

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta dissertação será
disponibilizado somente
a partir de 26/02/2020.



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

Wadson Rodrigues Rezende

Morfologia testicular de anuros do Cerrado provenientes de área
agrícola e unidade de conservação

São José do Rio Preto
2018

Wadson Rodrigues Rezende

Morfologia testicular de anuros do Cerrado provenientes de área
agrícola e unidade de conservação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 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
Coorientadora: Prof^a.Dr^a. Lia Raquel de Souza Santos

São José do Rio Preto
2018

Rezende, Wadson Rodrigues.

Morfologia testicular de anuros do Cerrado provenientes de área agrícola e unidade de conservação / Wadson Rodrigues Rezende. -- São José do Rio Preto, 2018
74 f. : il.

Orientador: Classius de Oliveira

Coorientador: Lia Raquel de Souza Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Anuro. 3. Anfíbio. 4. Espermatogênese. 5. Agricultura. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 597.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Wadson Rodrigues Rezende

Morfologia testicular de anuros do Cerrado provenientes de área
agrícola e unidade de conservação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 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 – Campus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Breno Henrique Caneguim
UFTM – Campus Iturama

Prof^a. Dr^a. Cynthia Peralta de Almeida Prado
UNESP – Campus Jaboticabal

São José do Rio Preto
26 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS:

Há sempre um receio de esquecer-se de alguém. Muitas pessoas passam pelas nossas vidas, nos ajudam, e a nossa memória as deixa em uma nuvem que nem sempre alcançamos.

Agradeço, primeiramente, a meus Pais, meu **Pai Eliton** e minha **Mãe Zoraide**, pois mesmo não entendendo bem o que eu faço, sempre apoiaram cegamente minhas escolhas. Cada minuto da minha vida que eu puder fazer algo, grande ou pequeno, para dar orgulho a eles, eu farei.

A minha Coorientadora **Dr^a Lia Raquel de Souza Santos**, que sempre me impulsionou a seguir em frente, encontrar meus caminhos na ciência, e me puxar para o chão, sempre que minha cabeça estava muito longe.

A **Dr^a Lilian Franco Belussi**, por ser uma grande amiga e uma exímia pesquisadora, que me ajudou em diversas fases de execução desse trabalho, com amplo suporte de conselhos, estatísticas, metodologias, músicas e tudo mais.

Aos meus amigos, principalmente **Tainã Andreani**, que trilhou muitos caminhos junto a mim. A todos dos meus dois laboratórios, pela ajuda e por me aguentarem todos os dias.

A meu Orientador **Dr. Classius de Oliveira**, por além de me orientar, ser um espelho no qual eu olho e imagino como serei no futuro.

Muito obrigado !

“Sempre que penso que falhei, ou que meu trabalho foi imperfeito, quando fui criticado com desprezo, e mesmo quando fui excessivamente elogiado, de forma a sentir-me envergonhado, meu grande conforto foi dizer centenas de vezes a mim mesmo que ‘trabalhei tanto e com tanto empenho quanto poderia, e nenhum homem pode fazer mais do que isso’.”

