

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/07/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriel da Cunha Canevari

Efeitos do Fipronil sobre a sobrevivência e aspectos morfofuncionais da tireoide e suas consequências sobre a metamorfose, morfologia óssea e genotoxicidade em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* (Anura).

São José do Rio Preto
2022

Gabriel da Cunha Canevari

Efeitos do Fipronil sobre a sobrevivência e aspectos morfofuncionais da tireoide e suas consequências sobre a metamorfose, morfologia óssea e genotoxicidade em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* (Anura).

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto
2022

C221e

Canevari, Gabriel da Cunha

Efeitos do Fipronil sobre a sobrevivência e aspectos morfofuncionais da tireoide e suas consequências sobre a metamorfose, morfologia óssea e genotoxicidade em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* (Anura). / Gabriel da Cunha Canevari. -- São José do Rio Preto, 2022

74 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Classius de Oliveira

1. Ecotoxicologia. 2. Anura. 3. Desenvolvimento. 4. Sistema esquelético. 5. Biomarcadores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriel da Cunha Canevari

Efeitos do Fipronil sobre a sobrevivência e aspectos morfofuncionais da tireoide e suas consequências sobre a metamorfose, morfologia óssea e genotoxicidade em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* (Anura).

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fausto Nomura
UFG – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
15 de julho de 2022

Dedico o presente trabalho a todos aqueles que lutam diariamente por seus sonhos e por tudo
que acreditam e amam!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Classius de Oliveira por ter acreditado em mim e por ter me possibilitado trabalhar com aquilo que gosto, ao senhor sou eternamente grato.

Agradeço a Doutora Lilian Franco Belussi por toda a inestimável ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à minha mãe, Jussara Cristina da Cunha, ao amor da minha vida, Valner Matheus Milanezi Jordão, e ao meu grande amigo e irmão Vinícius Lucatelle da Silva por todo apoio nos momentos bons e ruins.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Anatomia Comparada pelos preciosos ensinamentos e momentos, em especial ao Bruno Serra de Lacerda Valverde, Maysa Succi e Wadson Rodrigues Rezende.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Processo nº 88887.486227/2020-00 do Programa PROEX, à qual agradeço.

“Em algum remoto recanto do universo, que se deságua fulgurantemente em inumeráveis sistemas solares, havia uma vez um astro, no qual animais astuciosos inventaram o conhecimento. Foi o minuto mais audacioso e hipócrita da “história universal”: mas, no fim das contas, foi apenas um minuto. Após alguns respiros na natureza, o astro congelou-se, e os astuciosos animais tiveram de morrer.”

Friedrich Wilhelm Nietzsche. Sobre verdade e mentira no sentido extra-moral. Hedra, 2008.

RESUMO

A metamorfose em anuros é um processo onde os animais estão extremamente sensíveis, e distúrbios, como os causados por contaminantes, podem levar a alterações fisiológicas e morfológicas irreversíveis. O fipronil é um inseticida que vem gerando muitas preocupações por seus impactos sobre a biodiversidade, uma vez que seu uso vem aumentando muito nos últimos anos. Entre os principais fenômenos durante a metamorfose, há um destaque para a formação e remodelação do sistema esquelético. Assim, devido ao crescente uso do fipronil e ao fato de que a contaminação por esse poderia levar a distúrbios na metamorfose e efeitos deletérios em vários órgãos e sistemas, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do fipronil sobre o desenvolvimento durante a metamorfose, com destaque para o sistema esquelético, avaliando também respostas tóxicas desse composto sobre biomarcadores sanguíneos e hepáticos. Para isso, 48 girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* no estágio 28 Gosner foram separados em quatro grupos experimentais (C0: 0,00mg/L; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil). Ao atingirem o estágio 46 Gosner, foram eutanasiados, pesados e tiveram sangue e o fígado retirados (para as análises toxicológicas), sendo os animais diafanizados (para a análise do sistema esquelético). Com relação ao desenvolvimento, a exposição ao fipronil levou à uma alteração no tempo de metamorfose e a um atraso no processo de ossificação, não influenciando a massa corpórea e o índice hepatossomático em ambas as espécies, entretanto, levou a uma diminuição no tamanho corporal e no comprimento de alguns ossos do apêndice locomotor posterior de *L. fuscus*. Com relação a toxicidade, o fipronil não causou efeito genotóxico e levou a um aumento na área de melanina hepática em ambas as espécies, causando um efeito negativo sobre a sobrevivência de *S. fuscovarius*. Dessa forma concluímos que o fipronil apresenta um potencial em alterar o tempo de metamorfose de anuros e acarreta em um atraso no processo de ossificação; não apresenta efeito genotóxico nas espécies analisadas e gera respostas hepáticas aumentando a atividade dos melanomacrófagos.

