

Efeito da paisagem transformada na frequência de dano genotóxico e mutagênico em morcegos

Bolsas Funbio - Conservando o Futuro: **Doutorado** (Eixo temático: Conservação, manejo e uso sustentável de fauna e flora)

Universidade Federal de Goiás, campus Samambaia, Goiânia, Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

Discente:

- **Marcelino Benvindo de Souza**
- Titulação: Doutorando
- Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/4364084973977142>
- Laboratório de Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, ICB I - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. CEP: 74690-900, Brasil

Orientador do Projeto

- **Daniela de Melo e Silva**
- Titulação: Dra
- Cargo: Professora
- Tipo de vínculo com a IES: Professora/Pesquisadora
- Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/9895211901348365>
- Endereço profissional: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. Estrada do Campus, s/n, Instituto de Ciências Biológicas 1, Departamento de Genética, Campus Samambaia – UFG. CEP: 74690900 - Goiânia, GO - Brasil

Introdução e Justificativa

O impacto das mudanças na paisagem natural como a perda e fragmentação de habitat e a expansão da agricultura, são as principais ameaças à conservação da biodiversidade (Trabaquini et al., 2017; Rocha et al., 2018). Com um aumento sem precedentes no Cerrado, a soja, por exemplo, envolve o uso de vários pesticidas para proteção de cultivos e controle de pragas e o Brasil está em segundo lugar na escala global nessa produção (Martins et al., 2018). No mesmo segmento, a cana-de-açúcar é cultivada em muitos estados brasileiros, sendo a principal cultura em termos de produção de biomassa bruta e a terceira em termos de área, após a soja e o milho (Bellezoni et al., 2018).

Além dos poluentes agrícolas, nas últimas décadas a contaminação por metais pesados tornou-se um dos problemas mais desafiadores no ambiente natural e para a saúde humana (Song et al., 2014), devido à toxicidade, persistência e bioacumulação (Resongles et al., 2014). O Níquel, por exemplo é um metal pesado, esse pode ser liberado naturalmente ao ambiente ou por atividades industriais (Stannard et al., 2017). Esse metal já foi reportado entre os onze elementos químicos de maior preocupação para a fauna silvestre (Zukal et al., 2015). Por ser um elemento tóxico, a exposição ocorre principalmente por inalação e ingestão (Stannard et al., 2017).

Neste sentido, a seleção de espécimes bioindicadoras é essencial para demonstrar a qualidade ambiental e gerar viés para a sustentabilidade dos ecossistemas naturais. Os morcegos, organismos bioindicadores, há quase 50 anos têm sido vítimas de agentes químicos de natureza agrícola, industriais e urbanas em diversas partes do mundo (Bayat et al., 2014; Zukal et al., 2015). Os compostos tóxicos podem alterar a integridade do DNA dos organismos (Martínez-Valenzuela et al., 2017). O DNA quando danificado leva a implicações dentre as quais estão à interferência na longevidade dos organismos (Kurelec, 1993), comprometimento do seu crescimento, malformações embrionárias, prejuízos na resposta imunológica e na redução da fecundidade, além disso, aumenta a suscetibilidade a doenças, prejuízos na adaptação, e finalmente a extinção de espécies (Kurelec, 1993; Theodorakis, 2001).

Assim, cada vez mais surge à necessidade de uso de biomarcadores menos invasivos e de baixo custo, como o Ensaio Cometa em sangue periférico e o teste de Micronúcleo (MN) em células esfoliadas de mucosa bucal. O ensaio cometa aplicado em morcegos insetívoros de área com atividade de mineração no Sul do Brasil demonstrou sensibilidade na detecção de dano no DNA quando comparado a áreas longe da extração de metais pesados (Zocche et al.,

2010). Enquanto outro estudo mais recente demonstrou dano no DNA de morcegos frugívoros em ambiente urbano e área agrícola no cerrado Goiano (Assunção et al., 2016). O teste de MN normalmente utilizado em paralelo com o ensaio cometa, é reconhecido em todo o mundo (Benvindo-Souza et al., 2017), e pode ser aplicado em qualquer célula em divisão. Os micronúcleos são anomalias estruturais em células eucarióticas (Li et al., 2018). Originam-se de fragmentos cromossômicos, ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal das células filhas durante a divisão celular (mitose) provenientes de fatores físicos e químicos (Li et al., 2018).