Charles Darwin

RESUMO

As práticas agrícolas, além do desmatamento, carregam também inúmeros compostos químicos que apresentam grande toxicidade a organismos não alvos como os anuros, atuando como desreguladores endócrinos e interferindo nos processos biológicos como a reprodução. Neste contexto, foi promovida uma comparação da morfologia testicular e dos tipos celulares espermatogênicos de três espécies de anuros do cerrado (*Dendropsophus minutus*, *Boana albopunctata*, *Physalaemus cuvieri*), provenientes de ambientes agrícolas e unidade de conservação. Morfologicamente não foram evidenciadas alterações quanto a arquitetura testicular geral das espécies entre os ambientes amostrados. No entanto, observou-se diferença estatística entre os ambientes quando se avaliou morfométricamente os parâmetros testiculares área e diâmetro locular e também nas células germinativas. *Dendropsophus minutus* apresentou a maioria de seus atributos testiculares com menores médias no ambiente agrícola, mostrando-se mais susceptível as pressões agrícolas. Já, *B. albopunctata*, um outro hílideo, respondeu de forma contrária as outras espécies, onde as maiores médias para área locular, espermatócitos e espermatozoides foram no ambiente agrícola. No entanto, para o leptodactílideo *P. cuvieri*, constatou-se mais espermatozoides naqueles viventes em ambiente preservado. Em adição, a pigmentação testicular, característica dessa espécie, foi maior no ambiente agrícola, sugerindo que essas células podem conferir proteção frente a agentes xenobióticos, como os agroquímicos. É possível concluir que as espécies apresentam respostas diferentes quanto aos parâmetros testiculares frente a pressão antrópica de origem agrícola, podendo prejudicar os processos reprodutivos, consequentemente, afetando a manutenção das comunidades de anuros.

Palavras-chave: *Anfíbios. Arquitetura testicular. Espermatogênese. Agricultura.*

ABSTRACT

Agricultural practices, besides deforestation, also carry countless chemical compounds that present great toxicity to non-target organisms such as anurans, acting as endocrine disrupters and interfering in biological processes such as reproduction. In this context, a comparison of testicular morphology and spermatogenic cell types of three species of Cerrado anurans (Dendropsophus minutus, Boana albopunctata, Physalaemus cuvieri) from agricultural environments and conservation unit was promoted. Morphologically, there were no changes in the general testicular architecture of the species among the sampled environments. However, a statistical difference was observed when the testicular parameters, area and locular diameter, were evaluated morphometrically and also in the germinative cells between the environments. Dendropsophus minutus presented most of its testicular attributes with lower averages in the agricultural environment, showing to be more susceptible to agricultural pressures. However, B. albopunctata, another hylid, responded in a opposite manner to the other species, where the highest averages for locular area, spermatocytes and spermatozoa in the agricultural environment. However, for the leptodactylid P. cuvieri, more spermatozoa was found in those living in a preserved environment. In addition, the characteristic testicular pigmentation of this species was higher in the agricultural environment, suggesting that these cells may confer protection against xenobiotic agents, such as agrochemicals. It is possible to conclude that the species present different responses regarding the testicular parameters under anthropic pressure of agricultural origin, which may impair reproductive processes, consequently affecting the maintenance of anuran communities.

Keywords: *Amphibians. Testicular architecture. Spermatogenesis. Agriculture.*

SUMÁRIO

RESUMO	03
ABSTRACT	04
INTRODUÇÃO GERAL	07
<i>Declínio mundial de anfíbios</i>	07
<i>Pressão agrícola e o Cerrado</i>	08
<i>Anuros em agroecossistemas</i>	09
<i>Efeitos das atividades agrícolas na reprodução de anuros</i>	10
OBJETIVO	12
<i>Geral</i>	12
<i>Específicos</i>	12
MATERIAL E MÉTODOS	12
<i>Ambientes amostrados</i>	12
<i>Coleta de espécimes e processamento de material</i>	14
<i>Morfologia geral</i>	16
<i>Parâmetros biométricos e morfométricos</i>	16
<i>Análises estatísticas</i>	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	28
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
<i>Coleta de espécimes e processamento</i>	30
<i>Avaliação Morfológica</i>	31
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
PRACHA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1	47
CAPÍTULO 2	55
RESUMO	55
INTRODUÇÃO	56

MATERIAL E MÉTODOS	57
<i>Coleta de espécimes e processamento</i>	57
<i>Parâmetros morfométricos</i>	58
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
PRACHA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2	67

INTRODUÇÃO GERAL

Declínio mundial de anfíbios

Nas últimas décadas, os anuros têm sido reconhecidos como um dos grupos animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo, pois vem sofrendo drástica diminuição de populações desde a década de 1980 (Wake, 1991; Sparling e Fellers, 2009). Desde então, muitos esforços têm sido realizados para compreender e solucionar este evento.