Palavras-chave: Anuros, Inseticida, Metamorfose, Ossificação, Toxicidade.

ABSTRACT

Metamorphosis in anurans is a process where animals are extremely sensitive, and disturbances, such as those caused by contaminants, can lead to irreversible physiological and morphological changes. Fipronil is an insecticide that has generated many concerns due to its impacts on biodiversity, since its use has increased greatly in recent years. Among the main phenomena during metamorphosis, there is an emphasis on the formation and remodeling of the skeletal system. Thus, due to the increasing use of fipronil and the fact that its contamination could lead to disturbances in metamorphosis and deleterious effects on various organs and systems, the aim of the present work was to investigate the effects of fipronil on development during metamorphosis, with emphasis on the skeletal system, also evaluating toxic responses of this compound on blood and hepatic biomarkers. For this, 48 tadpoles of *Leptodactylus fuscus* and *Scinax fuscovarius* at stage 28 Gosner were separated into four experimental groups (C0: 0.00mg/L; C1: 0.04mg/L, C2: 0.08mg/L and C3: 0. 4mg/L of fipronil). Upon reaching stage 46 Gosner, they were euthanized, weighed and had their blood and liver removed (for toxicological analyses), and the animals were diaphanized (for analysis of the skeletal system). Regarding development, exposure to fipronil led to a change in metamorphosis time and a delay in the ossification process, not influencing body mass and hepatosomatic index in both species, however, it led to a decrease in body size and in the length of some bones of the posterior locomotor appendix of *L. fuscus*. Regarding toxicity, fipronil did not cause a genotoxic effect and led to an increase in the hepatic melanin area in both species, causing a negative effect on the survival of *S. fuscovarius*. Thus, we conclude that fipronil has the potential to change the metamorphosis time of anurans and causes a delay in the ossification process; it has no genotoxic effect on the analyzed species and generates hepatic responses by increasing the activity of melanomacrophages.

Keywords: Anurans, Insecticide, Metamorphosis, Ossification, Toxicity.

