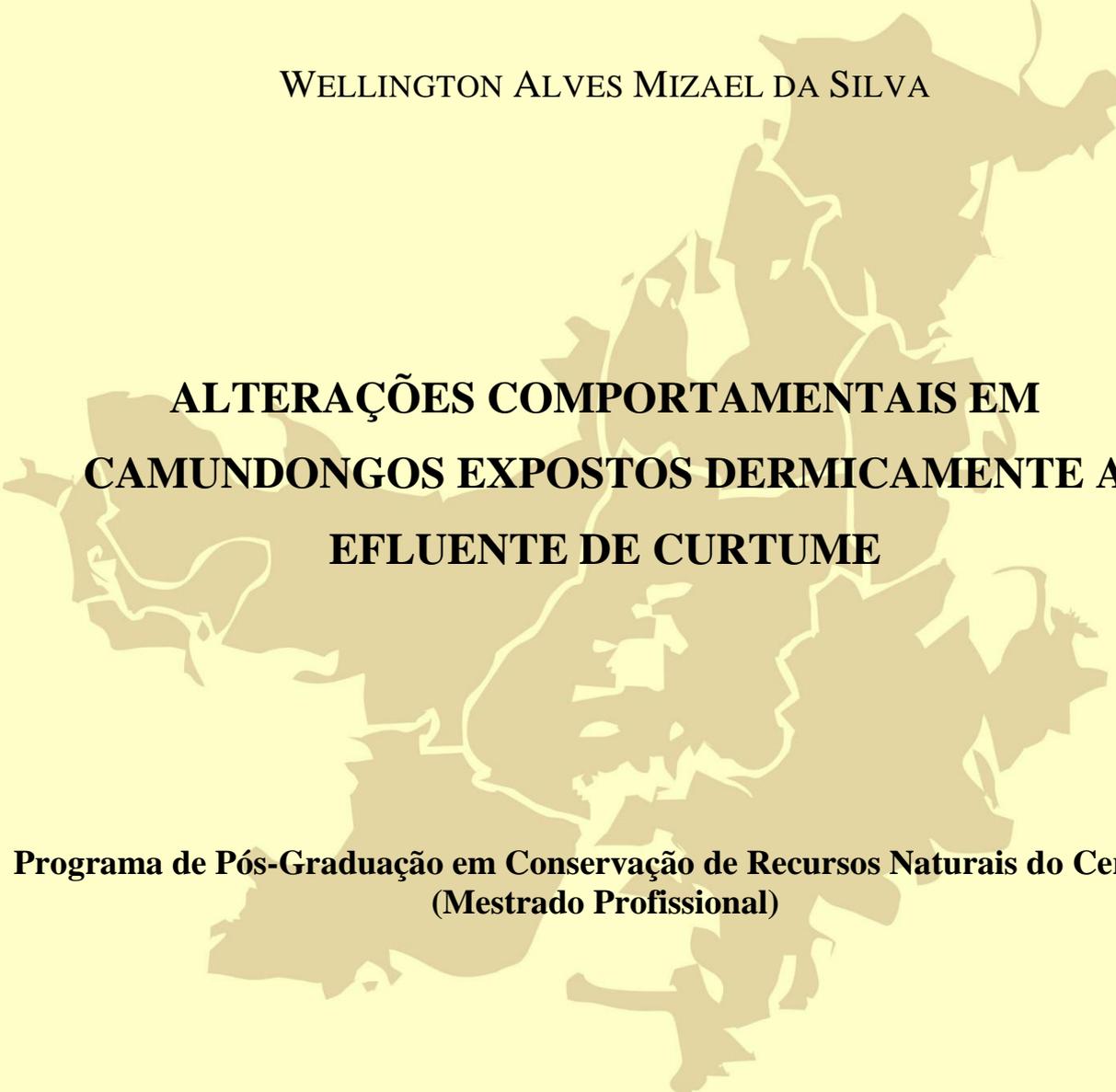


WELLINGTON ALVES MIZAEAL DA SILVA



**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS DERMICAMENTE A
EFLUENTE DE CURTUME**

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**



**Urutaí (GO)
2018**



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

WELLINGTON ALVES MIZAEAL DA SILVA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS DERMICAMENTE A
EFLUENTE DE CURTUME**

Orientador

Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**

Coorientador

Prof. Dr. **Thiago Lopes Rocha**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/IF Goiano**

S586a Silva, Wellington Alves Mizael da .

Alterações Comportamentais em Camundongos Expostos
Dermicamente a Efluente de Curtume / Campus Urutaí. [manuscrito] /
Wellington Alves Mizael da Silva. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.
31 fls.

Orientador: Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí,
2018.

1. *Xenobióticos*. 2. Modelos experimentais. 3. Mamíferos. 4.
Efluentes agroindustriais. I. Título.

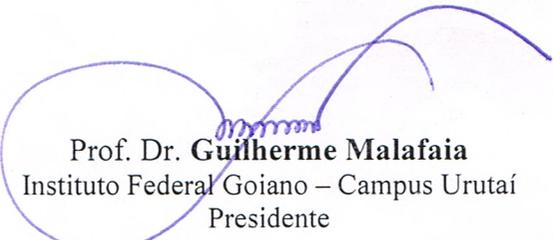
CDU 57

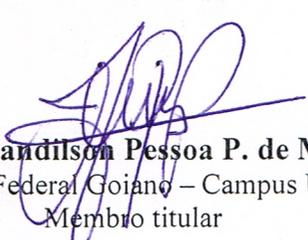


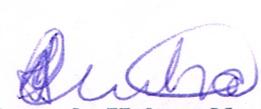
FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	<i>Aterro compactamentais em camundongos expostos diretamente a efluente de curture</i>
Orientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Coorientador:	Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Autor:	Wellington Alves Mizael da Silva

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **13 de março de 2018**, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa P. de Menezes**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof.ª Dra. **Ananda Helena Nunes**
Universidade Estadual de Goiás – Campus Anápolis
Membro titular

Em agradecimento à toda dedicação e empenho para o meu sucesso profissional e pessoal, dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à todos aqueles que de alguma maneira contribuíram significativamente com ensinamentos que levarei para toda vida pessoal e profissional.

Aos meus pais, Antônio Mizael da Silva e Heloisa Alves da Silva; às minhas irmãs, Fabiane Alves Mizael da Silva, Raquel Alves Mizael da Silva, e demais familiares e amigos por acreditarem em min.

Ao Professor, orientador e amigo Guilherme Malafaia, por tantos ensinamentos, correções e sugestões, por conselhos, pela confiança, e pela disponibilidade em auxiliar. Obrigado pelas oportunidades!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano (IF Goiano) – Campus Urutaí, pelo enorme apoio na execução deste trabalho e outros tantos trabalhos que realizamos. Além disso, agradeço aos professores colaboradores.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado (IF Goiano – Campus Urutaí), pelo apoio, e por esses dois anos juntos, pelas discussões em sala que foram bem proveitosas. Além disso, agradeço ao corpo docente do programa e aos professores colaboradores.

À todos os outros docentes que tive ao longo da minha vida escolar e acadêmica. Muitíssimo obrigado pelas correções, sugestões e incentivos!