Desta forma, na literatura não foi encontrado nenhum outro estudo descrevendo dano celular em células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, com exceção da adaptação recente do teste de MN para a quiropteroфаuna (Benvindo-Souza 2019a; 2019b). Este estudo busca fornecer novos dados *in situ* para uma avaliação de risco de pesticidas e metais em células esfoliadas de mucosa bucal e sangue periférico de morcegos, contribuindo para o desenvolvimento de agricultura sustentável e alerta para riscos de traços de metais disponível em ambiente antropizado.

Objetivos

Objetivo geral

O presente estudo busca investigar os efeitos genotóxicos em sangue periférico e células esfoliadas de mucosa bucal de morcegos, para avaliar a contaminação por pesticidas e metais pesados resultante de paisagens transformada no cerrado brasileiro.

Objetivos específicos

Capítulo 1. Analisar se espécies de morcegos de área agrícola de cultivo anual (soja/milho) e semi-perene (cana-de-açúcar) respondem da mesma maneira à perturbação ambiental por meio de dano genotóxico e mutagênico (frequência de lesão no DNA e formação de micronúcleo e anormalidades nucleares (células binucleadas, células com broto nuclear, células cariorréxi, células com cromatina condensada e células anucleadas)). Além disso, será avaliado se existe relação entre a taxa de dano genotóxico em atributos biológicos como, guildas tróficas, sexo e índice de massa corporal de morcegos neotropicais;

Capítulo 2. Analisar se morcegos coletados em área de mineração de Níquel respondem com maior frequência de dano genotóxico e mutagênico quando comparados a

espécies obtidas em Unidade de Conservação. Em conjunto com essa investigação, o sexo e idade dos morcegos serão correlacionados com a frequência de danos;

Capítulo 3. Avaliar se atributos de paisagem (ou seja, Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI), porcentagem de vegetação nativa na paisagem, densidade média das bordas das manchas e a média do tamanho dos fragmentos (ha)) influenciam a frequência de micronúcleos e demais anormalidades nucleares em morcegos.

Metodologia

Área de estudo e captura de animais

Este estudo será realizado nos estados de Goiás e Tocantins, bioma Cerrado. Os animais serão amostrados em fragmentos florestais com influência de matrizes agrícolas de soja/milho em Rio Verde, um dos dez municípios que mais consomem pesticidas no Brasil (Pignati et al., 2017). Para a investigação em culturas de cana-de-açúcar, amostragens serão realizadas em Paraúna, Goiás em fragmentos florestais em área da Usina Nova Gália. Ainda no estado de Goiás, outra amostragem ocorrerá em uma área de mineração, no município de Niquelândia, mesorregião do Norte Goiano. Finalmente, a critério de comparar os animais dessas áreas antropizadas, um ambiente controle em Goiás (Unidade de Conservação, Parque Nacional das Emas) será investigado. Já as investigações no Tocantins se concentrarão no município de Palmas em uma colônia com milhares de indivíduos na Ponte Fernando Henrique Cardoso (Benvindo-Souza et al., 2019a; 2019b) e amostras em fragmentos florestais, abrigos e fragmentos circundados por lavoura na região.

Em todos os ambientes (cultura anual, semi-perene, mineração e controle), a seleção das espécies para análises será baseada na abundância geral encontrada nos sítios conforme o estudo de Zocche et al. (2010) e Vadespino & Sosa (2017). Os animais serão organizados por guildas tróficas (quando possível, os biomarcadores serão aplicados em até 20 indivíduos por espécie/guilda: insetívoros, frugívoros, onívoros, nectarívoros e psívoros). Os morcegos serão capturados com 10 redes de neblina 12x2,5 metros com aproximadamente 10 noites em cada ambiente (agrícola, mineração e Unidade de Conservação) em 2020. Os animais coletados serão acondicionados em sacos de algodão e passarão por biometria a critério de identificação conforme Reis et al. (2013). Um indivíduo de cada espécie que gerar dúvidas quanto à identificação, será eutanasiado e depositado na coleção científica do Laboratório de Biologia Animal (LABAN) do IFGoiano, campus Rio Verde. Vale sublinhar que não serão eutanasiados espécimes como aquelas já obtidas no projeto anterior (Benvindo-Souza et al.,

2019a; 2019b).

