



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 morfometricamente 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>	<i>07</i>
<i>Pressão agrícola e o Cerrado</i>	<i>08</i>
<i>Anuros em agroecossistemas</i>	<i>09</i>
<i>Efeitos das atividades agrícolas na reprodução de anuros</i>	<i>10</i>
OBJETIVO	12
<i>Geral</i>	<i>12</i>
<i>Específicos</i>	<i>12</i>
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
<i>Ambientes amostrados.....</i>	<i>12</i>
<i>Coleta de espécimes e processamento de material</i>	<i>14</i>
<i>Morfologia geral.....</i>	<i>16</i>
<i>Parâmetros biométricos e morfométricos</i>	<i>16</i>
<i>Análises estatísticas</i>	<i>17</i>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	28
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
<i>Coleta de espécimes e processamento</i>	<i>30</i>
<i>Avaliação Morfológica</i>	<i>31</i>
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; Houlahan 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 às 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 morfológicamente 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'

51,99"S, 50° 54' 03,56" O), localizadas nas curvas de nível de cultivos de soja e milho, ou em matas de refúgio, com no máximo 30 m de distância da área plantada. Durante os meses de coleta, outubro e novembro de 2014 e 2016, o cultivo predominante foi o da soja, entretanto, é uma prática agrícola comum a rotatividade de cultivos, sendo que após a colheita da soja, procede-se o plantio do milho.

Como área de preservação, foi selecionado o Parque Nacional das Emas, uma unidade de conservação federal que está localizada na região sudoeste do Estado de Goiás, cobrindo 132.000 hectares distribuídos nos municípios de Mineiros, Chapadão do Sul, e parte de Costa Rica, no Mato Grosso do Sul (ICMbio/MMA, 2018). Essa reserva tem como bioma o Cerrado, e ao longo de sua extensão são encontradas todas as fisionomias características, desde campos sujos, campos limpos, matas de galeria, até veredas, dentre outras. Foram selecionadas poças permanentes na região do Parque pertencente ao município de Mineiros (18°15.573'S, 052° 53.307'O).





Figura 1: Vista geral dos ambientes de coleta. **A** – Área agrícola, onde há formação de poças temporárias na curva de nível da plantação de soja no município de Rio Verde –GO (17° 47' 51,99"S, 50° 54' 03,56" O); **B** - Unidade de conservação, onde há presença de poças permanentes em meio a vegetação típica do Cerrado no Parque Nacional das Emas, Mineiros – GO (18°15,573'S, 052° 53.307'O).

Coleta de espécimes e processamento de material

Foram coletadas três espécies de anuros adultos, sendo duas delas hilídeos, representados por *Dendropsophus minutus* e *Boana albopunctata*, e uma leptodactilídeo, *Physalaemus cuvieri* (Figura 2). Para cada espécie foi amostrado um total de 10 indivíduos ($n = 10$), em cada um dos ambientes através de visitas noturnas durante os meses de outubro e novembro de 2014 e 2016, o qual compreende o período de atividade reprodutiva desses animais. Machos adultos foram então coletados em plena atividade de vocalização (Licença SISBIO nº34485-1).

Essas espécies foram escolhidas por representarem duas grandes famílias de anuros (Hylidae e Leptodactylidae) e por serem espécies de ampla distribuição na América do Sul e de hábitos generalistas quanto ao uso de habitat, sendo encontradas também em áreas antropizadas, incluindo áreas agrícolas (IUCN, 2017; Frost, 2018).

Os hábitos ecológicos também foram levados em consideração. Os machos de *D. minutus* utilizam, como sítios de vocalização, ramos ou talos de vegetação e plantas aquáticas baixas que emergem de charcos e lagoas (Bertoluci e Rodrigues, 2002); *B. albopunctata* também exibe comportamento de “empoleiramento”, sendo considerada arborícola, encontrada em arbustos

baixos e árvores de baixo porte (Brasileiro et al., 2005; Guimarães et al., 2011). Em contrapartida, *P. cuvieri* usa como sítio de vocalização as margens de poças temporárias ou solos úmidos próximos aos corpos d'água (Barreto e Andrade, 1995). Dessa forma, as espécies podem prover importantes informações dos efeitos da agricultura em diferentes níveis de micro-habitats.

Após coletados, os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde (IF Goiano), onde foram eutanasiados em anestésico (Benzocaína, 5g/L) e destinados às análises anatômicas e morfológicas. Análises biométricas gerais, como comprimento rostro-cloacal (mm) obtida através de paquímetro digital (precisão 0,01 mm) e massa (g) total do indivíduo registrada em balança analítica AUW-220D (precisão de 0,0001g), foram registrados de cada animal.

Em seguida, os espécimes tiveram a cavidade abdominal seccionada através de incisão abdominal, e os testículos foram removidos, pesados (g) em balança analítica (modelo AUW-220D, precisão de 0,0001g), e medidos em seu eixo maior (mm) com paquímetro digital (precisão de 0,01mm), sendo estes órgãos direcionados para fixação em solução fixadora Metacarn (60% Álcool metílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas. Posteriormente, os testículos foram encaminhados à rotina histológica para serem desidratados em série alcoólica crescente e incluídos em historesina metacrilato glicol (Historesin Leica®).