O fenômeno do declínio mundial de espécies é decorrente de um conjunto de fatores que incluem perda de habitat, poluição química, introdução de espécies exóticas, aumento da radiação ultravioleta, patógenos, entre outros (Blaustein et al., 1994; 2011; Alford e Richards, 1999; Houlihan et al., 2000; Hayes et al.; 2010a). A perda e fragmentação de habitats causam reduções das populações em escala local e regional (Catenazzi, 2015), levando a depressão da diversidade genética dentro das populações (Catenazzi, 2015; Chanson et al., 2008). Além disso, populações pequenas estão mais sujeitas a eventos demográficos e ambientais estocásticos, o que por sua vez, causa mais redução, aumenta a endogamia e diminui a variabilidade genética, tornando-as cada vez menores, podendo levar à extinção (Catenazzi, 2015; Chanson et al., 2008).

O problema toma maiores proporções quando se leva em consideração que esses fatores não atuam isoladamente nas comunidades de anuros, de forma que o maior agravante é o efeito sinérgico de um ou mais fatores (Catenazzi, 2015; Hayes et al., 2010a; Blaustein et al., 2011). Além disso, dentre essas interações, uma das mais significativas se encontra na relação entre os poluentes ambientais e os patógenos (Hayes et al., 2010a; Blaustein et al., 2011), uma vez que a exposição a pesticidas induz a imunossupressão, aumentando a infecção por parasitas e fungos (Christin et al., 2004; Rohr et al., 2008; Buck et al., 2015).

Devem ser consideradas, também, ações indiretas que interferem na sobrevivência dos anuros, como em casos em que as exposições a pesticidas não afetam diretamente esses animais, mas atingem outros níveis ecológicos, como as comunidades de zooplâncton e fitoplâncton, que são a base alimentar dos anfíbios em seu estágio larval, de forma que a diminuição da oferta

alimentar exerce influência na sobrevivência destes organismos (Relyea, 2010; Relyea e Diecks, 2008).

Neste contexto, torna-se impossível atribuir a apenas um fator o declínio mundial de anfíbios, já que se trata de uma grande teia de interações (causando efeitos diretos e indiretos). Entretanto, as atividades agrícolas podem estar à frente de dois grandes pontos já ressaltados, já que essas atividades causam grande modificação de habitat e fragmentação, além de carregar consigo uma gama de insumos químicos, os agroquímicos (Fearnside, 2001; Cushman, 2005; Silva et al., 2006; Cunha et al., 2008; Hayes et al. 2010a; Blaustein et al., 2011).

Pressão agrícola e o Cerrado

As atividades agrícolas intensivas estão entre as pressões antrópicas mais marcantes no Brasil, principalmente no que tange a respeito do Cerrado, que vem sofrendo grandes perdas de cobertura nas últimas quatro décadas (Fearnside, 2001; Silva et al., 2006). O Cerrado carrega um “fardo duplo”, pois além de ser um ambiente natural complexo e muito rico em questão de biodiversidade, (Myers et al., 2000; Klink e Machado, 2005) é ao mesmo tempo reconhecido por ter terra favorável para expansão agrícola (Goedert et al., 1980; Goedert.,1980). Sendo o segundo maior bioma brasileiro, é considerado um *hotspot* para a conservação da biodiversidade, abrigando grande diversidade de anuros, com 209 espécies registradas, sendo 108 endêmicas (Klink e Machado, 2005; Valdujo et al., 2012), e ocupa cerca de 24% do território nacional com uma área de aproximadamente de 2.036.448 km² (IBGE, 2004). Destas, apenas 8,3% encontra-se em áreas de proteção ambiental e este número cai para 6,3% quando se considera apenas as porções com vegetação nativa (Françoso et al., 2015).