Análise da água

Em cada ambiente, subamostras de água serão obtidas em poças temporárias, lagoas permanentes, veredas e córregos e armazenadas em recipientes de acordo com os sítios (cultura anual, semi-perene, mineração e controle). As amostras serão preservadas a uma temperatura de 4°C e encaminhadas para laboratório especializado em análise de detecção de pesticidas e metais pesados.

Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo

Após a captura dos espécimes, o ensaio cometa será aplicado em sangue periférico (Figura 1), de acordo com o protocolo de Singh (1988) com modificações (Zocche et al., 2010; Assunção, 2016). Uma amostra de 0,5 ml de sangue será obtida da veia propatagio com seringas heparinizadas e dispensado em tubos eppendorffs (heparinizados) e acondicionados em recipientes térmicos com gelo para preservação conforme Assunção (2016). Duas lâminas por animal serão preparadas e será feita a leitura de 100 células com o auxílio do programa “Comet Imager” versão 2.2. Os parâmetros a serem analisados para dano genômicos serão de acordo com Assunção (2016) e Carvalho et al. (2018) sendo, comprimento da cauda (CC), porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e momento da cauda de Olive (MCO).

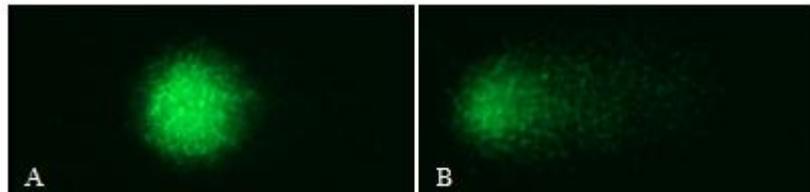


Figura 1. Ensaio cometa em sangue periférico. (A) núcleo íntegro e (B) com dano no DNA.

Em seguida, as células bucais dos morcegos serão obtidas por raspagem com auxílio de palinete de hastes flexíveis com pontas de algodão, o qual será levemente friccionado contra a região da mucosa jugal direita e esquerda, assoalho e gengivas. Células da mucosa oral serão transferidas para lâminas de vidro limpas (quatro lâminas por indivíduo) contendo previamente uma gota de solução fisiológica (NaCl a 0,9%). Em seguida os animais serão soltos no mesmo local de coleta. O parâmetros do teste de micronúcleo serão baseados nos relatórios de Bolognesi et al. (2013), Benvindo-Souza et al. (2019a; 2019b) (Figura 2).