Cerca de 25 secções transversais aleatórias, com 2µm de espessura e aproximadamente 10µm ou mais de distância entre elas, foram obtidas através de cortes em micrótomo rotativo (Leica® RM2255). Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina e fotomicrografados em Microscópio Leica® DM 4B, no Laboratório de Anatomia (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus São José do Rio Preto, São Paulo). As imagens capturadas foram analisadas no *software* Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc. (versão 6.0).

Juntamente com a coleta dos animais, foram também coletadas uma amostra de 1000mL de água dos ambientes estudados (tanto agrícola quanto preservado), as quais foram encaminhadas para laboratório de análise de água (A3Q, Cascavel – Paraná) para verificação de compostos organoclorados, organofosforados e carbamatos, através de cromatografia gasosa e líquida e espectrometria de massa, de acordo com a Portaria 2.914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde.

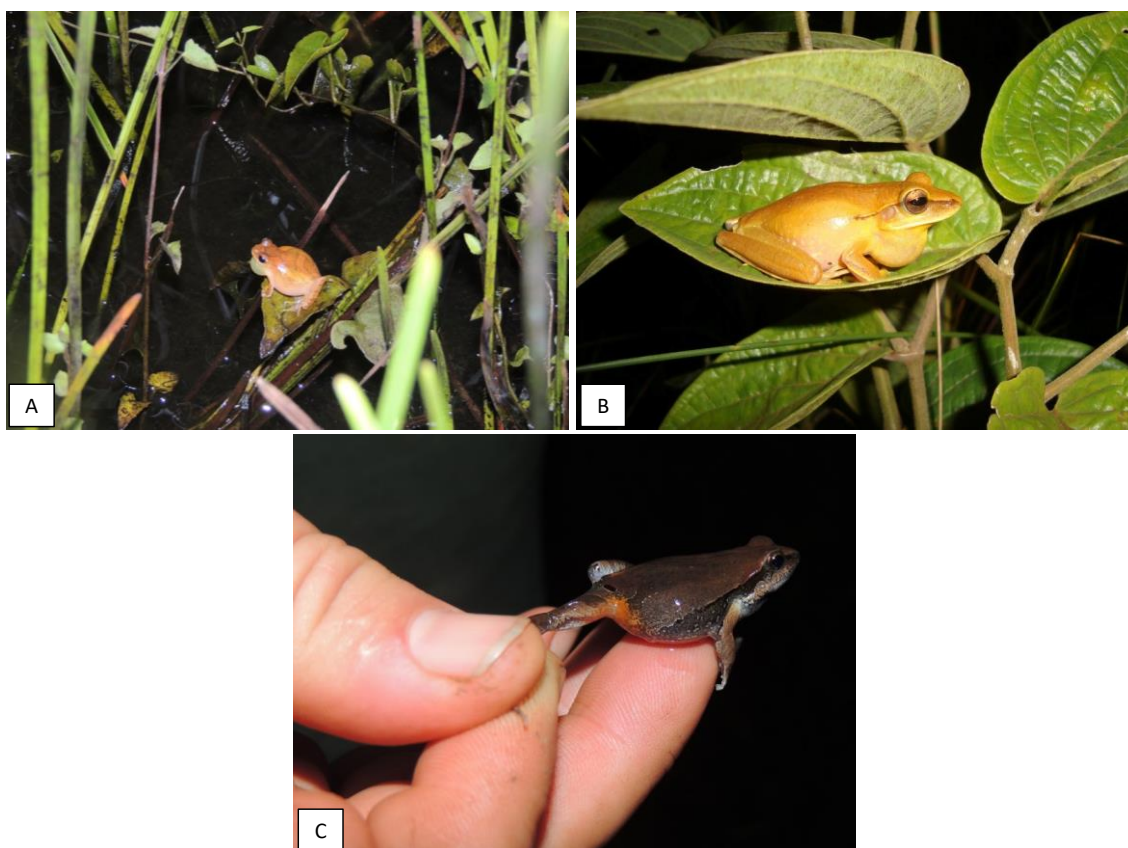


Figura 2: Espécies escolhidas para o estudo, dois hilídeos *Dendropsophus minutus* (A) e *Boana albopunctata* (B); e um leptodactílideo, *Physalaemus cuvieri* (C).

Morfologia geral

A morfologia geral foi analisada através das fotomicrografias, observando as características da composição da arquitetura testicular e locular, espaço intersticial, área dos cistos espermatogênicos e possíveis malformações entre outras anormalidades, segundo Çakiçi, 2013 e 2015.

Parâmetros biométricos e morfométricos

Utilizando das medidas biométricas, foi calculado o índice gonadosomático desses animais, consistindo na fórmula:

IGS= (massa dos testículos /massa do corpo do animal) x100.

Para as análises morfométricas do epitélio germinativo, foram analisados, de cada indivíduo, cerca de 25 secções histológicas, nestas, um total de 100 lóculos seminíferos inteiros foram escolhidos aleatoriamente, para avaliar os parâmetros: área locular; diâmetro locular; área dos cistos espermátogênicos; e área pigmentar restrita apenas a *Physalameus cuvieri*.