.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplares de <i>L. fuscus</i> e <i>S. fuscovarius</i> evidenciando características morfológicas de cada espécie.	23
Figura 2 – Esqueleto diafanizado de <i>L. fuscus</i> demonstrando as medidas realizadas nos ossos longos, bem como a área de ossificação.	27
Figura 3 – Fêmur de <i>L. fuscus</i> demonstrando o grau de ossificação.	28
Figura 4 – Tempo, em dias, decorrido para atingir os estágios 42 e 46 Gosner em cada grupo experimental.	39
Figura 5 – Categorias de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por grupo experimental dos exemplares de <i>L. fuscus</i> .	44
Figura 6 – Categorias de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por grupo experimental dos exemplares de <i>S. fuscovarius</i> .	45
Figura 7 – Variação média da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas, dos indivíduos da espécie <i>S. fuscovarius</i> , por grupo experimental.	46
Figura 8 – Variação média da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas, dos indivíduos da espécie <i>L. fuscus</i> , por grupo experimental.	47
Figura 9 – Porcentagens de óbitos por espécie e grupo experimental.	60
Figura 10 – Anormalidades nucleares analisadas nos eritrócitos.	61
Figura 11 – Área de melanina hepática por espécie e grupo experimental.	62
Figura 12 – Fotomicrografias do fígado de <i>L. fuscus</i> demonstrando a variação média da área pigmentar dos melanomacrófagos.	63
Figura 13 – Fotomicrografias do fígado de <i>S. fuscovarius</i> demonstrando a variação média da área pigmentar dos melanomacrófagos.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índices biométricos avaliados por espécie e grupo experimental.	40
Tabela 2 – Comprimento dos apêndices locomotores e dos ossos longos analisados por espécie e grupo experimental.	42
Tabela 3 – Porcentagens da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por espécie e grupo experimental.	43
Tabela 4 – Frequência das anormalidades nucleares analisadas por espécie e grupo experimental.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C0	Concentração 0
C1	Concentração 1
C2	Concentração 2
C3	Concentração 3
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
Cf	Concentração final
Ci	Concentração inicial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FS	<i>Flowable solid</i> (Sólido fluido)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GR	<i>Microgranules</i> (Microgrânulos)
HE	Hematoxilina-Eosina
HIS	Índice hepatossomático
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature's</i>
n	Número amostral
n°	Número
pH	Potencial Hidrogeniônico
SC	<i>Soluble concentrate</i> (Concentrado solúvel)
SCE	<i>Sister chromatid Exchange</i> (Troca de cromátides irmãs)
SP	São Paulo
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
ULV	<i>Ultra low volume</i> (Volume ultra baixo)
UV	Ultravioleta
UNESP	Universidade Estadual Paulista
Vf	Volume final
Vi	Volume inicial
WG	<i>Water-dispersible granules</i> (Grânulos dispersíveis em água)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
±	Aproximadamente
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litros
=	Igual
mL	Mililitros
g/L	Gramas por litro
i.e	<i>id est</i> (isto é)
P	Valor estatístico
<	Menor
mm	Milímetros
µg/Kg	Micrograma por quilo
µg/L	Micrograma por litro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. Anfíbios anuros e sua utilização como bioindicadores ambientais	13
1.2. <i>Leptodactylus fuscus</i> e <i>Scinax fuscovarius</i> como modelo animal	15
1.3. Metamorfose em anuros e o desenvolvimento do sistema esquelético	17
1.4. Fipronil	18
1.5. Células sanguíneas e melanomacrófagos hepáticos como biomarcadores	21
2- OBJETIVOS	22
2.1. Geral.....	22
2.2. Específicos.....	23
3- MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Coleta e aclimação	23
3.2. Preparo da solução mãe de Fipronil e concentrações experimentais.....	24
3.3. Experimento com Fipronil (Regent® 800WG)	24
3.4. Análises	25
3.4.1. Análise de desenvolvimento e mortalidade	25
3.4.2. Análise do sistema esquelético	26
3.4.3. Genotoxicidade eritrocitária	28
3.4.4. Quantificação da área de melanina hepática.....	28
3.4.5. Análise dos dados	29
4- RESULTADOS	29
Manuscrito 1: Influência da exposição ao Fipronil sobre o desenvolvimento larvário de <i>Leptodactylus fuscus</i> e <i>Scinax fuscovarius</i> com enfoque para o sistema esquelético.	31
Manuscrito 2: Efeito da exposição ao Fipronil sobre a sobrevivência, melanina hepática e genotoxicidade eritrocitária em <i>Leptodactylus fuscus</i> e <i>Scinax fuscovarius</i> durante o desenvolvimento larvário.	53
5- CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	68

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Anfíbios anuros e sua utilização como bioindicadores ambientais

A classe Amphibia apresenta aproximadamente 8.478 espécies viventes com ampla distribuição mundial, sendo composta por três ordens: Gimnofionas, constituída pelos cecilianos, com cerca de 215 espécies compondo aproximadamente 3% dos anfíbios viventes, Urodelos, compostos pelas salamandras e tritões, apresentando 773 espécies, referentes à 9%, e Anuros, apresentando sapos, rãs e pererecas, com aproximadamente 7.490 espécies constituindo em média 88% do total de anfíbios viventes (Wake; Koo, 2018; Amphibiaweb, 2022).

Uma das principais características que diferencia os anfíbios dos demais vertebrados é a sua pele, que se apresenta altamente vascularizada compondo o principal órgão respiratório (Wake; Koo, 2018). Tipicamente apresentam um ciclo de vida bifásico, onde os indivíduos adultos se encontram para reprodução em um ambiente aquático e as fêmeas depositam seus ovos para que então sejam fertilizados pelos machos (Price *et al.*, 2007; Wake; Koo, 2018). A fase larval que emerge se desenvolve no meio aquático, transitando para o meio terrestre após a metamorfose (Price *et al.*, 2007; Wake; Koo, 2018). Entretanto, esse ciclo de vida não é regra, uma vez que os anfíbios são característicos por apresentarem uma alta diversidade reprodutiva (Wake; Koo, 2018).