Ao IF Goiano – Campus Urutaí, pelas inúmeras oportunidades e por me proporcionar ensino de qualidade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da minha bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a banca examinadora por suas contribuições valiosas, ao Dr. Ivandilson Pessoa P. de Menezes, Dra. Ananda Helena nunes e ao meu orientador Dr. Guilherme Malafaia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	ii
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Animais e grupos experimentais	13
2.2. Desenho experimental, e efluente utilizado e testes comportamentais	13
2.2.1. Testes labirinto em cruz elevado.....	16
2.2.2. Teste de reconhecimento de objetos.....	17
2.3. Análises estatísticas.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4. CONCLUSÃO	25
5. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR	25
5. REFERÊNCIAS	25
ANEXO I.....	01

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Grupos experimentais e exposição dérmica ao efluente de curtumes em camundongos machos.....	14
Figura 2- (A) Desenho esquemático que ilustra o labirinto em cruz elevado utilizado no presente estudo	16
Figura 2- (B) Imagem real do aparato utilizado para avaliação preditiva de ansiedade dos camundongos expostos ou não à efluente de curtume.	17
Figura 3- Desenho esquemático da sala de testes ilustrando os aparatos utilizados no teste de reconhecimento de objetos.....	18
Figura 4- Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos, nos braços fechados e índice de ansiedade para camundongos Swiss e C56Bl/6J, expostos ou não ao efluente de curtume.....	20
Figura 5- Índices de reconhecimento de objetos de camundongos C57Bl/6J e Swiss expostos ou não ao efluente de curtume após a sessão de treinamento, seguida de uma sessão de teste (1h após treinamento).....	22
Figura 6- Novos índices de reconhecimento de objetos para (C57Bl/6J e camundongos Swiss) expostos ou não a efluentes de curtumes, calculados 1 hora após a sessão de treinamento do teste de reconhecimento de objeto.	23

RESUMO

Os efluentes do curtume constituem resíduos altamente poluidores, o que pode causar impactos negativos para a saúde das pessoas e para o ambiente. Contudo, estudos que investigaram os efeitos da exposição dérmica a estes poluentes no sistema nervoso central dos modelos experimentais de mamíferos são ainda incipientes. Nesse sentido, e com o objetivo de expandir o conhecimento além dos efeitos neurotóxicos observados quando a água contaminada por esses xenobióticos é ingerida, foram analisados os efeitos neurocomportamentais da exposição dérmica de machos de camundongos das linhagens C57Bl/6J e Swiss. Os animais foram expostos ao efluente de curtume bruto (tipo *wet blue*) durante duas horas, durante cinco dias, totalizando 15 dias de exposição. Depois, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (teste preditivo da ansiedade) e ao teste de reconhecimento de objeto (utilizado na identificação de déficit de memória). Nossos dados mostraram que a exposição dérmica ao efluente de curtume induziu um comportamento ansiogênico nos animais, quando comparados àqueles que não tiveram contato direto com esses poluentes. Observou-se também que os animais expostos ao efluente de curtume obtiveram menores índices de reconhecimento de novos objetos, evidenciando assim deficiência de memória e indicando uma possível influência dos constituintes do efluente de curtume na cognição animal. O presente estudo atesta a hipótese de que a exposição dérmica a efluentes de curtumes provoca distúrbios comportamentais em camundongos C57Bl/6J e Swiss.

Palavras-chave: xenobióticos; modelos experimentais; mamíferos; efluentes agroindustriais; camundongos Swiss; C57Bl/6J.

ABSTRACT

Effluents are highly polluting waste, which can have negative impacts on people's health and the environment. However, studies investigating the effects of dermal exposure to these pollutants on the central nervous system of experimental mammalian models are still incipient. In this sense, and in order to expand the knowledge beyond the neurotoxic effects observed when the water contaminated by these xenobiotics is ingested, the neurobehavioral effects of the dermal exposure of males from the C57Bl/6J and Swiss lineages were analyzed. The animals were exposed the crude effluent (wet blue type) for two hours for five days, totaling 15 days of exposure. Afterwards, the animals were submitted to the high cross maze (anxiety predictive test) and to the object recognition test (used to identify memory deficit). Our data showed that dermal exposure to tannery effluent induced an anxiogenic behavior in the animals, when compared to those that did not have direct contact with these pollutants. It was also observed that the animals exposed to the effluent of tannery obtained lower rates of recognition of new objects, evidencing the memory deficiency and indicating a possible influence of the constituents of the tannery effluent on animal cognition. The present study supports the hypothesis that dermal exposure to tannery effluents causes behavioral disturbances in C57Bl/6J and Swiss mice.

Key-words: xenobiotic; experimental models; mammals; tannery effluent; C57Bl/6J; Swiss mice

1. INTRODUÇÃO

A geração de resíduos específicos contendo compostos orgânicos e inorgânicos vem das mais diferentes atividades antrópicas, podendo causar impactos tanto no meio ambiente como na saúde das pessoas (Claxton et al., 1998; Segura et al., 2009). De acordo com Misra & Pandey (2005), a indústria tornou-se parte essencial da sociedade moderna, e a produção de resíduos é um resultado inevitável das atividades de desenvolvimento. Um material se torna desperdício quando ele é descartado sem esperar ser compensado por seu valor inerente. Esses resíduos podem representar um perigo potencial para a saúde humana ou o meio ambiente (solo, ar e água) quando tratados, armazenados, transportados ou descartados de forma inadequada.

Um dos setores que causam a poluição mais nociva para o meio ambiente é aquele ligado às indústrias de curtumes. A indústria do couro cobre diversos produtos e processos industriais e o curtimento do couro bovino, em especial, o tratamento de matérias-primas, isto é, a conversão do couro cru ou pele em couro e terminá-lo de modo que ele pode ser usado na fabricação de uma ampla gama de produtos de consumo. As indústrias de calçados, vestuários, móveis, automóveis e produtos de couro são os pontos de venda mais importantes para a produção de couros (Gödecke et al., 2012).

De acordo com Freitas & Melnikov (2006), muitas unidades de processamento do couro concentram especialmente na atividade chamada *wet blue*, em que o cromo é o principal componente químico utilizado. *Wet blue* é um dos processos fundamentais da ação de curtimento e ajuda na conservação do couro por longos períodos para o tratamento posterior. O couro pode até ser transportado para outros países a fim de receber um tratamento final, por exemplo, a coloração. Além da degradação ambiental causado pelos processos de transformação da indústria de curtimento do couro (Shakir et al., 2012; Lofrano et al., 2013), diversos problemas de saúde têm sido relatados em humanos.

Estudos já demonstraram alta prevalência de asma, aumento do número de mortes por câncer de pulmão, problemas que afetam bexiga, rim, pâncreas e leucemia em trabalhadores de curtume (Costantini et al., 1989; Shahzad et al., 2006; Gowd et al., 2008). Veyalkin & Alexander (2003) encontraram uma alta taxa de mortalidade devido ao câncer pancreático em mulheres que trabalhavam no curtimento do couro, e Rastogi et al. (2008) evidenciaram alta taxa de morbidade em homens expostos a efluente de curtumes e diagnosticados com problemas respiratórios. Salazar (2008), analisando o impacto sobre o meio ambiente e sobre a saúde dos trabalhadores do curtume mexicano, ao lidar com o cromo, concluiu que “[no]

existe una capacitación constante para sus trabajadores, y mucho menos un seguimiento al manual de higiene y seguridad en el trabajo” (Salazar, 2008 p.68). Cuberos et al. (2009) destacam que os danos causados pela exposição ao cromo provocam alterações dermatológicas e oftalmológicas.

Portanto, a relação causal entre a exposição humana aos efluentes de curtumes e as respectivas consequências prejudiciais já foi demonstrada. Apesar de tal demonstração, não há registros específicos sobre a associação entre as mudanças do sistema nervoso central e o trabalho em indústrias de curtumes na literatura especializada em saúde ocupacional. É comum nas indústrias de curtumes a exposição diária aos componentes químicos contidos em solventes orgânicos ou inorgânicos voláteis que são conhecidos como sendo neurotóxicos.

Ao considerar algumas dificuldades inerentes aos estudos envolvendo trabalhadores de indústrias de curtumes de pequena ou média escala (a maioria em muitos países), tais como a dificuldade de acesso a esses curtumes (uma vez que muitos não operaram em conformidade com a legislação ambiental nesses países), a baixa aprovação de pesquisas clínicas e ignorância nos procedimentos utilizados em atividades diárias de trabalho nessas fábricas de curtumes, os estudos experimentais envolvendo modelos animais podem contribuir para uma melhor compreensão donexo causal entre a exposição aos efluentes de curtume e possíveis alterações no sistema nervoso central e suas consequências.