A área locular foi obtida através da circunscrição dos lóculos seminíferos, utilizando a ferramenta de criação de polígonos no *software* Image Pró-plus; e o diâmetro consistiu na medida linear do maior eixo de cada lóculo, usando a ferramenta de criação de linha do mesmo *software*.

Quanto aos cistos espermátogênicos, as medidas foram obtidas pelo contorno destes, sendo categorizados de acordo com Santos e Oliveira (2008) em: espermátogônias (primárias e secundárias); espermátócitos (primários e secundários) e espermatozoides (os quais foram considerados desde espermátides redondas e alongadas a espermatozoides em feixes e livres no lúmen). Além disso, levando-se em conta que nem toda a extensão do lóculo é preenchida com epitélio germinativo, foi extraída também a área do espaço intralocular, o qual consiste no espaço luminal e no espaçamento que há entre os cistos, obtido através do cálculo usando a soma da área dos cistos germinativos subtraídos da área locular.

Em adição as análises, para a espécie *P. cuvieri* foi ainda quantificada a área pigmentar testicular, uma vez que esta espécie é a única entre as demais analisadas que contêm essa pigmentação. A área pigmentada foi quantificada por ferramenta de diferença de coloração no *software* Image Pró-plus 6.0, segundo Santos et al. (2014), com adaptações.

Análises estatísticas

Para testar a nossa hipótese da influência dos ambientes na morfometria testicular, foi utilizado um teste de Modelos Lineares Generalizados (GLM) para todos os parâmetros analisados, tendo por variável preditora os tipos de ambientes (variável categórica de dois níveis) nos caracteres morfométricos testiculares (variáveis resposta contínuas). As análises estatísticas foram executadas no programa R v.3.4.3 (R Development Core Team), sendo considerado o valor de $p < 0,05$ como significativo.

Para a comparação da área e diâmetro locular, além de testar o efeito dos ambientes, foi considerado também o fator “espécies”. Para controlar a interdependência entre as fotomicrografias e entre os animais, foi adicionado à análise outras co-variáveis (indivíduos amostrados, quantidade de fotos).

Para a comparação da área dos cistos espermatozoides, foi levado em consideração que os tipos celulares não são independentes entre si, já que se trata de um processo e cada tipo celular dará origem ao próximo (segundo Sanchez et al., 2014); esses parâmetros foram analisados simultaneamente e também foram adicionadas as co-variáveis supracitadas.

Quanto à pigmentação, houve a comparação da área pigmentar entre os dois cenários, com também a adição das co-variáveis, assim como também foi realizada a comparação do índice gonadosomático entre os ambientes e entre as espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANIS, T.A.; HELA, D.; PAPAKOSTA, G.; GOUTNER, V. (1996). Concentration and bioaccumulation of organochlorine pesticide residues in herons and their prey in wetlands of Thermaikos Gulf, Macedonia, Greece. *The Science of the Total Environment*, v.182.p.11-19.
- ALFORD, R.A.; RICHARDS, S.J. (1999). Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. .v.30.p. 133–165.
- BARRETO, L.; ANDRADE, G.V. (1995). Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. v.16.p.67-76.
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M. Y FENOGLIO, C. (2007). Evaluation of *Rana sylvatica* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology* v.81.p. 45-54.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M.T. (2002). Utilização de habitats reprodutivos e micro-habitats de vocalização em uma taxocenose de anuros (Amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. v.42.p287-297
- 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 Science*.v.1223. p: 108-119.
- BRASILEIRO, C.A.; SAWAYA, R.J.; KIEFER, M.C.; MARTINS, M. (2005). Amphibians of an open cerrado frgment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*.v.5(2).p.1-17.
- BRODKIN, M.A.; MADHOUN, H.; RAMESWARAN, M.; VATNICK, I. (2007). Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 26.p. 80–84.
- 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.
- CABAGNA, M.C.; LAJMANOVICH, R.C.; STRINGHINI, G.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; PELTZER, P.M. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province,Argentina. *Applied Herpetology*.v.1.p.373-380.
- 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.
- CAREZZANO, F.J.; DORFINGER, K.; BARDONE, S.P.U. (2016). Anoftalmia en *Leptodactylus latrans* (Steffen,1815)(Anura:Leptodactylidae) de um agroecosistema de Argentina.*Revista Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales*.v.3(1).p.101-103.
- CATENAZZI, A. (2015). State of the World's Amphibians.*Anual Review of Environment and Resources*.v.40.p.91-119.
- CHANSOON, J.; HOFFMANN, M.; COX, N.; STUART, S. (2008). The state of the world's amphibians. In *Threatened Amphibians of the World*, ed. SN STUART, M HOFFMANN, J CHANSOON, N COX, R BERRIDGE, ET AL., pp. 33–52. Barcelona, Sp.: Lynx Ed.
- 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.