Em 2009 a área de cobertura vegetal natural do bioma era de 51,16%, e em 2010 foi observada uma diminuição para 50,84%, o que equivale a uma perda de 6.469 km² (MMA/IBAMA, 2011). Em contrapartida, as duas classes de atividades mais representativas quanto ao uso da terra do Cerrado são as pastagens cultivadas e culturas agrícolas, ocupando respectivamente 28,5 e 10,5% do território, evidenciando que parte significativa dessa perda é em função das atividades agrícolas (Sano et al., 2008). Essas atividades são

responsáveis por grandes transformações nas paisagens naturais e ameaças à biodiversidade, além disso, para sua otimização, muitos processos tecnológicos mecânicos e bioquímicos são adicionados à produção agrícola, como agrotóxicos, fertilizantes e corretivos, irrigação sem controle, entre outros (Cunha et al., 2008).

Anuros em agroecossistemas

Organismos que vivem em agroecossistemas, como por exemplo, os anuros, estão frequente e excessivamente expostos aos agroquímicos, causando uma grande preocupação em níveis ecológicos e de saúde pública (Vera-Candioti et al., 2010). Sendo que, mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos podem afetar a estrutura e a função das comunidades naturais, provocando impactos em múltiplos níveis, desde o molecular até o de comunidades inteiras, comprovando que as práticas agrícolas intensivas são altamente impactantes ao ambiente e estão diretamente relacionadas à redução da biodiversidade (Grisolia, 2005).

Os anfíbios apresentam um conjunto de características ecológicas e morfofuncionais muito particulares, como ovos sem casca, ciclo de vida bifásico, sendo o estágio larval aquático e o estágio adulto terrestre úmido, na maioria das espécies (Blaustein et al., 1994; 2011). Além disso, possuem alta permeabilidade cutânea envolvida nas trocas gasosas, o que os torna suscetíveis a fatores de estresse físico-químicos, como a radiação ultravioleta, agentes patogênicos ou xenobióticos (Quaranta et al., 2009; Verrell, 2000; Dohm et al., 2008). Não obstante, cita-se ainda a baixa taxa de dispersão, sendo, em geral, filopátricos (Blaustein et al., 1994), tornando-os altamente vulneráveis as mudanças ambientais.

Diversos são os efeitos que ambientes agrícolas e seus agentes químicos podem provocar nos anuros. Em primeira instância, eles aumentam a taxa de mortalidade, interferem no tempo de metamorfose e no tamanho dos girinos (Greulich e Pflugmacher, 2003; Trachantong et al., 2016; Velásquez et al.; 2017), podem induzir deformidades no aparato oral (Rowe et al., 1998), e em adultos causam inúmeras malformações, como ausência de olhos e membros; fusão de dedos e polidactilia, duplicação dos membros posteriores, e diversas outras anormalidades (Ouellet et al., 1997; Peltzer et al., 2011;

Carezzano et al., 2016). Dentre os principais agroquímicos com efeitos sobre anfíbios, citamos, especialmente, os pesticidas do grupo dos piretróides, que tem como efeito interferir no sistema nervoso (Greulich e Pflugmacher, 2003; Yilmaz et al., 2008), retardando a metamorfose e crescimento, além de causar contrações corporais involuntárias e nado errático, o que compromete a natação e sobrevivência dos girinos (David et al., 2012; Velásquez et al., 2017).

Os compostos agrícolas também atuam no sistema imune dos anuros, podendo causar morte de linfócitos, diminuindo as populações de células imunológicas e atividade fagocitária; esse quadro de imunossupressão os deixa mais susceptíveis a infecções parasitárias e fúngicas (Christin et al., 2004; 2013; Cabagna et al., 2005; Brodtkin et al., 2007; Rohr et al., 2008; Buck et al., 2015; Jia et al., 2015).

Outro agravante é a grande bioacumulação nos tecidos de anuros tendo relatos da acumulação desses compostos desde a pele a ovários, e, ate mesmo, no cérebro de anuros (Albanis et al., 1996; Fagotti et al., 2005; Loveridge et al., 2007; Sparling et al., 2014).