Entre os anfíbios, os Anuros são encontrados em todos os continentes, com exceção na Antártida e em algumas ilhas oceânicas, apresentando uma alta distribuição principalmente em regiões tropicais (Wake; Koo, 2018). Esses animais apresentam um plano corporal altamente conservado, com a região cranial maior em relação ao corpo, um tronco curto e uma cintura pélvica alongada, com nove ou menos vértebras pré-sacrais (Wake; Koo, 2018). Apresentam os apêndices locomotores dianteiros curtos com quatro dígitos e os traseiros altamente alongados, em espécies com hábito saltatória, ou curtos, em espécies que habitam o subsolo, com quatro segmentos bem definidos e cinco dígitos (Wake; Koo, 2018). A fase adulta se apresenta desprovida de cauda (Wake; Koo, 2018).

A partir das décadas de 1980 e 1990 vêm sendo colocado em pauta o fenômeno mundial de declínio populacional que os anfíbios vêm sofrendo (Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Wake; Koo, 2018). As principais causas atribuídas a esse fenômeno são: 1) a perda de seu hábitat natural que acaba sendo substituído por zonas agrícolas ou urbanas; 2) a poluição ambiental por xenobióticos orgânicos e inorgânicos; 3) as alterações atmosféricas, como mudanças climáticas,

aumento das temperaturas ambientais e aumento da incidência de luz UV; 4) infecção por doenças como a quitridiomycose; 5) introdução de espécies exóticas, e 6) superexploração (Hayes *et al.*, 2010; Blaustein *et al.*, 2011; Sumanasekara; Dissanayake; Seneviratne, 2015; Wake; Koo, 2018).

Dessa forma, não há uma única causa para esse fenômeno, e sim um conjunto que pode afetar os anfíbios de forma direta (tanto isoladamente ou mais provavelmente em sinergia variando entre espécies), ou indireta (em conjunto com fatores ecológicos), comprometendo o *fitness* desses animais, levando a alterações à níveis moleculares, fisiológicos, individuais, populacionais ou até mesmo ao nível de comunidade (Hayes *et al.*, 2010; Blaustein *et al.*, 2011; Sumanasekara; Dissanayake; Seneviratne, 2015; Wake; Koo, 2018). Assim, a forma com a qual esses estressores atuam sobre o declínio populacional de anfíbios é altamente complexa (Blaustein *et al.*, 2011).

Uma forma de avaliar a qualidade ambiental e suas alterações ao longo do tempo, como os fatores estressores citados anteriormente, é o uso de bioindicadores que avaliam qualitativamente as respostas bióticas ao *stress* ambiental, e incluem processos biológicos, espécies ou comunidades (Holt; Miller, 2011). Uma espécie atua como um bom bioindicador quando apresenta moderada tolerância às alterações ambientais, não sendo demasiada sensível a ponto de não refletir as pressões ambientais por vir a óbito, ou muito resistente a ponto de não reagir às mudanças no ambiente (Holt; Miller, 2011). As funções principais de um bioindicador são monitorar o ambiente, os processos ecológicos e a biodiversidade, oferecendo diversas vantagens como indicar efeitos bióticos indiretos de poluentes (Holt; Miller, 2011).

Nesse sentido os anfíbios, principalmente os anuros, são considerados como excelentes bioindicadores por apresentarem uma alta gama de características que os tornam devidamente sensíveis às alterações ambientais, como a pele semi permeável altamente vascularizada e ovos sem casca que permitem o contato direto levando a contaminação por poluentes; um ciclo de vida bifásico que faz com que esses animais sejam dependentes tanto do meio aquático quanto terrestre, possibilitando a exposição a estressores em ambos os ambientes; um rápido desenvolvimento o que possibilita investigar os efeitos das alterações ambientais durante esse processo; intensa competição intra e interespecífica, possibilitando analisar respostas ecológicas; e ectotermia que possibilita observar efeitos de alteração na temperatura ambiental (Dunson; Wyman; Corbett, 1992; Qin; Xu, 2006; Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Zamora-Camacho, 2019).