- CHRISTIN, M.S.; MÉNARD, L.; GIROUX, I.; MARCOGLIESE, D.J.; RUBY, S.; CRY, D.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P. (2013). Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. *Environmental Science and Pollution Research* .v.20.p.601-611.
- CUSHMAN, S.A. (2005). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*.v.28.p.231-240.
- 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.
- DA SILVA, H.S.V.P.; LOIOLA, C.; PEREIRA, S.R.F.; SANTOS, R.L.; ANDRADE, G.V.; NUNES, G.S. (2013). Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600 BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*.v.23.p.1-10.
- DAVID, M.; MARIGOUDAR, S.R.; PATIL, V.K.; HALAPPA, R. (2012). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide Biochemistry Physiology*.v.103.p.127-134.
- DOHM, M.R.; MAUTZ, W.J.; DORATT, R.E.; STEVENS, J.R. (2008). Ozone exposure affects feeding and locomotor behavior of adult *Bufo marinus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*.v. 27.p.1209–1216.
- EDWARDS, T.M.; MCCOY, K.A.; BARBEAU, T.; MCCOY, M.W.; THRO, J.M.; GUILLETTE, L.J. (2006). Environmental context determines nitrate toxicity in southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. *Aquatic Toxicology*. V.78(1).p.50–58.
- FAGOTTI, A.; MOROSI, L.; DI ROSA, I.; CLARIONI, R.; SIMONCELLI, F.; PASCOLINI, R.; PELLEGRINO, R.; GUEZ, G.D.; HOTZ, H. (2005). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphibia-Reptilia*.v.26.p.93-104.
- FATTAHI, E.; JORSARAEI, S.G.A.; GARDANEH, M. (2012): The effect of carbaryl on the pituitary-gonad axis in male rats. Iran. *The 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.
- FRANCO-BELUSSI, L. ZIERI, R. SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. (2009). Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *The Anatomical Records*. v.292. p. 178-182.
- FRANCO-BELUSSI, L; SANTOS, L.R.S. ZIERI, R; OLIVEIRA, C. (2012). Visceral Pigmentation in Three Species of the Genus *Scinax* (Anura:

Hylidae): Distinct Morphological Pattern. *The Anatomical Records* v.295. p. 298-306.

FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H.N.; OLIVEIRA, C. (2016). Internal Pigment Cells Respond to External UV Radiation in Frogs. *The Journal of Experimental Biology*.v.210.p.1378-1383

FRANÇOSO, R.D.; BRANDÃO, R.; NOGUEIRA, C.C.; SALMONA, Y.B.; MACHADO, R.B.; COLLI, G.R. (2015). Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. *Natureza & Conservação*.v 13 (1).p. 35-40.

FROST, D.R. (2018). Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA Disponível em :< <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>> Acessado em: 09 de abril de 2018.

GOEDERT, W.J. (1989). Região dos cerrados: potencial agrícola e política para seu desenvolvimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* . v.24(1).p.1-17

GOEDERT, W.J.; LOBATO, E.; WAGNER, E. (1980). Potencial agrícola da região dos cerrados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.v.15(1).p.1-17

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. *Environmental Science Pollution Research*.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.

GONÇALVES, M.W.; CAMPOS, C.B.M.; BATISTA, V.G.; CRUZ, A.D.; MARCO JUNIOR, P.; BASTOS, R.P.; SILVA, D.M. (2017). Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters,1872 (Anura:Hylidae) developmental larval stages. *Chremosphere*.v.182.p.730-737.

GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. (2003) Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology*. v.65.p.329-336.

GRISOLIA, C.K. (2005). Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: UNB.

GUIMARÃES, T.C.S.; FIGUEIREDO, G.B.; MESQUITA, D.O.; VASCONCELLOS, M.M. (2011). Ecology of *Hypsiboas albopunctatus*

(Anura:Hylidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology* v.45(2).p.244-255.

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(4). p.568-575.

HAYES, T.B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V.P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J.; TSUI, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environ Health Perspect.* V.114.p.40-50.

HAYES, T.B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. (2010a). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp.Biol.*v.213.p. 921–933.

HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. (2010b). 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.

HOPENHAYN-RICH, C.; STUMP, M.L.; BROWNING, S.R. (2002). Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*.v. 42.p. 127– 136.

HOULAHAN, J.E.; FINDLAY, C.S.; SCHMIDT, B.R; MEYERS, A.H.; KUZMIN, S. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *NATURE* .v.404.p.752-755.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2004). Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acessado em: 18 de Janeiro de 2018.

ICMBio/MMA – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Unidades Abertas a Visitação : Parque Nacional das Emas.Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/204-parque-nacional-das-emas>>. Acessado em: 17 de Janeiro de 2018).

IUCN – Red List of Treated Species. (2017) .*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*.Disponível em:<<http://www.iucnredlist.org/>>. Acessado em: 29 de dezembro de 2017.