Além dos efeitos supracitados, há literatura vasta quanto ao efeito desses compostos em caráter genotóxico, sendo que a incidência de anormalidades nucleares e degeneração do material genético tem sido relatado para diversos compostos em várias espécies ao redor do mundo (Krauter, 1993; Lajmanovich et al., 2005; 2014; Barni et al., 2007; Yin et al., 2009; Li et al., 2010; Da Silva et al., 2013; Gonçalves et al., 2015; 2017a,b; Pérez-Iglesias et al., 2016).

Efeitos das atividades agrícolas na reprodução de anuros

Para os anuros, o arranjo histológico testicular é composto por unidades arredondadas denominadas lóculos seminíferos, onde estão dispostas as células germinativas espermatogênicas, em cistos produzidos pelas células de Sertoli (Wake, 1968; Lofts, 1974; Rastogi et al., 1988; Oliveira e Vicentini, 1998; Oliveira et al., 2002; 2003). Estes lóculos são sustentados por tecido conjuntivo, e esse tecido intersticial é composto por células somáticas, fibras colágenas e reticulares e, para algumas espécies, abrigam também os melanócitos testiculares (Oliveira e Vicentini, 1998; Franco-Belussi et al., 2009; 2012; Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Leite et al., 2015). Essas células

pigmentadas são componentes do sistema pigmentar interno, elas acumulam melanina em seu citoplasma e apresentam funções protetivas frente a diversos fatores abióticos, como a radiação ultravioleta, estresse térmico, radicais livres e xenobióticos (McGraw, 2005; Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Santos et al., 2014; Franco-Belussi et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

O uso extensivo de agroquímicos afeta negativamente os organismos não alvo, como os anfíbios, sendo já relatadas alterações reprodutivas devido a exposição experimental (Hayes et al., 2003; 2010b; Çakici, 2013; 2015) e ambiental (McDaniel et al., 2008; Sanchez et al., 2014; McCoy et al., 2017.) a esses compostos. Os contaminantes podem afetar a espermatogênese, agindo através de rotas hormonais ou exercendo efeitos genotóxicos, passando assim pela barreira hemato-testicular, ou podem atuar também de forma direta no tecido testicular (Toppari et al., 1996; Fattahi et al., 2012).

Um dos agroquímicos de amplo uso nas plantações é a atrazina, utilizada para o controle de lagartas daninhas em diversas culturas (Hopenhayn-Rich et al., 2002; Solomon et al., 1996). Esse composto vem sendo associado a vários efeitos deletérios nos testículos de anuros, responsável por induzir a feminilização, causar ausência de caracteres sexuais secundários, como os calos nupciais e diminuição da musculatura laringeal responsável pela vocalização, além de estar associado à incidência de ovócitos testiculares e gônadas mistas, sendo considerado um químico com alto poder desmasculinizante (Hayes et al., 2003; 2010b).

Contudo, mesmo a literatura já apresentando informações desses efeitos nas gônadas de anuros, há certa dificuldade em fazer uma associação direta da ação desses compostos em condições experimentais *versus* naturais a qual esses organismos estão expostos, já que nestas, eles estão em contato com misturas complexas de agroquímicos, e esse campo de conhecimento ainda é pouco conclusivo (Hayes et al., 2006; Edwards et al., 2006; Carneiro et al., 2012).

Desta forma, investigar as condições dos anuros em áreas agrícolas pode ser facilitado por meio do uso de biomarcadores morfológicos internos, como a morfologia testicular e suas estruturas, tornando possível identificar a presença de contaminantes químicos ou a magnitude de resposta, algo que muitas vezes não poderia ser realizado com o organismo em uma escala

macroscópica (Livingstone, 1993). Além disso, os efeitos de ambientes agrícolas nos testículos de anuros do Cerrado tem recebido pouca atenção, de forma que estudos morfológicos, como o aqui proposto, visam sanar essa carência de conhecimento.