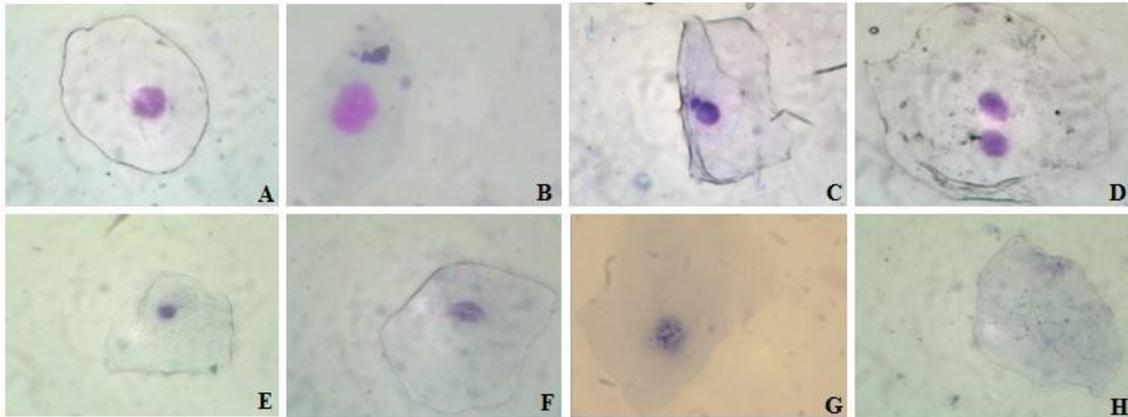


Figura 2. Fotomicrografias de células esfoliadas da mucosa bucal de morcegos, coradas com Giemsa e ampliadas 1000x. (A) Célula típica, (B) célula com micronúcleo; (C) botão nuclear; (D) célula binucleada; (E) célula picnótica; (F) célula com cromatina condensada; (G) célula cariorrêxis; e (H) cariólise. Imagem obtidas de [Benvindo-Souza et al., 2019a].

Análise estatística

Baseando em Zocche et al. (2010) e Vadespino & Sosa (2017) a análise estatística ocorrerá para as espécies mais abundantes. As contagens de MNs, ANs e os parâmetros do ensaio cometa, CC, %DNA e COM serão expressas como média \pm erro padrão. Todos os dados coletados serão submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido pelo teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Os dados poderão ser transformados em log (x) para atender à homogeneidade da variância e submetidos à análise de variância (ANOVA) com o projeto fatorial, usando os fatores (variável dependente: micronúcleos ou parâmetros do cometa: CC, %DNA ou MCO) e variável preditora (sítios (pontos amostrais), guildas tróficas e sexo), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Em situações em que os dados forem não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas seguido do teste *post hoc* de Dunn será executado. Uma correlação de ordem de Pearson (dados paramétricos) ou Spearman (não paramétricos) será realizada para estimar se há uma correlação significativa entre as frequências de MN e cada anormalidade nuclear conforme Quero et al. (2016). Em todos os casos, o nível de significância selecionado será de $p < 0,05$.

Para verificar se existe alguma relação entre atributos de paisagem e a frequência de MN será utilizada uma análise de variância (ANOVA), onde as réplicas serão a frequência de MN (variável resposta) para cada indivíduo em cada ponto, e as variáveis explicativas serão as métricas de paisagem (NDVI, MDB, %CN e TMF).

Atividades previstas

- Amostragem da quiropterofauna
- Análise de micronúcleo e outras anormalidades nucleares
- Análise de dano no DNA em sangue total de morcegos (ensaio cometa)
- Escrita científica
- Submissão a periódicos
- Qualificação da tese
- Defesa da tese

Detalhamento da infraestrutura física e tecnológica a ser utilizada

- Laboratório de Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, ICB I - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
 - O laboratório possui infraestrutura física e tecnológica com experiência na execução do ensaio cometa e teste de micronúcleo (Possuindo equipamentos básicos como, Micro-ondas, Agitador magnético com bailarina, Geladeira, Cuba de Eletroforese, Microscópios de Fluorescência e Microscópio óptico). Dessa forma, uma série de estudos tem sido publicada em revistas nacionais e internacionais (Franco et al., 2016; Gonçalves et al., 2017a, 2017b; Carvalho et al., 2018; Gonçalves et al., 2019).

Cronograma de Execução

Atividades DOUTORADO/trimestre	2019				2020				2021				2022			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Levantamento Bibliográfico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Realização de disciplinas	x	x	x	x	x	x	x	x								
Coletas de dados					x	x	x	x								
Análise do material					x	x	x	x								
Análises estatísticas/escrita científica							x	x	x							
Exame de qualificação*											x		x			
Defesa da Tese																x

Orçamento

Item	Quant.	Un.	Descrição	Val. Unit.	Val. Total
1	40	CX	Lamínula 24X60MM C/ 100 Unds	6,70	268,00