Quanto aos efeitos da exposição aos efluentes de curtume sobre os mamíferos e os possíveis impactos sobre o sistema nervoso central animal, as pesquisas ainda são incipientes. Nos estudos de Siqueira et al. (2011), Moysés et al. (2014), Souza et al. (2016); Guimarães et al. (2016) e Rabelo et al. (2016) a exposição dos animais a efluente de curtume ocorreu por ingestão de água contendo concentrações deste poluente que variaram de estudo para estudo. Tais investigações são importantes, porque contribuem para ampliar o conhecimento sobre os efeitos da ingestão de água contaminada por esses resíduos, especialmente quando se considera que muitas indústrias de curtumes os descartam diretamente em cursos de água que servem como abastecimento de água a determinadas populações.

Até agora não há estudos que analisaram os efeitos da exposição de animais de laboratório para efluentes de curtumes e assim simulados a atividade diária dos trabalhadores da indústria de curtume em condições insalubres (sem o uso de equipamentos de proteção individual). Isto é observado em diferentes curtumes rudimentares no Brasil e outros países, como a China, Paquistão e Índia, em que a atividade de curtume é importante para a economia. Nosso objetivo, portanto, foi analisar os efeitos da exposição dérmica aos efluentes

de curtumes em camundongos das linhagens C57Bl/6J e Swiss, com foco na ansiedade e déficit de memória, visando ampliar, desta forma, o conhecimento sobre os efeitos neurotóxicos destes poluentes. Nossos resultados representam um avanço no conhecimento sobre os efeitos da exposição aos efluentes de curtume, e podem auxiliar estudos mais específicos sobre os mecanismos de ação neurotóxica desses poluentes em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e grupos experimentais

Para a análise dos possíveis efeitos neurocomportamentais da exposição dérmica a efluentes de curtumes, foram utilizados 48 camundongos (adultos do sexo masculino – de 3 a 4 meses de idade) das linhagens C57Bl/6J (n = 24) e Swiss (n = 24). A escolha por camundongos machos, deveu-se em função da maior prevalência de homens como trabalhadores da indústria de curtume (Saner et al., 1984; Veyalkin & Gerein, 2006; Khan et al., 2013; Chandrasekaran et al., 2014), que colocam os indivíduos do sexo masculino como um grupo de alto risco quanto aos efeitos da exposição dérmica aos efluentes de curtumes. Além disso, a escolha de duas linhagens de camundongos baseou-se na possibilidade de exposição a efluente de curtumes causar diferentes efeitos em camundongos heterogênicos (Swiss) e isogênicos (C57Bl/6J).

Os animais utilizados no presente estudo foram mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (Urutaí, Estado de Goiás, Brasil) sob condições sanitárias convencionais de biotério, temperaturas controladas (22 a 24°C) e luminosidade (ciclo de 12 horas claro). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão coletivas para camundongos (30 x 20 x 18 cm) cobertas com tampas de malha de arame galvanizado tratadas com antioxidantes, com um limite de até quatro animais por gaiola. As gaiolas foram limpas três vezes por semana, com a troca de maravalha e alimentos. A dieta padrão para roedores (Nuvilab CR 1) e água fresca foram oferecidos a vontade. Ressaltamos que todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso Animal (CEUA) do Instituto Federal Goiano (IF Goiano) (Goiás, Brasil) (registro nº 17/2014). O manejo dos animais e todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais experimentais.

2.2. Desenho experimental, efluentes utilizados e testes comportamentais.

Inicialmente, os animais de cada linhagem foram contrabalanceados de acordo com as co-variáveis idade e massa corporal, de modo que a idade média e a massa corporal média dos grupos experimentais foram estatisticamente iguais, no início do experimento. Em seguida, os animais de cada linhagem foram distribuídos em dois grupos experimentais: o grupo efluente curtume, em que os animais foram mantidos em contato direto com o efluente de curtume bruto (*wet blue* – vide caracterização físico-química e química na Tabela 1), em uma gaiola transparente de policarbonato (30 x 20 x 18 cm) (máximo de 4 animais / gaiola), contendo 150 mL do resíduo por duas horas (com outra gaiola perfurada posicionada acima - Figura 1), durante cinco dias por semana (de segunda a sexta-feira - por três semanas, totalizando 15 dias de exposição); e o grupo controle, em que os animais foram colocados no interior das gaiolas, sem o efluente de curtume, mas com água na mesma medida do efluente de curtume. As gaiolas estavam dispostas de modo a evitar a fuga dos camundongos. Além disso, as exposições foram realizadas dentro de uma capela de exaustão para evitar a dispersão de gases aos pesquisadores. Após o período de exposição, os animais expostos ao efluente foram colocados em gaiolas contendo maravalhas secas iluminado com luz quente, para aquecê-los, antes de retorná-los ao biotério.

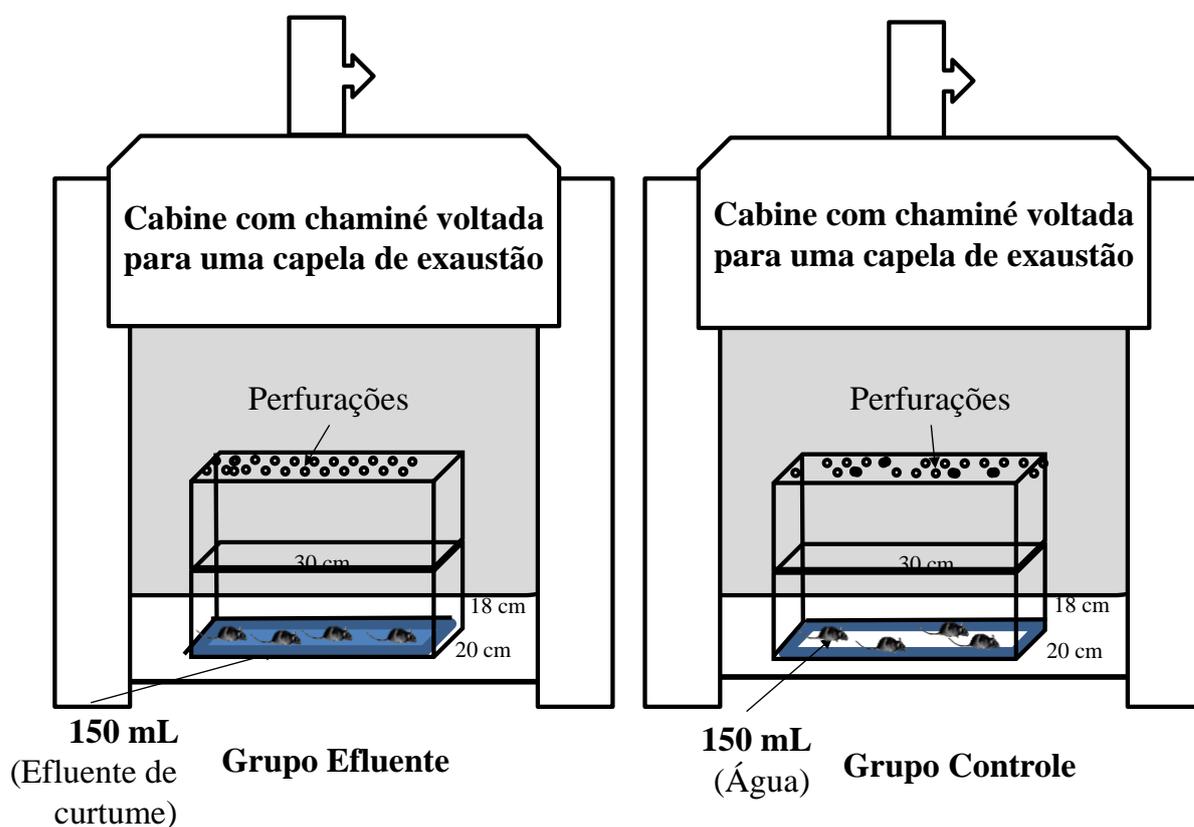


Figura 1. Grupos experimentais e exposição dérmica ao efluente de curtumes em camundongos machos.

Tabela 1. Caracterização físico-química e química do efluente de curtume (100%) e água utilizada no presente estudo.