OBJETIVO

Geral

- Comparação morfológica e morfométrica dos testículos de três espécies anuros em área agrícola e unidade de conservação, visando investigar se as espécies apresentam diferenças ou alterações nas gônadas entre esses ambientes.

Específicos

- Investigar se há indícios de que a pressão agrícola causa alterações na morfologia gonadal, levando a alterações histopatológicas no arranjo geral testicular, nas unidades seminíferas e células germinativas;
- Quantificar, por meio de análises morfométricas do epitélio germinativo, se a área ocupada pelos tipos celulares difere entre unidade de conservação e área agrícola.
- Analisar morfologicamente como os testículos de cada uma das espécies responde ao mesmo fator (tipos de ambiente).

MATERIAL E MÉTODOS

Ambientes amostrados

Foram selecionados dois tipos de cenários, sendo eles ambiente agrícola (**AA**) e uma unidade de conservação (**UC**), localizados no estado de Goiás (Figura 1).

O ambiente agrícola consistiu em poças permanentes e semipermanentes no município de Rio Verde, estado de Goiás (17° 47'

atribuído efeitos de desmasculinização em anuros, de diferentes formas, seja diminuindo a testosterona plasmática, inúmeras anormalidades testiculares como malformações nas unidades seminíferas, altas taxas de ovócitos testiculares, (Hayes et al.; 2003; Sai et al., 2015), e em níveis mais extremos, é relatado feminilização completa, onde machos de *Xenopus laevis* em genótipo apresentavam morfologia externa (formação de lábio cloacal, e ausência de calo nupcial visível) e comportamento feminino, bem como ovários desenvolvidos e funcionais (Hayes et al., 2010a). Além da Atrazina, vários outros agroquímicos em doses baixas foram detectados, dessa forma, esses animais estão expostos a uma gama de químicos, sendo que a mistura de vários pesticidas pode causar mais impacto do que cada composto isolado (Relyea, 2009). O efeito dessa mistura pode primariamente agir de forma letal, aumentando a taxa de mortalidade de anuros (Hua e Relyea, 2014), mas também pode induzir imunossupressão (Christin et al., 2004), deixando os anuros mais susceptíveis a patógenos como fungos (Buck et al., 2015).

Dessa forma, já é de conhecimento que os anuros são diretamente influenciados pelas condições ambientais sendo eles, muito dependentes de condições adequadas de seus ambientes, de forma que essas condições desempenham importante papel na manutenção e estruturação das comunidades (Toft, 1985; Duellman e Trueb, 1986; Beebee, 1996; Haddad e Prado, 2005).

CONCLUSÕES

Com base no exposto, podemos sugerir que pode haver influência de ambientes agrícolas na morfometria gonadal de anuros do cerrado, onde de forma geral os parâmetros testiculares tiveram menores valores na área agrícola em relação à unidade de conservação. *Dendropsophus minutus* mostrou grande parte de suas estruturas com menores valores no ambiente agrícola; em *P. cuvieri* houve diminuição dos espermatozoides na área de agricultura. Já *B. albopunctata*, em contraste, teve seus tipos celulares em maiores proporções no ambiente de agricultura.

É extremamente importante o estudo dos efeitos da pressão agrícola sobre espécies diferentes, visto que cada uma reage diferentemente da outra mesmo sendo da mesma família em alguns casos (como em *D. minutus* e *B.*

albopunctata). Além disso, mesmo dentro do grupo das espécies generalistas algumas se mostraram mais susceptíveis à influência desses ambientes.