Ademais, embriões e larvas de anfíbios com fertilização externa estão em contato direto com poluentes, o que os torna altamente suscetíveis aos estressores ambientais e antrópicos

(Qin; Xu, 2006; Burlibaşa; Gavrilă, 2011). Os girinos de anuros estão em contato constante com a água que circunda totalmente seus corpos, facilitando a exposição a contaminantes pela pele e principalmente pelas brânquias (Barni *et al.*, 2007). Além disso, é nesse momento que passam pelo processo de metamorfose, sofrendo um alto número de alterações em um curto período de tempo (Brande-Lavridsen; Christensen-Dalsgaard; Korsgaard, 2010). Assim, nesse estágio da vida esses animais apresentam um potencial ainda maior para atuar como bioindicadores.

CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, concluímos que, no geral, em baixas concentrações o fipronil não apresenta efeito letal sobre girinos de anuros, porém é letal em altas doses. Além disso, a sensibilidade das espécies deve ser considerada, assim são necessárias mais investigações para compreender melhor o potencial de letalidade desse composto. Os girinos das espécies aqui avaliadas não apresentaram efeitos genotóxico logo após sofrerem a metamorfose e apresentaram um efeito responsivo no fígado aumentando os melanomacrófagos demonstrando um efeito tóxico desse composto.

5- CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos resultados e na literatura, concluímos que em baixas concentrações o fipronil não apresenta efeito letal para a maioria das espécies já estudadas, incluindo os girinos das espécies nativas *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius*. Entretanto a exposição ao fipronil mesmo que em baixas concentrações acarreta diversos efeitos sub-letais que podem direta ou indiretamente comprometer a sobrevivência em nível individual ou populacional, podendo até mesmo interferir na propagação da espécie ao longo do tempo. Aqui destacamos alterações relacionadas ao desenvolvimento, tais como alterações no tempo de metamorfose, bem como atraso no processo de ossificação o que pode acarretar também em alterações morfológicas no indivíduo. Além disso, a exposição ao fipronil durante o período de metamorfose causa alterações hepáticas, mas não foram observadas alterações genotóxicas.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ingrediente ativo: Fipronil. Disponível em: < https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de jun. 2022.
- AMPHIBIAWEB - AmphibiaWeb Electronic Database. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org> >. Acesso em: 20 de jun. 2022.
- ASSIS, R. A. et al. Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 60741-60752, 2021.
- BABINI, M. S. et al. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 8, p. 1-14, 2016.
- BACH, N. C. et al. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 202, p. 289-297, 2018.
- BARNI, S. et al. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, v. 81, n. 1, p. 45-54, 2007.
- BENVINDO-SOUZA, M. et al. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p. 124910, 2019.
- BLAUSTEIN, A. R. et al. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 108-119, 2011.
- BONMATIN, J.-M. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental science and pollution research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.
- BORGES, R. E. et al. Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the Central Cerrado, Brazil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 77, n. 1, p. 22-28, 2019.
- BOSCOLO, C. N. P. et al. Comercial insecticide fipronil alters antioxidant enzymes response and accelerates the metamorphosis in *Physalaemus nattereri* (Anura: Leiuperidae) tadpoles. **Euro J Zool Res**, v. 5, p. 1-7, 2017.
- BRANDE-LAVRIDSEN, N; CHRISTENSEN-DALSGAARD, J; KORSGAARD, B. Effects of ethinylestradiol and the fungicide prochloraz on metamorphosis and thyroid gland morphology in *Rana temporaria*. **The Open Zoology Journal**, v. 3, n. 1, 2010.

- BRODEUR, J. C. et al. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 161-170, 2009.
- BRODEUR, J. C. et al. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 92, p. 10-17, 2013.
- BROWN, D. D. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. **Thyroid**, v. 15, n. 8, p. 815-821, 2005.
- BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental biology**, v. 306, n. 1, p. 20, 2007.
- BRUNELLI, E. et al. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic toxicology**, v. 91, n. 2, p. 135-142, 2009.
- BRUSLE, J.; I ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: **Fish morphology**. Routledge, 2017. p. 77-93.
- BURLIBAŞA, L.; GAVRILĂ, L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2011.
- CRUZ-ESQUIVEL, Á.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sinú River, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27392-27401, 2017.
- ÇAKICI, Ö. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 3, p. 237-243, 2015.
- DA CUNHA, E. L. R. et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 9, 2017.
- DA SILVA, F. R; GONÇALVES-SOUZA. T; PATERNO, G. B; PROVETE, D. B; VANCINE, M. H. 2022. Análises ecológicas no R. Nupeea: Recife, PE, Canal 6: São Paulo. 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0.
- DE ARCAUTE, C. R. et al. 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**, v. 45, p. 632-639, 2014.
- DENVER, R. J. Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. **Current topics in developmental biology**, v. 103, p. 195-227, 2013.