- JIA, X.; WANG, D.; GAO, N.; CAO, H.; ZHANG, H. (2015). Atrazine triggers the extrinsic apoptosis pathway in lymphocytes of the frogs *Phelophylax nigromaculata* in vivo. *Chemical Research in Toxicology*. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00238.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. (2005). A conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade*.v.1(1).p.147-155
- KRAUTER, P. W. (1993). Micronucleus incidence and hematological effects in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.v. 24 .p.487- 493
- LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA, M.; PELTZER, P. M.; STRINGHINI, G. A. Y. ATTADEMO, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* .v.587.p. 67-72.
- LAJMANOVICH, R.C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C.; ATTADEMO, A.M.; JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty and glufosinate-ammonium. *Mutation Research - Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*. v.769.p.7–12
- LEITE, G.B.; FRANCO-BELUSSI, L.F.; PROVETE, D.B.; OLIVEIRA, C. (2015). Comparative testis morphology of Neotropical anurans. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*.v.257. p. 29-38.
- LI, X.; LI, S.; LIU, S.; ZHU, G. (2010). Lethal effect and in vivo genotoxicity of profenofos to Chinese native amphibian (*Rana spinosa*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 59, p. 478-483.
- LIVINGSTONE, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.57.p. 195-211.
- LOFTS, B. (1974). Reproduction. In: LOFTS, B. (Ed.), *Physiology of the Amphibian*. 1st ed. Academic Press, New York, pp. 107–218
- LOVERIDGE, A.R.; BISHOP, C.A.; ELLIOTT, J.E.; KENNEDY, C.J. (2007). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides, bioaccumulated in green frogs, *Rana clamitans*, from the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v.79.p.315-318.
- 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
- MCDANIEL, T.V.; MARTIN, P.A.; STRUGER, J.; SHERRY, J.; MARVIN, C.H.; MCMASTER, M.E.; CLARENCE, S.; TETREAULT, G. (2008). Potencial endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from

areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*.v.88.p.230-242.

- MCGRAW, K.J. (2005). The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants?. *Animal Behaviour*.v. 69, 757–764.
- MMA/IBAMA. (2011). Ministério do Meio Ambiente / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite – Monitoramento do Bioma Cerrado 2009-2010.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*.v. 403.p. 853-858.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A. (1998). Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura Hylidae). *Biociências*. v.6 (1).p. 79–88.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R.. (2002). Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia Anura). *Revista Chilena de Anatomia* v.20 (3).p. 263–268.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A.; TABOGA, S.R. (2003). Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura Hylidae). *Caryologia* .v.56 (1).p.75–83.
- OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. (2012). Comparative Morphology of Anuran Testes.In:NEMOTO, Y.; INABA, N. Testis: Anatomy, Physiology and Pathology. *Nova Science Publishers*.p.111-126.
- OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L.Z.; SANTOS, L.R.S. (2017) .Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans. In: LARRAMENDY, M.L. Ecotoxicology and Genotoxicology :Non-traditional Models.United Kingdom. *The Royal Society of Chemistry*.p.125-138.
- OUELLET M., BONIN J., RODRIGUE J., DESGRANGES J. Y LAIR S. (1997), Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly in free-living anurans from agricultural habitats, *Journal of Wildlife Diseases*.v.33.p. 95-104.
- PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, C.; SANCHEZ, L.C.; ATTADAMO, A. M.; JUNGES, C. M.; BIONDA, C.; MARTINO, L. Y.; BASSÓ, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern of Argentina, *Herpetological Conservation and Biology*.v. 6.p. 432-442.
- PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes response in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science Pollution Research*.v.23(10).p.9852-9861.

- 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.
- RASTOGI, R.K.; BAGNARA, J.T.; IELA, L.; KRASOVICH, M.A. (1988). Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*. v.197 (3).p. 277–302.
- RELYEA, R.A. (2010). Multiple stressors and indirect food web effects of contaminants on herptofauna. In *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd ed. D.W. Sparling, G. Linder, C.A. Bishop, & S.K. Krest, Eds.: 475–486. SETAC Press. Pensacola, FL.
- RELYEA, R.A.; DIECKS, N. (2008). An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides at sublethal concentrations. *Ecological Applications*. V.18.p. 1728–1742
- ROHR, J.R.; SCHOTTHOEFER, A.M.; RAFFEL, T.R.; CARRICK, H.J.; HALSTEAD, N.; HOVERMAN, J.T.; JOHNSON, C.M.; JOHNSON, L.B.; LIESKE, C.; PIWONI, M.D.; SCHOFF, P.K.; BEASLEY, V.R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*. v.455.p.1235-1239.
- ROWE C. L., KINNEY, O. M. Y.; CONGDON, J. D. (1998), Oral deformities in tadpoles of the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat, *Copeia*, 1998: 244-246.
- 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.
- SANO, E.E.; ROSA, R.; BRITO, J.L. S; FERREIRA, L.G. (2008). Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 43, n.1, p. 153-156.
- 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.
- SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R; BORGES, R.E.; OLIVEIRA, C. (2014). Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anatomical Records*. v.297.p.864-875.
- SILVA, J. F.; FARINAS, M. R.; Felfili, J. M.; KLINK, C. A. (2006). Spatial heterogeneity, land use and conservation in the Cerrado region of Brazil. *Journal of Biogeography*. v. 33.p.536-548
- SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; RICHARDS, R.P.; DIXON, K.R.; KLAINE, S.J.; LAPOINT, T.W.; KENDALL, R.J.; GIDDINGS, J.M.; GIESY, J.P.; HALL,

