25:523-530.

Gardner, A. L., 1977. Feeding habits, pp. 293-350. In: R. J. Barker, J. K. Jones Jr. & D. C. Carter (eds.), *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae, Part II*. Spec. Publ. Mus. Texas Tech. University, 13:1-364.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.D.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewatertreatment plant. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 334-338.

Hernout, B.V., Arnold, K.E. McClean, C.J. Walls, M., Baxter, M., Boxall, A.B.A., 2016. A national level assessment of metal contamination in bats. *Environmental Pollution*, 214:847-858.

Hickey, M.B.C., Fenton, M.B., MacDonald, K.C., Soulliere, C., 2001. Trace elements in the fur of bats (Chiroptera: vespertilionidae) from Ontario and Quebec, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66:699-706.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. and Fenech, M., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659:93-108.

Hoenerhoff M. & Williams K., 2004. Copper-associated hepatopathy in a Mexican fruit bat (*Artibeus jamaicensis*) and establishment of a reference range for hepatic copper in bats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6:590-593.

Kalaev, V.N., Artyukhov, V.G., Nechaeva, M.S., 2014. Micronucleus test of human oral cavity buccal epithelium: Problems, achievement, perspectives. *Cytology and genetics*, 48:398-441

Kowalska, M., Wegierek-Ciuk, A., Brzoska, K., Wojewodzka, M., Meczynska-Wielgosz, S., Gromadzka-Ostrowska, J., Mruk, R., Ovrevik, J., Kruszewski, M., Lankoff, A. 2017. Genotoxic potential of diesel exhaust particles from the combustion of first- and second-generation biodiesel fuels-the FuelHealth project. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:24223-24234.

Korsakov, A.V., Yablokov, A.V., Troshin, V.P., Mikhalev, V.P., 2015. The Buccal Epithelium as Environmental Indicator. *Biology Bulletin* 42:273-277.

Kunz TH, Fenton MB. 2003. *Bat Ecology*. The University of Chicago Press. Klaric, E., Par M., Profeta, I., Kopja, N., Rozgaj R., Kasuba, V., Zeljezic, D., Tarle, Z., 2013. Genotoxic Effect of Two Bleaching Agents on Oral Mucosa. *Cancer genomics & proteomics*, 10:209-215.

Klink, C.A. & Machado R.B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, 19:707-713.

Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Basso, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the

herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769:7-12.

Leon-Mejia, G., Quintana, M., Debastiani, R., Dias, J., Espitia-Perez, L., Hartmann, A., Genriques, J.A.P., Silva, J., 2014. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and environmental safety*, 107:122-139.

Little, M.A., Derefinko, K.J., Bursac, Z., Ebbert, J.O., Colvin, L., Talcott, G.W., Hryshko-Mullen, A.S., Richey, P.A., Klesges, R.C., 2015. Prevalence and correlates of tobacco and nicotine containing product use in a sample of United States Air Force trainees. *Nicotine & Tobacco Research*, 18:416-23.

Losano, N.F. 2015. Efeitos da exposição ao inseticida deltametrina em morcegos frugívoros. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal – UFV. Viçosa – MG.

Martinez-Valenzuela, C., Waliszewski, S., Amador-Munoz, O., Meza, E., Calderon-Segura, ME., Zenteno, E., Huichapan-Martinez, J., Caba, M., Felix-Gastelum, R., Longoria-Espinoza, R., 2017. Aerial pesticide application causes DNA damage in pilots from Sinaloa, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:2412-2420.

Montalvão, M.F., de Souza, J.M., Guimarães, A.T.B., de Menezes, I.P.P., Castro, A.L.D.S., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G., 2017. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 183:491-502.

Minasi, L.B., Costa, E.O.A., Silva, D.M., Melo, C.O.A., de Almeida, J.G., Vieira, T.C., Silva, R.L., Ribeiro, C.L., da Silva, C.C., da Cruz, A.D., 2011. Cytogenetic damage in the buccal epithelium of Brazilian aviators occupationally exposed to agrochemicals. *Genetics and Molecular Research*, 10: 3924-3929.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G.; da Fonseca G.A. & Kent, j., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853–858.

Naidoo, S., Vosloo, D., Schoeman, M.C., 2013. Foraging at wastewater treatment works increases the potential for metal accumulation in an urban adapter, the banana bat (*Neoromicia nana*). *African Zoology*, 48:39-55.

Naderi, S.H., Bestwick, J.P., Wald, D.S., 2012. Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: meta-analysis on 376,162 patients. *The American Journal of Medicine*, 125:882-7.