DE SOUZA SANTOS, L. R. et al. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, v. 297, n. 5, p. 864-875, 2014.

DIANA, S. G. et al. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 19, n. 12, p. 2961-2967, 2000.

DUNSON, W. A.; WYMAN, R. L.; CORBETT, E. S. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. **Journal of Herpetology**, p. 349-352, 1992.

EHSAN, H. A. et al. Influence of fipronil intoxication on thyroid gland ultra-structure and hepatic microsomal enzymes expression in male albino rats. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. Supplement 2, p. S79-S85, 2016.

FANALI, L. Z. et al. Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018.

FELISBINO, S. L.; CARVALHO, H. F. The epiphyseal cartilage and growth of long bones in *Rana catesbeiana*. **Tissue and Cell**, v. 31, n. 3, p. 301-307, 1999.

FELISBINO, S.; CARVALHO, H. F. Growth cartilage calcification and formation of bone trabeculae are late and dissociated events in the endochondral ossification of *Rana catesbeiana*. **Cell and Tissue Research**, v. 306, n. 2, p. 319-323, 2001.

FENOGLIO, C. et al. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 3, p. 259-268, 2005.

FERREIRA, M. et al. Fipronil (active ingredient of acaricide frontline®) acting on the mice thyroid. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 3, p. 265-270, 2012.

FIGUEIREDO, J.; DE JESUS RODRIGUES, D. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 24, n. 1, p. 7-15, 2014.

FREDIANELLI, A. C. et al. Hematologic, biochemical, genetic, and histological biomarkers for the evaluation of the toxic effects of fipronil for *Rhamdia quelen*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 43, n. 1, p. 54-59, 2019.

FREITAS, J. S. et al. Realistic exposure to fipronil, 2, 4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 2022.

GHAFFAR, A. et al. Assessment of genotoxic and pathologic potentials of fipronil insecticide in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Toxin Reviews**, v. 40, n. 4, p. 1289-1300, 2021.

GHISI, N. C. et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 180,

n. 1, p. 589-599, 2011.

GIBBONS, D; MORRISSEY, C; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 103-118, 2015.

GONÇALVES, M. W. et al. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere*, v. 182, p. 730-737, 2017.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Genotoxic effects of 4-nonylphenol and Cyproterone Acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 879-884, 2019.

GRIPP, H. S. et al. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 136, p. 173-179, 2017.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, p. 0706180001-0706180001, 2007.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. In: **Veterinary toxicology**. Academic press, 2018. p. 533-538.

HARTMAN, E. A.H et al. Chronic effects of strobilurin fungicides on development, growth, and mortality of larval Great Plains toads (*Bufo cognatus*). **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 396-403, 2014.

HAYES, T. B. et al. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: using organisms to measure. **Nature**, v. 3, p. 8-13, 2011.

IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3.
<<https://www.iucnredlist.org>> Acesso em: 20 de jun. 2022.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinateammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p. 7-12, 2014.

LAM, P. KS; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LEGHAIT, J. et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 38-44, 2009.

LIMA, A. P. et al. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke-Amazônia Central. 2006.

LÜDECKE, D. sjPlot: Data visualization for statistics in social science (R package version 2.3. 1). 2016.

LUTZ A (1925) Batraciens du Brésil. Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales 93(2): 137–139.

MARGARIDO, T. C. S. et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine environmental research**, v. 91, p. 61-67, 2013.

MOSER, V. C. et al. Assessment of serum biomarkers in rats after exposure to pesticides of different chemical classes. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 282, n. 2, p. 161-174, 2015.

MIURA, S.; HANAOKA, K.; TOGASHI, S. Skeletogenesis in *Xenopus tropicalis*: characteristic bone development in an anuran amphibian. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 901-909, 2008.