Parâmetros ¹	Diretrizes da OMS para a qualidade da água potável ²			
	Efluente Curtume (100%)	Água	Normalmente encontrado em água doce / água de superfície / água subterrânea	Diretriz baseada na saúde pela OMS
pH at 25°C (UpH)	4.05	7.19	Nenhuma orientação	6.5 – 8.5
Total dissolved solids (mg.L ⁻¹)	37,380.00	80.00	Nenhuma orientação	Nenhuma orientação
Zn (mg.L ⁻¹)	0.30	0.03	Nenhuma orientação	3.00 mg.L ⁻¹
Na (mg.L ⁻¹)	9,690.00	5.01	<20 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹
Ca (mg.L ⁻¹)	601.20	4.00	Nenhuma orientação	Nenhuma orientação
Mg (mg.L ⁻¹)	364.80	2.43	Nenhuma orientação	Nenhuma orientação
Pb (mg.L ⁻¹)	0.32	<0.01	Nenhuma orientação	0.01 mg.L ⁻¹
As (mg.L ⁻¹)	<0.01	<0.01	Nenhuma orientação	0.01 mg.L ⁻¹
Cr (mg.L ⁻¹)	859.00	<0.05	<0.002 mg.L ⁻¹	0.05 mg.L ⁻¹
Cd (mg.L ⁻¹)	0.95	<0.001	<0.002 mg.L ⁻¹	0.003 mg.L ⁻¹
Ni (mg.L ⁻¹)	5.50	<0.01	<0.02 mg.L ⁻¹	0.02 mg.L ⁻¹

¹ A análise do efluente de curtume e da água seguiu a metodologia recomendada pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA, 2005).

² As diretrizes da OMS para a qualidade da água potável, criada em Genebra, em 1993, são o ponto de referência internacional para a configuração padrão e para a segurança da água potável (<http://www.lenntech.nl/toepassingen/drinkwater/normen/who-s-drinking-water-standards.htm>)

Após o período de exposição ao efluente, os camundongos passaram por um teste comportamental preditivo de ansiedade e um teste preditivo de déficit de memória de reconhecimento de objetos, conforme descritos a seguir.

2.2.1. Teste labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido amplamente utilizado para medir a ansiedade em roedores (Rodgers & Dalvi, 1997; Walf & Frye, 2007, Komada et al., 2008). O aparelho utilizado para o teste LCE está na configuração de um sinal "+" e é composto por dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) um do outro e perpendiculares a dois braços fechados (25 x 5 x 16 cm) com uma plataforma central (5 x 5 cm) (Figura 2). A sala de teste de comportamento era insonorizada e o nível de iluminação foi mantido em 100 lx. Os camundongos foram colocados individualmente na zona central do labirinto, de frente para um braço aberto e deixado por 5 minutos para exploração livre. Todos os camundongos foram testados apenas uma vez. Antes de cada teste, a arena foi limpa com etanol a 70%. O índice de ansiedade foi calculado de acordo com Estrela et al. (2015) da seguinte forma: Índice de ansiedade = $1 - \frac{[\text{Tempo braços abertos} / \text{Duração do teste}] + [\text{entradas braços abertos} / \text{número total de entradas}]}{2}$. Além disso, avaliou-se a percentagem de tempo gasto nos braços abertos e fechados, já que este é considerado um parâmetro primário do LCE de acordo com Walf & Frye (2007).

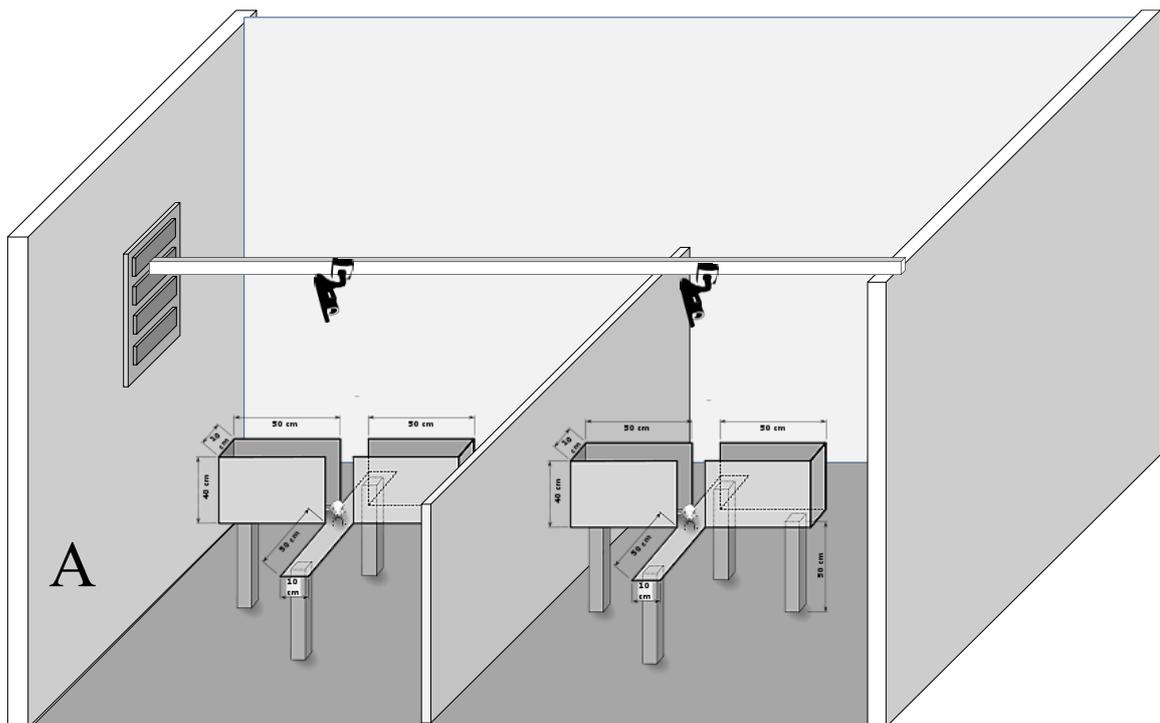




Figura 2. (A) Desenho esquemático que ilustra o labirinto em cruz elevado utilizado presente estudo e (B) imagem real do aparato utilizado para avaliação preditiva de ansiedade dos camundongos expostos ou não à efluente de curtume.

2.2.2. Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objeto foi realizado em uma caixa nas dimensões 30 cm x 20 cm x 13 cm, conforme modificado após Bevins & Besheer (2006). O teste foi dividido em duas sessões: uma sessão de treinamento, seguida de uma sessão de teste (1h após treinamento). Durante a sessão de treinamento, os animais foram expostos a dois objetos idênticos (em tamanho, forma e cor), definidos como objetos familiares (F1 e F2), durante 5 min (brinquedos Lego) (Figura 3A). Durante a sessão de teste, um objeto familiar foi substituído por um novo objeto (N) (1h após o treinamento, usamos um brinquedo Lego diferente daqueles utilizados na sessão anterior), para que os animais pudessem explorar um objeto familiar e um novo por 3 min (Figura 3B). No início de cada teste, os animais foram colocados na frente dos objetos, de frente para a parede, de acordo com Akkerman et al. (2012). O tempo gasto para explorar cada objeto foi registrado. Um desenho cruzado foi utilizado em todas as sessões de teste, de modo que os objetos novos e familiares foram colocados alternadamente, para excluir a preferência potencial por uma determinada localização espacial dos objetos na caixa. Considerou-se como exploração o cheiro dos

objetos ou o toque com as patas dianteiras quando o animal estava a uma distância igual ou inferior a 2 cm dos objetos (Ennaceur & Delacour, 1988; Rajagopal et al., 2014). O índice de reconhecimento para cada objeto foi calculado para cada animal, conforme descrito por Pietá-Dias et al. (2007), e expresso pela razão: $TOX / (TF + TN)$ [TOX = tempo gasto explorando o objeto familiar (F) ou novo (N); TF = tempo gasto explorando o objeto familiar; TN = tempo gasto explorando o novo objeto]. Entre as sessões, as caixas utilizadas nos testes foram limpas com álcool a 70%.