Nam, D., Yates, D., Ardapple, P., Evers, D.C., Schmerfeld, J., Basu, N., 2012. Elevated mercury exposure and neurochemical alternations in little brown bats (*Myotis lucifugus*) from a site with historical mercury contamination. *Ecotoxicology*, 4:1094-1101.

Nighat, S., Nadeem, MS., Mahmood, T., Kayani, A.R., Mushtaq, M., ul Hassan, M.M., 2016. Estimation of Heavy Metals in Indian Flying Fox *Pteropus giganteus* (Brunnich, 1782) from Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 48:1787-1792.

Nogueira, M. R.; Peracchi, A. L. & Moratelli, R. 2007. Subfamília Phyllostominae. In: REIS, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A. & Lima, I.P. eds. *Morcegos do Brasil*. Londrina, N.R. Reis, 61-97.

Nogueira, C., Ferreira, M.N., Recoder R.S., Carmignotto, A.P.C., Valdujo, P.H., Lima, F.C. T., Gregorin, R., Silveira, L.F., & Rodrigues, M.T., 2011. Vertebrate fauna of Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: biodiversity and conservation in the Brazilian Cerrado hotspot. *Biota Neotropica*, 11:1. <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/en/abstract?article+bn04011012011>

Nogueira, M.R., de Lima, I.P., Moratelli, R., Tavares, V.C., Gregorin, R., Peracchi, A.L., 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*, 10:808-821.

Oprea, M., Peixoto, F.P., Resende, L.V., Collevatti, R.G., Telles, M.P.C., 2012. Isolation and characterization of 10 microsatellite loci for Pallas' long-tongued bat

Glossophaga soricina (Phyllostomidae). Genetics and Molecular Research, 11:3518-3521.

Oliveira, J.M; Brinati, A., Miranda, L.D.L., Morais, D.B., Zanuncio, J.C., Goncalves, R.V., Peluzio, M.D.G., Freitas, M.B., 2017. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). International Journal of Experimental Pathology, 98: 17-25.

Palmas. Lei complementar nº 155, de 28 de dezembro de 2007. Art. 29. Dispõe sobre a Política Urbana do Município de Palmas. Disponível em: <<http://legislativo.palmas.to.gov.br/media/leis/LEI%20COMPLEMENTAR%20N%C2%BA%20155%20de%2028-12-2007%2011-53-26.pdf>> Acesso em: 23 de Janeiro de 2018.

Petteffi, G.P., da Silva, L.B., Antunes, M.V; Wilhelm, C., Valandro, E.T., Glaeser, J., Kaefer, D., Linden, R., 2016. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to low levels of formaldehyde in a furniture manufacturing facility. Toxicology and Industrial Health, 32:1763-1773.

Pignati, A.W., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C., Pignatti, M.G., 2017. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. Ciência & Saúde Coletiva, 22:10.

Pilosof, S., Korinea, C., Moorec, M.S., Krasnova, B.R., 2014. Effects of sewage-water contamination on the immune response of a desert bat. Mammalian Biology, 79:183-188.

Pikula, J., Zukał, J., Adam, V., Band'Ouchová, H., Beklová, M., Hájková, P., Horáková, J., Kí'Zek, R., Valentíková, L., 2010. Heavy metals and metallothionein in vespertil-ionid bats foraging over aquatic habitats in the Czech Republic. Environmental Toxicology and Chemistry, 29:501-506.

Rainho, C.R., Correa, S.M., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., 2016. Biomonitoring of tunnel workers exposed to heavy air pollution in Rio de Janeiro, Brazil. *Air quality Atmosphere and Health*, 9:881-886.

Rosa, J.C.F, Fiegenbaum, M., Soledar, A.L., Claus, M.S., Souza Nunes, A.D., Cardoso, V.V., 2013. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms of the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:5883-5890.

Rosin, M.P. 1992. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Research*, 267:265-76.

Rocha, R.S., Meireles, J.R.C., Cerqueira, E.M.M., 2014. Chromosomal damage and apoptosis analysis in exfoliated oral epithelial cells from mouthwash and alcohol users. *Genetics and Molecular Biology*, 4:702-707.

Seriani, R., Abessa, D.M.S., Moreira, L.B., Cabrera, J.P.G., Sanches, J.Q., Silva, C.L.S., Amorin F.A.; Rivero, D.H.R.F.; Fitorra, L.S.; Carvalho-Oliveira, R.; Macchione, M.; Ranzani-Paiva M.J.T., 2015. In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112:162-168.

Souza, A.C.F., Silva, V.H.P., Seixas, C., Scudeller, T.T.O., Amaral, M.T.P., Ribeiro, D.A., 2016. Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosa Cells from Women Submitted to Chemotherapy After Mastectomy for Breast Cancer. *Anticancer Research* 36:1955-1958.