- L.W.J. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*.v. 15: 76.
- SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M. (2009) Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, p. 1696-1703.
- SPARLING, D.W.; BICKHAM, J.; COWMAN, D.; FELLERS, G.M.; LACHER, T.; MATSON, C.W.; MCCONNELL, L. (2014). In situ effects of pesticides on amphibians in the Sierra Nevada. *Ecotoxicology*.v.24(2).p.262-278.
- 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. 104.p. 741-803.
- TRACHANTONG, W.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K.; CHAIYAPO, M. (2016).Lethal and sublethal effects of a methomyl-based insecticide in *Hoplobatrachus rugulosus*. *Journal of Toxicologic Pathology*. v.30(1);p.15-24.
- VALDUJO, P.H.; SILVANO, D.L.; COLLI, G.; MARTINS, M. (2012). Anuran Species Composition and Distribution Patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical Hotspot. *South American Journal of Herpetology*.v.7(2).p.63-78.
- VELÁSQUEZ, T.M.T.; MUÑOZ, L.M.H.; BAUTISTA, M.H.B. (2017). Toxicidade aguda del insecticida cipermetrina (CYPERMON 20 EC) on four species of colombian anurans. *Acta Biológica Colombiana*.v.22(3).p.340-347.
- 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* 78:249–55.
- VERRELL, P. (2000). Methoxychlor increases susceptibility to predation in the salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64:85–92.
- WAKE, M.H. (1968). Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. IN. The gonads and the fat bodies. *Journal of Morphology*. v.126 (3).p. 291–331.
- WAKE, D. (1991). Declining amphibian populations: A global phenomenon. *Science* 253, 860
- YILMAZ, Ş.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü.; COŞKUN, B.; BALLI, E.; ÖZGE, A.(2008). Effects of cypermethrin on isolated frog sciatic nerve: An ultrastructural study. *Turkish Journal of Medical Sciences* .v.38(2).p.121- 125.

YIN, X.H.; ZHU, G.N.; LI, X.B.; LIU, S.Y. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. *Mutation Research*, v. 680, p. 2-6.

CAPÍTULO 1

Morfologia testicular comparativa de anuros do Cerrado em área agrícola e unidade de conservação

Wadson Rodrigues Rezende¹; Lia Raquel de Sousa Santos²; Lilian Franco Belussi³; Classius de Oliveira⁴.

^{1,4} Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP)

³ Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Campus Sorocaba

² Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde- GO

RESUMO: As intensas atividades agrícolas, além de grandes transformações nas paisagens naturais, carregam consigo inúmeros insumos químicos que contaminam o ambiente. Os agroquímicos são desreguladores endócrinos em potencial, podendo interferir nas sinalizações hormonais de organismos não alvos, como os anuros, levando a alterações nos órgãos reprodutivos dos animais. Neste contexto, este estudo objetivou a comparação da morfologia testicular de três espécies de anuros do cerrado (*Dendropsophus minutus*; *Boana albopunctata* e *Physalaemus cuvieri*), provenientes de área agrícola e unidade de conservação. Não foram observadas alterações morfológicas no epitélio seminífero entre os ambientes, entretanto, a arquitetura foi bastante diferente entre as espécies, principalmente quanto à forma e tamanho dos lóculos seminíferos, além da disposição do tecido intersticial. Foi observado um indivíduo de cada espécie com presença de ovócitos testiculares, sendo esses encontrados nos dois tipos de ambientes. Apenas *D. minutus* apresentou diferença estatística na medida do diâmetro dos lóculos seminíferos, tendo menores médias na área agrícola, além disso, *P. cuvieri* teve a área pigmentar aumentada nesse ambiente. Mesmo que em nível morfológico não tenha havido maiores diferenças entre os ambientes, já são bem documentados os efeitos deletérios que os agroquímicos exercem nos testículos de anuros, sendo várias anormalidades relatadas. A resposta evidenciada pela pigmentação testicular, observada apenas em *P. cuvieri*, sugere que essas células pigmentares podem configurar uma linha de defesa frente a agentes xenobióticos, como os agroquímicos. Ainda que a morfologia geral dos testículos tenha sido similar mesmo em cenários tão distintos, estudos adicionais são necessários para se testar o funcionamento das gônadas e suas células constituintes.

Palavras chave: Anfíbios; testículos; agricultura.

INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores responsáveis pelo declínio mundial de anuros são as práticas agrícolas intensivas (Davidson et al., 2004; Grisolia, 2005). Essas atividades são responsáveis por grandes transformações nas paisagens naturais e ameaças à biodiversidade, incluindo o bioma Cerrado, considerado um *hotspot* de biodiversidade, e que sofre com a perda da sua cobertura vegetal em função da expansão da agricultura (Fearnside, 2001; Klink e Machado, 2005; Silva et al, 2006; Cunha et al., 2008). Além disso, para a otimização dos cultivos, muitos processos tecnológicos mecânicos e bioquímicos são implementados, tais como agrotóxicos, fertilizantes e corretivos de solo, irrigação sem controle, entre outros (Cunha et al., 2008).

Organismos vivos em agroecossistemas, como os anuros, estão excessivamente expostos aos agroquímicos (Vera-Candioti et al., 2010), sendo estes detentores de características que os tornam extremamente susceptíveis aos efeitos dos xenobióticos, como seu ciclo de vida duplo com fase larval aquática e fase adulta terrestre, na maioria das vezes (Blaustein et al., 1994; 2011), estando susceptíveis as perturbações nesses dois ambientes. Além disso, esses organismos possuem alta permeabilidade cutânea (Quaranta et al., 2009), e baixa taxa de dispersão (Blaustein et al., 1994).