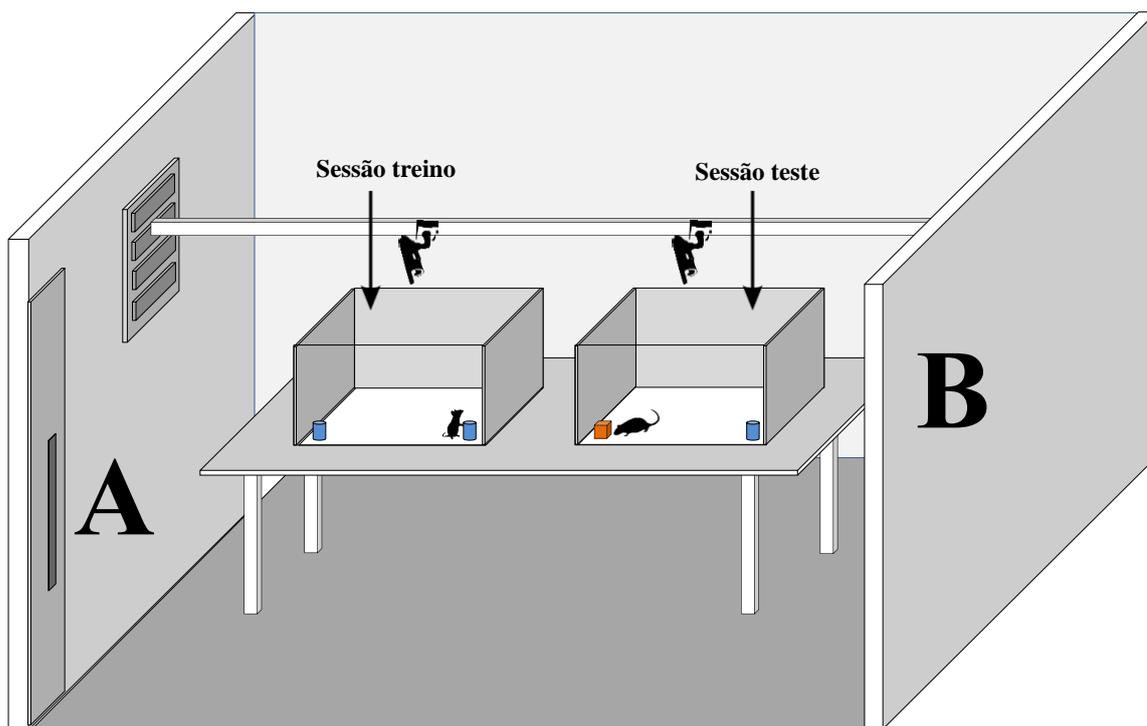


Figura 3. Desenho esquemático da sala de testes ilustrando os aparatos utilizados no teste de reconhecimento de objetos.

2.3. Análises estatísticas

Inicialmente, a normalidade residual dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett foi utilizado para verificar a homoscedasticidade residual. Os dados resultantes relativos aos parâmetros comportamentais (de LCE e testes de reconhecimento de objetos - especificamente os novos índices de reconhecimento de objetos) foram submetidos a *two-way* ANOVA com os fatores "linhagem" (camundongos C57Bl/6J e Swiss) (fator 1) e "tratamento" (efluente e sem efluente) (fator 2). Em caso de F significativo ($p < 0,05$), o pós-teste de Fisher LSD foi aplicado, a 5% de probabilidade. A fim de validar o teste de reconhecimento de objetos, foram analisados os dados relativos ao grupo de controle (camundongos C57Bl/6J e Swiss) e o índice de reconhecimento para cada objeto (N e F) dos grupos de controle (das duas linhagens de camundongos). Para isso, aplicamos o teste t de

Student com o ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações por pares. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* ASSISTAT, versão 7.7 (distribuição gratuita).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao teste do LCE, as análises estatísticas mostraram efeito do fator "linhagem" (fator 1) e do fator "tratamento" (fator 2) para todos os parâmetros analisados (porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, porcentagem de tempo gasto nos braços fechados e Índice de ansiedade), no entanto, sem uma interação entre os fatores (Figura 4). Nossos dados mostram que a exposição dérmica ao efluente de curtume causou um comportamento ansiogênico no grupo efluente, quando comparado ao grupo controle (sem contato direto com o xenobiótico).

A literatura é escassa em estudos envolvendo exposição dérmica de modelos experimentais (mamíferos) a efluente de curtumes, dificultando a comparação de resultados. No entanto, os metais pesados podem exercer seus efeitos agudos e crônicos na pele através de sinais de estresse, sugerindo que alguns metais podem ser absorvidos pela pele e apresentam efeitos prejudiciais. (Singh et al., 2011). Os resultados encontrados nas pesquisas sugerem, por exemplo, que os metais pesados reduziram o nível de fosforização da proteína de choque térmico 27 (HSP27), uma vez que a proporção de p-HSP27 e HSP27 é considerada um marcador sensível para avaliação do risco de irritação potencial da pele causada por produtos químicos e seus produtos (Zhang et al., 2010).

Nossos dados são semelhantes aos relatados por Siqueira et al. (2011), que estudaram machos de camundongos Swiss adultos. Os autores observaram que a exposição ao efluente de curtume não tratado a 1% (diluído em água) reduziu a porcentagem do tempo total gasto nos braços abertos, indicando um aumento no comportamento semelhante à ansiedade. Portanto, deve ser levado em consideração o modo de exposição usado por Siqueira et al. (2011), o qual foi diferente do utilizado no presente estudo.

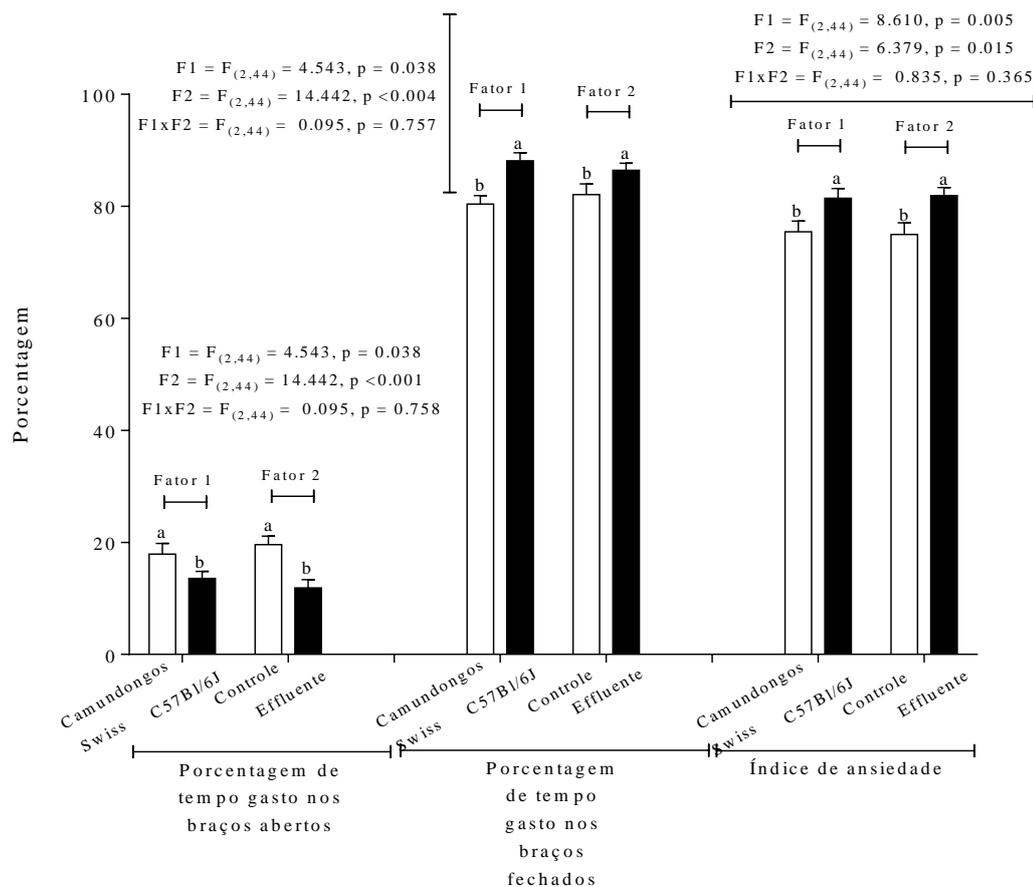


Figura 4. Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos, nos braços fechados e índice de ansiedade para camundongos Swiss e C56Bl/6J, expostos ou não ao efluente de curtume. Letras distintas indicam diferenças significativas. Os dados relativos aos parâmetros comportamentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com fatores "linhagens" (camundongos C57Bl/6J e Swiss) (fator 1) e "tratamento" (efluente e sem efluente) (fator 2). Em caso de F significativo ($p < 0,05$), o pós-teste de Fisher LSD foi aplicado a 5% de probabilidade.