2	40	CX	Lâmina microscopia 26x76mm ponta fosca	4,00	160,00
3	2	FR	Corante Giemsa (1000ml)	45,54	91,08
4	4	FR	Metanol (1L)	59,70	238,80
5	2	FR	Formaldeído 37% PA ACS (1000 ml)	15,00	30,00
6	3	CX	Luvas para procedimento não cirúrgico com pó (caixa com 100 unidades)	20,00	60,00
7	5	CX	Seringas hipodérmicas convencionais com agulha (100 unidades)	31,06	155,30
8	10	CX	Porta lâminas em ABS 100 lugares, cinza	16,00	160,00
9	04	KG	Hidróxido de sódio, micropérolas	30,00	120,00
10	05	KG	Agarose padrão	12,00	60,00
11	05	KG	Agarose de baixo ponto de fusão	28,00	140,00
12	05	KG	Laurilsarcosinato de sódio	15,00	75,00
13	03	UN	Lâmpada HBO, 300 horas para análises do cometa	28,00	84,00
14	1	UN	Paquímetro digital	149,76	149,76
15	2	UN	Balança Pesola linha Light-Line (capacidade de 10g e de 500g)	272,33	544,66
16	20	UN	Rede de neblina	120,00	2,400.00
17	22	UN	Hastes (suporte para fixação)	8,00	176,00
18	50	UN	Saco de algodão (para os animais)	5,00	250,00
19	8	UN	Análise da água nos sítios de coleta	570,00	4,560.00
Total 1					R\$ 9,722.60

CX = caixa, FR = frequência, KG = quilograma, UN = unidade

Item	Quant.	Descrição	Val. Unit.	Val. Total
1	33 dias	Alimentação (lanche, almoço e jantar) durante expedição ao campo para 4 membros	200,00	6,600.00
2	33 dias	Aluguel de veículo (4x4)	264,00	8,976.00
3	30 dias	Hospedagem para estudo de campo	100,00	3,000.00
4	2,622 L	Combustível (litros/diesel)	3,70	9,701.40
Total 2				R\$ 28,277.40

L = litros

Total dos orçamentos	
Total 1: R\$ 9,722.60 + Total 2: R\$ 28,277.40	R\$ 38,000.00

Resultados esperados e impactos

Esperamos detectar espécimes sentinelas de paisagens perturbadas pela agricultura e mineração. Assim, espera-se que animais em área de soja e cana-de-açúcar apresentem maior

frequência de dano genotóxico e mutagênico quando comparado à área de referência (controle) devido a possíveis presenças de agrotóxicos. Na mesma temática avaliaremos animais em área de mineração em relação a aqueles de área controle. Nossos dados servirão de diagnose da saúde dos ambientes em prol de medidas da conservação da biodiversidade. Tendo em vista que estamos unindo os dois biomarcadores (teste de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal e ensaio cometa em sangue total) pela primeira vez em mamíferos selvagens, nossos dados terão forte interesse pela comunidade científica nacional e internacional. Concomitantemente, além do apelo pela conservação da fauna selvagem, o projeto visa a formação de recursos humanos.