NARAHASHI, T. et al. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 149-152, 2010.

NATALE, G. S. et al. Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 471-479, 2018.

NIETZSCHE, F. W. **Sobre verdade e mentira no sentido extra-moral**. Hedra, 2007.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 120-126, 2014.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9852-9861, 2016.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. **Environmental pollution**, v. 244, p. 733-746, 2019.

POLLO, F. E. et al. Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 466-474, 2016.

PRICE, S. J. et al. Are anurans of Great Lakes coastal wetlands reliable indicators of ecological condition?. **Journal of Great Lakes Research**, v. 33, p. 211-223, 2007.

QIN, Zhanfen; XU, Xiaobai. Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology (I)—Introduction and quality control of laboratory animal. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1273-1280, 2006.

REYNAUD, S. et al. Toxicokinetic of benzo [a] pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). **Environmental pollution**, v. 161, p. 206-214, 2012.

ROQUES, B. B. et al. CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. **Toxicological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 29-41, 2012.

ROSE, C. S. Amphibian hormones, calcium physiology, bone weight, and lung use call for a more inclusive approach to understanding ossification sequence evolution. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 620971, 2021.

RUTKOSKI, C. F. et al. Cypermethrin-and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 4, p. 4377-4387, 2021.

SANTOS, A. T. et al. Genotoxic and melanin alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 16, p. 20072-20081, 2021.

SAKA, M; TADA, N. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. **Chemosphere**, v. 270, p. 129418, 2021.

SCAIA, M. F. et al. Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 22, p. 22209-22219, 2019.

SCHNEIDER J.G. (1799) *Historia Amphibiorum Naturalis et Literariae. Fasciculus Primus. Continens Ranas, Calamitas, Bufones, Salamandras et Hydros in Genera et Species Descriptos Notisque suis Distinctos*. Jena, Friederici Frommanni.

SHI, Y. B. **Amphibian metamorphosis**. Wiley-Liss, 2000.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.

SMIRNOV, S. V.; VASSILIEVA, A. B. Thyroid hormones in the skeletogenesis and accessory sources of endogenous hormones in *Xenopus laevis* (Amphibia; Anura) ontogeny: Experimental evidence. In: **Doklady Biological Sciences**. Pleiades Publishing, 2014. p. 136-138.

SUN, N. et al. Effects of chronic cadmium exposure on metamorphosis, skeletal development, and thyroid endocrine disruption in Chinese toad *Bufo gargarizans* tadpoles. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 1, p. 213-223, 2018.

SUMANASEKARA, V. D. W.; DISSANAYAKE, D. M. M. R.; SENEVIRATNE, H. T. J. Review on use of amphibian taxa as a bio-indicator for watershed health and stresses. In: **NBRO Symposium, Innovations for Resilient Environment**. 2015.

TATA, J. R. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 246, n. 1-2, p. 10-20, 2006.

TAYLOR, W. R.; VAN DYKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybiurn (Paris)**, v. 9, n. 2, p. 107-119, 1985.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, p. 1-66, 2003.

TRUEB, L.; HANKEN, J. Skeletal development in *Xenopus laevis* (Anura: pipidae). **Journal of morphology**, v. 214, n. 1, p. 1-41, 1992.

UÇAR, A. et al. Assesment of hematotoxic, oxidative and genotoxic damage potentials of fipronil in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 31, n. 1, p. 73-80, 2021.

VAN DER SLUIJS, J. P. et al. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 148-154, 2015.

VAZ-SILVA, W. et al. **Guia de identificação das espécies de anfíbios (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central**. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2020.

WAKE, D. B.; KOO, M. S. Amphibians. **Current Biology**, v. 28, n. 21, p. R1237-R1241, 2018.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40232-40238, 2012.

XU, C. et al. Maternal exposure to fipronil results in sulfone metabolite enrichment and transgenerational toxicity in zebrafish offspring: Indication for an overlooked risk in maternal transfer?. **Environmental pollution**, v. 246, p. 876-884, 2019.

ZAMORA-CAMACHO, F. J. Integrating time progression in ecoimmunology studies: beyond immune response intensity. **Current zoology**, v. 65, n. 2, p. 205-212, 2019.