Apesar das diferenças entre os estudos, ambos apontam para o potencial dano que os efluentes do curtume pode causar em circuitos neurológicos ligados à ansiedade. Os dados do presente estudo sugerem, em particular, que o comportamento ansiogênico observado nos animais expostos ao efluente de curtume está relacionado aos efeitos dos solventes neurotóxicos provenientes do poluente em questão. Sabe-se que vários sistemas de neurotransmissão estão envolvidos nos mecanismos neurobiológicos que regulam a ansiedade, promovendo ansiogênese ou ansiólise (Marsden et al., 1993; Nutt, 2000; Mathew et al., 2014). Entre os mecanismos existentes, a colecistoquinina, os aminoácidos excitatórios,

a serotonina e a noradrenalina são citados como sistemas ansiogênicos, como discutido por Kalueff (2007).

De acordo com Paladini et al. (1999), a maioria desses sistemas de neurotransmissão é controlada reciprocamente pelo principal sistema inibidor que opera no cérebro - o sistema GABAérgico, que é ativado pelo neurotransmissor do ácido γ -aminobutírico (GABA). O GABA é um neurotransmissor inibitório que regula a excitabilidade de praticamente todos os neurônios do sistema nervoso central, com implicações fisiológicas e fisiopatológicas em eventos normais e disfuncionais deste sistema (Kalueff, 2007). A ansiedade é uma das manifestações em que o sistema de neurotransmissão GABAérgico está envolvido, em particular o complexo receptor GABA-benzodiazepina (Wong & Snead, 2001). O presente estudo e o trabalho de Siqueira et al. (2011) não investigaram os mecanismos fisiológicos que podem explicar os efeitos ansiogênicos observados, mas eles apontam para o fato de que tanto a ingestão de água contaminada como o efluente de curtume, quanto a exposição dérmica a esses resíduos estão relacionadas a alterações do sistema nervoso central ligado à ansiedade.

Por outro lado, o maior índice de ansiedade observado nos camundongos da linhagem Swiss (Figura 4), quando comparado aos camundongos C57Bl/6J, pode estar relacionado ao desempenho dessas linhagens no teste LCE. Como mostrado por Griebel et al. (2000), existem diferenças relevantes em relação ao comportamento ansiogênico entre as linhagens de camundongos estudadas nos testes de ansiedade. Griebel et al. (2000) compararam os perfis comportamentais de nove linhagens de camundongos (BALB/c, C57Bl/6J, C3H, CBA, DBA/2, NMRI, NZB, SJL e Swiss) em dois modelos animais de ansiedade após a administração do benzodiazepina. Os testes utilizados foram o teste claro/escuro e o teste do LCE, ambos preditivos de ansiedade e sensíveis aos efeitos de ansiolíticos. No LCE, as linhagens SJL, NMRI, CBA e, em menor medida, as linhagem de camundongos C3H, mostraram níveis baixos de comportamentos ansiogênicos. Os níveis intermediários foram observados nas linhagens Swiss e BALB/c, e altos níveis de reatividade emocional foram observados em camundongos das linhagens C57Bl/6J, DBA/2 e NZB. Portanto, esses resultados corroboram os resultados do presente estudo e podem explicar a influência do fator 1 (linhagem) sobre nossos resultados e maior ansiedade nos camundongos C57Bl/6J.

Em relação ao teste de reconhecimento de objetos, os índices de reconhecimento relativos aos objetos familiares (F1 e F2), na sessão de treinamento dos animais do grupo controle (C57Bl/6J e camundongos Swiss), diferiram de zero e não mostraram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste t de Student (Figura 5). Este resultado

constitui um dos indicadores de validação do teste, uma vez que demonstram que a exploração aleatória dos objetos na sessão de treinamento resultou em uma exploração igual de ambos os objetos, além de excluir influência de preferência potencial por uma determinada localização espacial dos objetos colocados no caixa de teste. Por outro lado, os animais dos grupos controle (tanto da linhagem C57Bl/6J, quanto Swiss) apresentaram índices de reconhecimento mais altos para o novo objeto na sessão de teste realizada 1 hora após o treinamento, quando comparado aos índices do objeto familiar, o que indica sucesso na retenção de memória. Assim, esses dados também representam um indicador de validação do teste realizado (Figura 5).

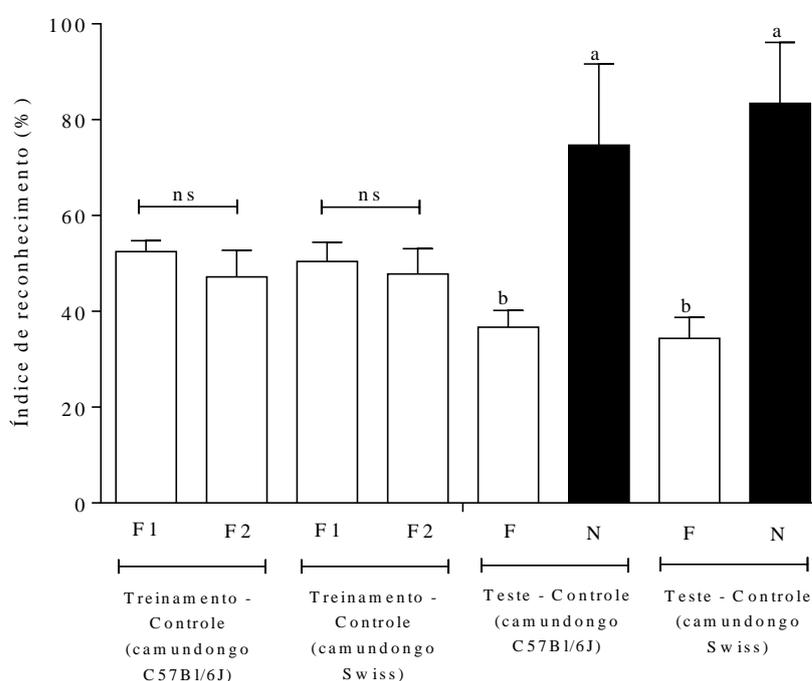


Figura 5. Índices de reconhecimento de objetos de camundongos C57Bl/6J e Swiss expostos ou não ao efluente de curtume após a sessão de treinamento, seguida de uma sessão teste (1h após treinamento). As barras indicam média + desvio padrão. F1: objeto familiar 1 da sessão de treinamento; F2: objeto familiar 2 da sessão de treinamento; F: objeto familiar da sessão de teste; N: novo objeto da sessão de teste. O teste t de Student com ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações em pares foi aplicado, considerando $\alpha = 0,05$.

Por outro lado, a análise estatística revelou efeito de apenas o "tratamento" (fator 2) sobre os resultados (Figura 6), indicando que os animais expostos ao efluente de curtumes obtiveram menores índices de reconhecimento de novos objetos, o que sugere déficit de memória e possível influência dos componentes do efluente de curtume na cognição animal.