Desta forma, visando facilitar as investigações sobre como se encontram os anuros vivos em áreas agrícolas, a utilização de biomarcadores internos, como a morfologia testicular e suas estruturas, pode tornar possível identificar a presença de contaminantes químicos ou a magnitude de resposta frente a esses agentes, resposta essa que, muitas vezes, não poderia ser evidenciada no organismo em uma escala macroscópica (Livingstone, 1993).

O arranjo histológico testicular dos anuros 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, em algumas espécies, também abrigam os melanócitos testiculares (Oliveira e Vicentini, 1998; Franco-Belussi et al., 2009;

2012; Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Leite et al., 2015). Essas células pigmentares testiculares são componentes do sistema pigmentar interno e acumulam melanina em seu citoplasma, com a função de proteger os tecidos de 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, como histopatologias na arquitetura testicular como desorganização das unidades seminíferas, incidência de ovócitos, diminuição do volume testicular, inerentes a exposição experimental (Hayes et al., 2003; 2010a; Çakici, 2013; 2015) ou ambiental (McDaniel et al., 2008; Sanchez et al., 2014; McCoy et al., 2017) a esses compostos. Tais químicos atuam como desreguladores endócrinos, podendo interferir na sinalização hormonal desses animais e na regulação de processos fisiológicos (Guillete et al., 1995; Davidson et al., 2004; Mann et al., 2009), além de alterar a anatomia e a fisiologia dos organismos, os agroquímicos podem também afetar o comportamento e função das estruturas e órgãos reprodutivos, resultando em anormalidades, e consequente falhas reprodutivas, diminuindo o recrutamento de indivíduos nas populações de anuros, podendo afetar diretamente as comunidades (Guillete et al., 1995; Hayes et al., 2003; 2010a,b; McCoy et al., 2008).

Neste contexto, este estudo teve por objetivo comparar a morfologia testicular de anuros do Cerrado, provenientes de área agrícola e unidade de conservação. Procuramos investigar se animais expostos a ambientes agrícolas e seus insumos químicos apresentam alterações nos testículos, as quais poderiam afetar a condição reprodutiva desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de espécimes e processamento

Foram coletados machos adultos de três espécies de anuros (*Dendropsophus minutus*, *Boana albopunctata* e *Physalaemus cuvieri*) em ambiente agrícola e área natural preservada. No ambiente agrícola (AA), os

indivíduos foram coletados em poças permanentes e semipermanentes em curvas de nível de cultivo de soja, no município de Rio Verde – GO (17° 47' 51,99"S, 50° 54' 03,56" O). No caso de ambiente natural, os indivíduos foram coletados em Unidade de Conservação (**UC**), em poças permanentes margeadas por vegetação típica do Cerrado no Parque Nacional das Emas, município de Mineiros – GO (18°15,573'S, 052° 53,307'O). Adicionalmente, nesses ambientes foram coletadas amostras 1000mL de água as quais foram encaminhadas para Laboratório de análise de água (A3Q, Cascavel – Paraná) e submetidos a cromatografia gasosa e líquida e espectrometria de massa, para verificação de compostos organoclorados, organofosforados e carbamatos de acordo com a Portaria 2.914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde.

Para cada espécie foi amostrado um total de 10 indivíduos (n = 10) em cada um dos ambientes, através excursões noturnas durante os meses de outubro e novembro de 2014 e 2016, no período de atividade reprodutiva desses animais, onde só foram coletados machos em plena atividade de vocalização (Licença SISBIO nº34485-1).

Após coletados, os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano, Campus de Rio Verde (IF Goiano), Goiás, onde foram eutanasiados em anestésico (Benzocaína, 5g/L) e destinados às análises anatômicas e morfológicas. Os animais tiveram a massa (g) obtida em balança analítica de modelo AUW-220D (precisão de 0,0001g).

Em seguida, os testículos foram removidos, pesados (g) em balança analítica, e medidos em seu eixo maior (mm) com paquímetro digital (precisão 0,01mm), sendo direcionados para fixação em solução de Metacarn (60% Álcool metílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, seguindo para desidratação em série alcoólica e inclusão em historesina do tipo metacrilato glicol (Historesin Leica®).

Avaliação morfológica

Foi calculado o índice gonadossomático desses animais consistindo na massa dos testículos (direito e esquerdo somados) em razão da massa total do animal, dado em porcentagem.

Para cada animal, 25 secções transversais dos testículos de 2 µm foram obtidas em cortes em micrótomo (Leica® RM2255) com cerca de 10 µm de distância entre uma secção e outra, coradas em H-E, fotomicrografadas em Microscópio Leica® DM 4B, no Laboratório de Anatomia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, São Paulo.

Em relação à morfologia geral, foram analisadas as características da arquitetura testicular, tais como a estruturação locular, aspectos do espaço intersticial, conformação dos cistos espermatozóides e possíveis histopatologias, de acordo com Çakiçi (2013; 2015).

Foi realizada a medição do diâmetro de 100 lóculos seminíferos inteiros, escolhidos aleatoriamente. Esse parâmetro consistiu na medida linear do maior eixo de cada lóculo, usando a ferramenta de criação de linha no *software* Image Pro-Plus 6.0.

Para a espécie *P. cuvieri*, foi quantificado a área pigmentar testicular obtida por quantificação, utilizando ferramenta de diferença de coloração no *software* Image Pró-plus 6.0 (segundo Santos et al. 2014, com adaptações).