Referências bibliográficas

- Assunção, D (2016). Avaliação do dano genético em células sanguíneas de quirópteros de áreas urbanas e não urbanas. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5959>
- Bayat S, Geiser F, Kristiansen P, Wilson SC (2014) Organic contaminants in bats: trends and new issues. *Environment International*, 63:40-52
- Bellezoni RA, Sharma D, Villela AA, Pereira AO (2017) Water-energy-food nexus of sugarcane ethanol production in the state of Goiás, Brazil: An analysis with regional input-output matrix. *Biomass & Bioenergy*, 115:108-119
- Benvindo-Souza M, Assis RA, Oliveira EAS, Borges RE, Santos LR S (2017) The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:27724-27730
- Benvindo-Souza, M, Borges, RE, Pacheco, SM, Santos, LRD (2019a) Genotoxicological analyses of insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera) in central Brazil: The oral epithelium as an indicator of environmental quality. *Environmental Pollution*, 245:504-509. doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.015
- Benvindo-Souza, M, Borges, RE, Pacheco, SM, Santos, LRS (2019b) Micronucleus and other nuclear abnormalities in exfoliated cells of buccal mucosa of bats at different trophic levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172: 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.051>
- Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyanyan 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
- Carvalho WF, Franco FC, Godoy FR, Folador D, Avelar JB, Nomura F, da Cruz AD, Sabóia-Morais SMT, Bastos RP, Silva DM (2018) Evaluation of Genotoxic and Mutagenic Effects of Glyphosate Roundup Original in Peters, 1872 Tadpoles. *Journal of Herpetology* (online), 13:220-229
- Franco FC, Alves, AA, Godoy FR, Avelar JB, Rodrigues DD, Pedroso TMA, CRUZ AD, NOMURA F, SILVA DM (2016) Evaluating genotoxic risks in Brazilian public health agents occupationally exposed to pesticides: a multi-biomarker approach. *Environmental Science and Pollution Research International*, 1:1-15
- Gonçalves MW, Campos, CBM, Godoy FR, Gambale PG, Nunes HF, Nomura F, Bastos RP, Cruz AD, Silva DM (2019) Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1:1-12
- Gonçalves MW, Gambale PG, Godoy FR Alves AA, Rezende PA, Cruz AD, Maciel NM, Nomura F, Bastos RP, Júnior PM, Silva DM (2017a) The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. *Zoologia*, 34:1-8
- Gonçalves MW, Campos CBM, Batista VG, Cruz AD, Junior, PM, Bastos RP, Silva, DM (2017b) Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere*, 182:730-737
- Kurelec B (1993) The genetic disease syndrome, *Mar. Environ. Res.* 35:341-348
- Li G, Yang P, Hao S, Hu W, Liang C, Zou BS (2018) Buccal mucosa cell damage in individuals following dental X-ray examinations. *Scientific Reports*, 8:2509
- Martins EH; Vilela AP, Mendes RF, Mendes LM, Vaz LEVDB, Guimaraes JB (2018) Soybean waste in particleboard production. *Ciencia e Agrotecnologia*, 42:186-194
- Martínez-Valenzuela C, Waliszewski SM, Amador-Muñoz O, Meza E, Calderón-Segura ME, Zenteno E, Huichapan-Martínez J, Caba M, Félix-Gastélum R, Longoria-Espinoza R (2017) Aerial pesticide application causes DNA damage in pilots from Sinaloa, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:2412-2420
- Pignati AW, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, Pignatti MG (2017) Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22:10
- Quero AAM, Ferre DM, Zarco A, Cuervo PF, Gorla NBM (2016)

- Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte de sert, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:25224-25231
- Reis, N.R., Fregonezi, M.N., Peracchi, A. L., Shibatta, O.A.(2013) *Morcegos do Brasil: Guia de campo*. Rio de Janeiro: Editora Technical Books
- Resongles E, Casiot C, Freydier R, Dezileau L, Viers J, Elbaz-Poulichet F (2014) Persisting impact of historical mining activity to metal (Pb, Zn, Cd, Tl, Hg) and metalloid (As, Sb) enrichment in sediments of the Gardon River, Southern France. *Sci Total Environ* 481:509-521
- Rocha EC, Brito D, Silva PM, Silva J, Bernardo PVS, Juen L (2018) Effects of habitat fragmentation on the persistence of medium and large mammal species in the Brazilian Savanna of Goiás State. *Biota Neotropica*. 18:e20170483
- Song Y, Choi MS, Lee JY, Jang DJ (2014) Regional background concentrations of heavy metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Pb) in coastal sediments of the South Sea of Korea. *Sci Total Environ* 482:80-91
- Shaik NA, Shaik JP, Ali A, Imran A, Rao DK (2010) Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination. *Food and Chemical Toxicology*, 48:3432-3435
- Stannard L, Doak SH, Doherty A, Jenkins GJ (2017) Is Nickel Chloride really a Non-Genotoxic Carcinogen? *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 121:10-15
- Theodorakis CW (2001) Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment, *Ecotoxicology* 10:245-256
- Trabaquini K, Galvao LS, Formaggio AR, de Aragao LEOEC (2017) Soil, land use time, and sustainable intensification of agriculture in the Brazilian Cerrado region. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189:2
- 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
- Zocche, JJ, Leffa, DD, Damiani, AP, Carvalho, F, Mendonca, RA, Dos Santos, CEI, Bouffleur, LA, Dias, JF, Andrade, VM (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