Contudo, as análises morfométricas mostram apenas as proporções desses tipos celulares, mas não elucidaram a viabilidade desses gametas, que podem ter grandes perdas genéticas, ou efeitos acumulativos levando a perturbações na dinâmica reprodutiva e populacional dos anuros, contribuindo com o declínio mundial de espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEBEE, T.J.C. (1996). Ecology and conservation of amphibians. London, Chapman & Hall. p.214.
- BERRILL, M.; BETRAM, S.; PAUL, B.; COULSON, M.K.; OSTRANDER, D. (1995). Comparative sensitivity of amphibian tadpoles to single and pulsed exposures of the forest use insecticide fenitrothion. *Environmental Toxicology and Chemistry*.v.14(6).p.1011-1018.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W.P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8:60-71.
- BLAUSTEIN, A.R.; HAN, B.A.; RELYEA, R.A.; JOHNSON, P.T.J.; BUCK, J.C.; GERVASI, S.S.; KATS, L.B. (2011). 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. p108-119.
- BRANDÃO, R.A.; ARAÚJO, A.F.B.; (1998). A herpetofauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. In: MARINHO-FILHO, J.; RODRIGUES, F.H.G.; GUIMARÃES, M.M. A fauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. História natural e ecológica em um fragmento de Cerrado do Brasil Central. Brasília, GDF/IEAMA/IBAMA, p. 9-21.
- BUCK, J.C.; HUA, J.; BROGAN, W.R.; URBINA, J.; BENDIS, R.J.; STOLER, A.B.; BLAUSTEIN, A.R.; RELYEA, R.A. (2015). Effects of Pesticides Mixtures on Host-Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. *PLOS ONE*.v.10(7).p.1-17.
- CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N.M.; ALEXANDRE, V.P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M.S.C. (2012). Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.
- ÇAKICI, Ö. (2013). Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of Levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.v. 91.1.p. 96-101.

- ÇAKICI, Ö. (2015). Toxic effects of carbaryl on the histology of testes of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Acta Herpetologica*. v. 10 (1). p. 23-29. DOI:10.13128/Acta_Herpetol-14780.
- CHRISTIN, M.S.; MÉNARD, L.; GENDRON, A.D.; RUBY, S.; CYR, D.; MARCOGLIESE, D.J.; ROLLINS-SMITH, L.; FOURNIER, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology*.v.67(1).p.33-43.
- COTHRAN, R.D.; BROWN, J.M.; RELYEA, R.A. (2013). Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications*. V. 6(5). p. 832-841.
- CUNHA, N.R.S; LIMA, J.E.; GOMES, M.F.M; BRAGA, M.J. (2008). A Intensidade da Exploração Agropecuária como Indicador da Degradação Ambiental na Região dos Cerrados, Brasil. *RER, Piracicaba, SP*, vol. 46, nº 02, p. 291-323.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. (1986). Biology of amphibians. New York, Johns Hopkins University Press. 670p.
- FATTAHI, E.; JORSARAEI, S.G.A.; GARDANEH, M. (2012). The effect of carbaryl on the pituitary-gonad axis in male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*.v.10. p, 419-424.
- FEARNSIDE, P. M. (2001). Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. *Environmental Conservation*.v. 28.p. 23-38.
- GONÇALVES, M.W.; VIEIRA, T.B.; MACIEL, N.M.; CARVALHO, W.F.; LIMA, L.S.F.; GAMBALE, P.G.; DA CRUZ, A.D.; NOMURA, F.; BASTOS, R.P.; SILVA, D.M. (2015). Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus* : preserved versus perturbed áreas. *Environ. Sci. Pollut. Res*.v.22.p.3947-3954.
- GONÇALVES, M.W.; GAMBALE, P.G.; GODOY, F.R.; ALVES, A.A.; ALMEIDA REZENDE, P.H.; DA CRUZ, P.D.; MACIEL, N.M.; NOMURA, F.; BASTOS, R.P.; MARCO-JR, P.; SILVA, D.M. (2017). The agricultural impacts of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. *ZOOLOGIA*.v.34.p.1-8.
- GUILLETE, L.J.J.R.; GROSS, T.S.; GROSS, D.; ROONEY, A.A.; PERCIVAL, H.F. (1995). Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated and control lakes. *Environmental Health Perspectives* .v.103(4).p.31-36.
- HADDAD, C.F.B.; CARDOSO, A.J. (1992). Elección del macho por la hembra de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura). *Acta Zoológica Lilloana*.v. 41.p. 81-91.