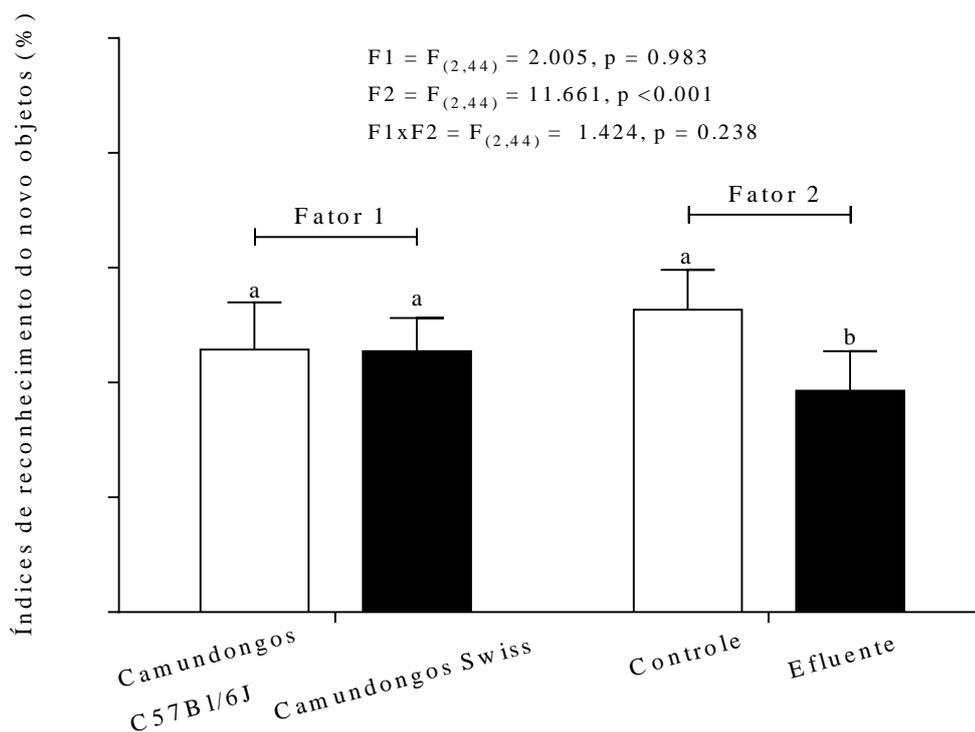


Figura 6. Novos índices de reconhecimento de objetos para (C57Bl/6J e camundongos Swiss) expostos ou não a efluentes de curtumes, calculados 1 hora após a sessão de treinamento do teste de reconhecimento de objeto. As barras indicam média + desvio padrão. Os dados foram submetidos à *two-way* ANOVA com fatores "linhagens" (camundongos C57Bl/6J e Swiss) (fator 1) e "tratamento" (efluente e sem efluente) (fator 2).

Mais uma vez, é importante considerar que nosso estudo constituiu o primeiro a submeter animais de laboratório a exposição dérmica a efluentes de curtume. Recentemente, demonstramos que a exposição ao efluente de curtume causou deficiência de memória em camundongos Swiss jovens, de forma similar em machos e fêmeas (Rabelo et al., 2016). Neste estudo, os índices de reconhecimento dos objetos novos foram menores em relação àqueles apresentados pelos animais não expostos ao poluente. Embora o mesmo efluente tenha sido utilizado no presente estudo e em Rabelo et al. (2016), as formas de exposição foram diferentes (oral (1% de efluente diluído em água) em Rabelo et al. (2016) e dérmica em nosso estudo).

Os efluentes de curtumes, em particular, possuem uma constituição química muito complexa e diversificada que pode variar entre distintas indústrias de curtimento (Shakir et al., 2012). Moysés (2014), por exemplo, ao analisar os efeitos da exposição *in vitro* ao efluente de curtume sobre a atividade de diferentes camundongos e enzimas de ratos e *Drosophila melanogaster*, identificou mais de 20 compostos químicos orgânicos no efluente. A variação química destes resíduos e a complexidade dos compostos estão relacionadas com diferentes métodos de tratamento utilizados nas indústrias de curtumes (Lofrano et al., 2013), como estes efluentes são armazenados, bem como a fase de bovino ocultar processamento a partir do qual os efluentes são produzidos (Shakir et al., 2012).

De qualquer forma, mesmo que análises detalhadas da composição orgânica do efluente não tenham sido realizadas no presente estudo e na maioria dos outros estudos (Siqueira et al., 2011, Moysés et al., 2014, Rabelo et al., 2016), o que torna difícil a compreensão dos mecanismos relacionados a deficiência de memória nos animais, acreditamos que os compostos orgânicos ou inorgânicos voláteis do efluente podem ter causado danos na produção/ação de neurotransmissores ou nos órgãos do sistema nervoso central relacionados à aprendizagem e processos de formação de memória de curto prazo.

Uma região do cérebro importante para reconhecimento de objetos é o hipocampo. De acordo com Broadbent et al. (2010), os danos nesta estrutura causam déficit significativo na retenção de memória. O hipocampo é fundamental como um detector de novidades, graças ao seu papel na comparação de informações previamente armazenadas com novos estímulos de informação a serem aprendidos e armazenados de uma situação particularmente nova (Clarke et al., 2010). Assim, essas evidências reforçam a hipótese de que o comprometimento da memória de camundongos expostos ao efluente de curtume (Figura 6) pode ser associado ao dano ao hipocampo causado por um ou mais constituintes do efluentes. Estudos que mostram a influência de gases voláteis orgânicos e/ou inorgânicos nos órgãos do sistema nervoso central também apontam para essa hipótese (Bolla, 1991; Otto et al., 1992; Miekisch et al., 2004).

Por outro lado, vale ressaltar que esses animais, ao se limpar durante o período de exposição, também podem ter ingerido quantidades relevantes do poluente. Entre os elementos químicos presentes no efluente de curtume, os efeitos neurotóxicos do cádmio em diferentes órgãos e tecidos são conhecidos em roedores e humanos (Méndez-Armenta & Ríos, 2006), levando a dano cerebral em camundongos (Yang et al., 2015), o que também poderia explicar o comportamento ansiogênico e o déficit de memória observado nos animais

expostos ao efluente da curtume. Haider et al. (2015), estudando os efeitos neurotóxicos do cloreto de cádmio em três doses diferentes e utilizando diferentes modelos comportamentais, observaram que a administração aguda de cádmio proporcionou aumento (dose-dependente) da ansiedade em camundongos, em comparação aos do grupo controle. Além disso, o aprendizado e a memória avaliados pelo teste do Labirinto Aquático de Morris mostraram comprometimento dose-dependente da função cognitiva em camundongos tratados com cádmio em comparação com camundongos controle. Outro elemento importante presente no efluente é o níquel, cuja exposição tem sido associada a uma variedade de efeitos adversos no sistema nervoso (Gordon & Stead, 1986; Marchetti & Gavazzo, 2003; Liapi et al., 2011). He et al. (2013), investigando os estados de metabolismo aeróbio no córtex cerebral de camundongos quando as mudanças neurocomportamentais induzidas pelo níquel, descobriram que a exposição ao níquel causou déficits em memória espacial e que o níquel foi depositado no córtex cerebral. Assim, é possível que a ingestão de níquel durante a limpeza da pele dos animais também possa ser responsável pelos resultados obtidos neste estudo.

4. CONCLUSÃO

Nossos dados confirmam a hipótese de que a exposição dérmica ao efluente de curtumes promove alterações comportamentais preditivas de ansiedade e de déficit de memória de reconhecimento de objetos (de curto prazo) em camundongos. É fortemente sugerido que os mecanismos através dos quais esses poluentes causaram mudanças neurocomportamentais sejam investigados, considerando o pioneirismo do nosso.

5. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Este trabalho foi publicado na revista *Chemosphere* (estrato A1 no Qualis-CAPES e de fator de impacto de 4,208 (<https://www.journals.elsevier.com/chemosphere/>)). A versão na íntegra do referido artigo é apresentada no Anexo I.

6. REFERÊNCIAS

Akkerman S, Blokland A, Reneerkens O, van Goethem NP, Bollen E, Gijssels HJ, Lieben CK, Steinbusch HW, Prickaerts J. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioural Brain Research*, 232(2): 335-347, 2012.