Stechert, C., Kolb, M., Djossa, B.A., Fahr, J., 2014. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:8812-21.

Shepherd, G.L. & Somers, C.M., 2012. Adapting the Buccal Micronucleus Cytome Assay for Use in Wild Birds: Age and Sex Affect Background Frequency in Pigeons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53:136-144.

Shaik, N. A., Shaik, J. P., Ali, A., Imran, A., Rao, D.K., 2010. Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination. *Food and Chemical Toxicology*, 48:3432-3435.

Speer, K.A., Petronio, B.J., Simmons, N.B., Richey, R., Magrini, K., Soto-Centeno, J.A., Reed, D.L., 2017. Population structure of a widespread bat (*Tadarida brasiliensis*) in an island system. *Ecology and Evolution*, 7:19. doi: 10.1002/ece3.3233

Sposito, J.C.V., Crispim, B.D., Roman, A.I., Mussury, R.M., Pereira, J.G., Seno, L.O., Grisolia, AB. 2017. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallid*. *Chemosphere*, 175:108-113.

Stich, H.F., Curtis, J.R., Parida, B.B., 1983a. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *International Journal of Cancer*, 30:553-559.

Stich, H.F., San, R.H., Rosin, M.P., 1983b. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann N Y AcadSci*, 407:93-105.

Stich, H.F., Rosin, M.P., Vallejera, M.O., 1984. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet*, 1:1204-1206.

Thies, M.L., Thies, K., McBee, K., 1996. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology*, 30:178-187.

Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. & Fenech, M., 2009a. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4: 825.

Thomas, P., Wang, Y.J., Zhong, J.H., Kosaraju, S.O., Callaghan, N.J., Zhou, X.F., Fenech, M., 2009b. Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Mutation Research*, 661:25-34

Valdespino, C., Sosa, V.J., 2017. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere*, 175:373-382.

Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., Oliveira, L.F., Cabrera, L.C., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B.R., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of The Total Environment*, 542:44-56

Williams, M., Ramos, D., Butron, A., Gonzales-Zúñiga, S., Ortiz, N. & Torre, B., 2010. Concentraciones de metales pesados en murciélagos del lodge "cock of the rocks" y alrededores, Kosñipata, Cuzco, Perú. *Ecología Aplicada*, 9:133-139.

Walter, L.A., Simpson, V.R., Rockett, L., Wienburg, C.L., Shore, R.F., 2007. Heavy metal contamination in bats in Britain. *Environmental Pollution*, 148:483-490.

Yadav, A.S, Jaggi, S., 2015. Buccal Micronucleus Cytome Assay - A Biomarker of Genotoxicity. *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, 6:236. doi:10.4172/2155-9929.1000236

Zortéa, M. 2003. Padrões reprodutivos e alimentares de três morcegos nectarívoros (Phyllostomidae: Glossophaginae) numa área de Cerrado do Brasil Central. *Brazilian Journal of Biology*, 63:159-168.

Zocche, J.J., Leffa, D.D., Damiani, A.P., Carvalho, F., Mendonca, R.A., Dos Santos, C.E.I., Bouffleur, L.A., Dias, J.F., Andrade, V.M., 2010. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin. *Brazilian Environmental Research*, 110:684-691.

Zukal, J., Pikulla, J., Bandouchova, H., 2015. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect. *Mammalian Biology*, 80:220-227.

CONCLUSÃO GERAL

O teste de micronúcleo em mucosa bucal de morcegos mostrou eficiente para detecção de micronúcleo e anormalidades nucleares (célula com broto nuclear, binucleada, cariorréxi, célula com cromatina condensada, picnótica e cariólise). Uma avaliação entre insetívoros capturados na colônia na PFHC em comparação aos de fragmentos florestais em Palmas – TO foi observado maior frequência nos morcegos nos animais da colônia. Essa taxa alta de MN nos insetívoros (*N. laticaudatus*) da colônia pode ter sido associada a uma dieta comprometida por contaminantes agrícolas ou poluição atmosférica no abrigo. Também foram avaliadas guildas tróficas (nectarívoros, frugívoros e insetívoros), demonstrando que animais frugívoros apresentaram maior taxa de dano genotóxico em área agrícola e urbana. Além disso, insetívoros de área urbana mostrou maior taxa de micronúcleo entre as guildas tróficas independentes dos ambientes. Diante desses resultados, o monitoramento ecotoxicológico por meio do teste de micronúcleo, aliado aos outros biomarcadores são necessários para formular indicadores da saúde dos morcegos e do ambiente, sendo alternativas urgentes para entendimento dos agentes xenobióticos nos ecossistemas e prol da conservação.