- HADDAD, C.F.B.; PRADO, C.P.A. (2005). Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*.v.55(3).p.207-217.
- HAMMOND, J.I.; JONES, D.K.; STEPHENS, P.R.; RELYEA, R.A. (2012). Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Evolutionary applications*.v.5(6).p.593-606.
- HAYES, T.B.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE.; VONK, A. (2003). Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence. *Environmental Health Perspectives*. v.111. n.4. p.568-575.
- HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. (2010a). Atrazine induce complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.v.107.n.10. p. 4612-4617.
- HAYES, T.B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. (2010b). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology*.v.213.p.921-933
- HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, B.D.; HELBING, C.C.; WERRY, K.; VELDHORN, N. (2004). Toxicity of Glyyphosatebased pesticides to four north American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*.v.23(8).p.1928-1938.
- HUA, J.; RELYEA, R. (2014). Chemical cocktails in aquatic systems:Pesticides effects on the response and recovery of >20 animal taxa. *Environmental Pollution*.v.189.p.18-26.
- IUCN – Red List of Treated Species. (2017) .*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*.Disponivel em:< <http://www.iucnredlist.org/> >. Acessado em: 29 de dezembro de 2017.
- JONES, D.K.; HAMMOND, J.I.; RELYEA, R.A. (2009). Very highly effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and Family-levels sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. V.28(9).p.1939-1945.
- MATHEW, M. (2014). Reproductive toxicity of an organophosphorus pesticide on male frog (*Bufo melanostictus*). *Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. v.2/2014. p.357-368.
- MCCOY, K.A.; BORTNICK, L.J.; CAMPBELL, C.M.; HAMLIN, H.J.; GUILLETTE, J.R.L.J.; ST MARY, C.M. (2008). Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*. V.116(11).p.1526-1532.

- MCCOY, K.A.; AMANTO, C.M.; GUILLETTE, .J.R.L.J.; MARY, C.M.S. (2017). Giant toads (*Rhinella marina*) living in agricultural áreas have altered spermatogenesis. *Science of the Total Environment*. v.609.p.1230-1237.
- QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE.C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* .v.4.p.1–4.
- RELYEA, R.A. (2009). A Cocktail of Contaminants: how Mixtures of Pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*.v.159.p.363-376.
- SAI, L.; WU, Q.; QU, B.; BO, C.; YU, G.; JIA, Q.; XIE, L.; LI, Y.; GUO, Q.; NG, J.C.; PENG, C. (2015). Assessing Atrazine-Induced Toxicities in *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v.94.p.152-157.
- SANCHEZ, L.; LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P.M.; MANZANO, A.S.; JUNGES, C.M.; ATTADEMO, A.M. (2014). First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Ríos Province, Argentina. *Acta Herpetologica*. V. 68 . p. 63-68.
- SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*. v. 39. p. 1266 – 1270.
- SILVA, J. F.; FARINAS, M. R.; FELFILI, J. M.; KLINK, C. A. (2006). Spatial heterogeneity, landuse and conservation in the Cerrado region of Brazil. *Journal of Biogeography*.v. 33.p.536-548.
- TOFT, C.A. (1985). Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia*.p.1-21.
- TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L.J.JR; JÉGOU, B.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J.A., MEYER, O.; MÜLLER, J.; RAJPERT-DE-MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.M.; SUMPTER, J.P.; SKAKKEBAEK, N.E. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. v. 104p. 741-803.
- VERA-CANDIOTI, J.; NATALE, G.S.; SOLONESKI, S.; RONCO, A.E.; LARRAMENDY, M.L. (2010). Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida. *Chemosphere* v.78.p.249–55.