- American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. New York: APHA, AWWA, WPCR, 1997. 1194 p.
- Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols*, 1: 1306-1311, 2006.
- Bolla KI. Neuropsychological assessment for detecting adverse effects of volatile organic compounds on the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 1991 Nov; 95: 93–98.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17: 5-11, 2010.
- Chandrasekaran V, Dilara K, Padmavathi R. Pulmonary functions in tannery workers – A cross sectional study. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 58: 206-210, 2014.
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. Plastic modifications induced by object recognition. *PNAS*, 107: 2652-2657, 2010.
- Costantini AS, Paci E, Miligi L, Buiatti E, Martelli C & Lenzi S. Cancer mortality among workers in the Tuscan tanning industry. *British journal of industrial medicine*, 46(6): 384-388, 1989.
- Cuberos E, Rodriguez AI, Pietro E. Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2): 278-289, 2009.
- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31: 47-59, 1988.
- Estrela DC, Silva WAM, Guimarães ATB, Mendes BO, Castro ALS, Torres ILS, Malafaia G. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiology & Behavior*, 151: 252-263, 2015.
- Freitas TCM, Melnikov P. O uso e os impactos da reciclagem de cromo em indústrias de curtume em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2(4): 305-310, 2006.

- Gödecke MV, Rodrigues MAS, Naime RH. Resíduos de curtume: estudo das tendências de pesquisa. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 7: 1357-1378, 2012.
- Gordon CJ, Stead AG. Effect of nickel and cadmium chloride on autonomic and behavioral thermoregulation in mice. *Neurotoxicology*, 7: 97-106, 1986.
- Gowd SS & Govil PK. "Distribution of heavy metals in surface water of Ranipet industrial area in Tamil Nadu, India." *Environmental monitoring and assessment* 136 (1-3): 197-207, 2008.
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology*, 148(2): 164-170, 2000.
- Guimarães ATB, Ferreira RO, Silva WAM, Castro ALS, Malafaia G. Parental exposure to tannery effluente cause anxiety-and-depression-like behaviors in mice offspring. *JSM Anxiety Depress*. 2016; 1: 1005.
- Haider S, Anis L, Batool Z, Sajid I, Naqvi F, Khaliq S, Ahmed S. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. *Metab Brain Dis*. 2015 Feb;30(1):83-92. doi: 10.1007/s11011-014-9578-4. Epub 2014 Jul 1.
- He MD, Xu SC, Zhang X, Wang Y, Xiong JC, Zhang X, Lu YH, Zhang L, Yu ZP, Zhou Z. Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changes induced by nickel in mice. *NeuroToxicology*, 38: 9-16, 2013.
- Kalueff AV. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behaviour. *Neural Plasticity*, Article ID 78171: 12, 2007.
- Khan DA, Mushtaq S, Khan FA, Khan MQ. Toxic effects of chromium on tannery workers at Sialkot (Pakistan). *Toxicology and Industrial Health*, 29:209-215, 2013.
- Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *Journal Visualized Experiments*, 22: 1-3, 2008.
- Liapi C, Zarros A, Theocharis S, Voumvourakis K, Anifantaki F, Gkrouzman E, et al. Short-term exposure to nickel alters the adult rat brain antioxidant status and

the activities of crucial membrane-bound enzymes: neuroprotection by L-cysteine. *Biological Trace Element Research*, 143: 1673-1681, 2011.

Lofrano G, Meriç S, Zengin GE, Orhon D. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: a review. *Science of the Total Environment*, 461-462: 265-281, 2013.

Marchetti C, Gavazzo P. Subunit-dependent effects of nickel on NMDA receptor channels. *Molecular Brain Research*, 117:139-44, 2003.

Marsden CA, Bickerdike M, Cadogan AK, Wright I, Rex A, Fink H. "Serotonergic mechanisms and animal models of anxiety." *colloques-institut national de la sante et de la recherche medicale colloques et seminaires: 75-75*, 1993.

Mathew SJ, Jeremy DC, Jack MG. "Neurobiological mechanisms of social anxiety disorder." *American Journal of Psychiatry*, 158: 1558-1567, 2014

Méndez-Armenta M, Ríos C. "Cadmium neurotoxicity," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3): 350-358, 2007.

Miekisch W1, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta*. 2004 Sep;347(1-2):25-39.

Misra V, Pandey SD. Hazardous waste, impact on health and environment for development of better waste management strategies in future in India. *Environ Int*. 2005 Apr;31(3):417-31.

Moysés FS, Bertoldi K, Spindler C, Sanches EF, Elsner VR, Rodrigues MAS, Siqueira IR. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & Behavior*, 129:160-166, 2014.

Moysés FS. Efeito da exposição ao efluente de curtume em diferentes modelos animais. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Nutt, DJ. "Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. "The Journal of clinical psychiatry, 62: 22-7, 2000.

- Otto DA, Hudnell HK, House DE, Mølhave L, Counts W. Exposure of humans to a volatile organic mixture. I. Behavioral assessment. *Arch Environ Health*. 1992 Jan-Feb;47(1):23-30.
- Paladini AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina JH. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5): 519-26, 1999.
- Piéta-Dias C, De Lima MM, Presti TJ, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, Schröder N. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146(4), 1719-1725, 2007.
- Rabelo LM, Silva BC, Almeida SF, Silva WAM, Mendes BO, Guimarães ATB, Silva AR, Castro ALS, Rodrigues ASL, Malafaia G. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and Teratology*, 55: 45-49, 2016.
- Rajagopal L, Massey BW, Huang M, Oyamada Y, Meltzer HY. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in Schizophrenia. *Current Pharmaceutical Design*, 20: 1-11, 2014.
- Rastogi SK, Amit P, Sachin T. "Occupational health risks among the workers employed in leather tanneries at Kanpur. " *Indian journal of occupational and environmental medicine* 12(3): 132, 2008.
- Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21: 801-810, 1997.
- Salazar EMG. Economía ecológica frente a economía industrial. El caso de la industria de la curtiduría em México. *Argumentos*, 21(56): 55-71, 2008.
- Saner G, Yüzbaşıyan V, Çigdem S. Hair chromium concentration and chromium excretion in tannery workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 41: 263-266, 1984.
- Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvé S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated waste waters and natural and drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 117: 675-684, 2009.

- Shahzad K, Akhtar S, Mahmud S. Prevalence and determinants of asthma in adult male leather tannery workers in Karachi, Pakistan: a cross sectional study. *BMC Public Health*, 6(1), 292, 2006.
- Shakir L, Ejaz S, Ashraf M, Qureshi NA, Anjum AA, Iltaf I, Javeed A. Ecotoxicological risks associated with tannery effluent wastewater. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 180-191, 2012.
- Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J Pharmacol*. 2011 May;43(3):246-53. doi: 10.4103/0253-7613.81505.
- Siqueira IR, Vanzella C, Bianchetti P, Rodrigues MAS, Stülp S. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: the effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicology and Teratology*, 33: 481-484, 2011.
- Souza JM, Silva WAM, Mendes BO, Guimarães ATB, Almeida SF, Estrela DC, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia G. Neurobehavioral evaluation of C57Bl/6J mice submitted to tannery effluents intake. *JSM Anxiety Depress*. 2016; 1: 1006.
- Veyalkin I, Gerein V. Retrospective cohort study of cancer mortality at the Minsk leather tannery. *Industrial Health*, 44:69-74, 2006.
- Veyalkin IV, Alexander AM. "Proportionate cancer mortality among workers in the Belarussian tanning industry." *American journal of industrial medicine* 44 (6): 637-642, 2003.
- Zhang Q, Zhang L, Xiao X, Su Z, Zou P, Hu H, et al. Heavy metals chromium and neodymium reduced phosphorylation level of heat shock protein 27 in human keratinocytes. *Toxico. In Vitro*. 2010;24:1098–1104. [PubMed]
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2: 322-8, 2007.
- Wong C, O Carter S. "The GABAA Receptor: Subunit-Dependent Functions and Absence Seizures." *Epilepsy Currents*. Sep; 1(1): 1–5, 2001.
- Yang XF, Fan GY, Liu DY, Zhang HT, Xu ZY, Ge YM, Wang ZL. Effect of cadmium exposure on the histopathology of cerebral cortex in juvenile mice. *Biological Trace Element Research*, 165: 167-172, 2015.