Para as análises estatísticas foi então realizado um teste de Modelos Lineares Generalizados (GLM), tendo por variável preditora os tipos de ambientes (variável categórica de dois níveis) nos caracteres morfométricos testiculares (variáveis resposta contínuas). As análises estatísticas dos parâmetros foram executadas pelo programa R v.3.4.3 (R Development Core Team), sendo considerado o valor de $p < 0,05$ como significativo. Este teste foi aplicado para todos os parâmetros selecionados sendo eles: diâmetro locular, área pigmentar e índice gonadosomático.

Para a comparação do diâmetro locular, além de testar o efeito dos ambientes, foi considerado também o fator “espécies”. Para controlar a interdependência entre as fotomicrografias e entre os animais, foi adicionado a análise estatística outras co-variáveis (indivíduos amostrados, quantidade de fotos). Quanto à pigmentação, houve a comparação da área pigmentar entre os dois cenários, com também a adição das co-variáveis

O índice gonadosomático foi comparado tanto entre os ambientes quanto entre as espécies.

RESULTADOS

Avaliação Morfológica

Histologicamente, não houve diferenças evidentes da morfologia testicular das espécies entre os ambientes, porém, cada espécie apresentou características particulares quanto à arquitetura, como o formato e tamanho dos lóculos seminíferos e a disposição do tecido intersticial (Figura 1). Em *D. minutus* (Fig.1A) os lóculos foram mais arredondados e com diâmetro médio menor do que *B. albopunctata*, a qual mostrava formatos mais alongados (Fig. 1C). Já *P. cuvieri* apresentou lóculos com diferentes formatos, sendo encontradas tanto as formas alongadas quanto as arredondadas (Fig. 1E). Com relação à arquitetura intersticial, *D. minutus* apresentou um espessamento formado por aglomerados de células intersticiais, em alguns pontos de intersecção entre lóculos (Fig. 1B); em *B. albopunctata* esse espessamento foi bastante evidente, o qual se distribui além das interseções, de forma a margear os lóculos, sendo visível até duas fileiras de células entre os lóculos (Fig. 1D). Em *P. cuvieri*, esse tecido tem distribuição mais discreta, além disso, houve a presença dos melanócitos testiculares margeando os lóculos (Fig. 2F).

No que tange ainda a arquitetura histológica, relata-se que foram encontradas disposições anatômicas interessantes, a exemplo cita-se a disposição dos ductulos testiculares (Figura 2), onde em alguns casos houve a junção de dois lóculos através de pontes ductulares observado apenas em *D. minutus* e *P. cuvieri* (Fig. 2-B, D). Foi evidente também a continuidade da estrutura locular com seus ductulos (Fig. 2A, C,E), bem como esteve visível a confluência dos espermatozoides saindo do lúmen locular em direção a um ductulo eferente (Fig. 2A,E).

Dentro das unidades seminíferas estão as células germinativas (Figura 3), sendo que as três espécies apresentaram o padrão de espermatogênese de forma cística, onde cada tipo celular se encontra retido por projeções das células de Sertoli, de forma que os cistos espermatogônias se encontram próximas à parede locular, sendo as primárias geralmente as maiores células do ciclo espermatogênico, com grandes núcleos pouco condensados, já os cistos de espermatogônias secundárias apresentam mais células com núcleos fortemente corados, têm formas pouco definidas cujos cistos formam rosetas sendo comum vê-las aos pares, produto de sucessivas divisões mitóticas. Os

cistos de espermátocitos primários são mais numerosos, com núcleos menores, mais densos e arredondados que suas antecessoras, já os espermátocitos secundários, apresentam núcleos ainda menores e mais densos com relação aos espermátocitos primários, e seus cistos apresentam certa vacuolização proveniente da perda de citoplasma, dando início ao processo de espermiogênese. As próximas células do processo são as espermátides, essas podem ser encontradas em duas diferentes morfologias: arredondadas, com aspecto puntiforme em secção transversal, ou espermátides alongadas formando feixes. Por fim, os espermatozoides se encontram em feixes ou em grandes massas livres no lúmen locular. Todos os tipos celulares da linhagem espermatogênica foram observados nas três espécies indiferente dos ambientes amostrados.

Ainda relacionado ao tecido germinativo masculino, foi detectada a presença de ovócitos (Figura 4) em um indivíduo de *D. minutus* proveniente da área agrícola (Fig. 4A, B), e em *P. cuvieri* e *B. albopunctata* coletados em ambiente preservado (Fig. 4C-F). Em *D. minutus*, o ovócito assumiu uma posição central no lóculo, em *P. cuvieri* este é visivelmente a ligado à parede locular, e em ambas as espécies o ovócito está margeado pelas células espermatogênicas (Fig. 4C, D). Já em *B. albopunctata* esta célula ocupou toda a extensão de um lóculo seminífero (Fig. 4E, F).

Quanto à comparação do diâmetro locular, houve diferença significativa quando comparado entre as espécies, e somente *D. minutus* apresentou diferença na comparação entre os ambientes, sendo que na área agrícola as médias foram menores que na unidade de conservação (Tabela 1 e 2, Fig. 5A).

Com respeito à pigmentação testicular observada em *P. cuvieri*, esta demonstrou-se maior nos animais de ambiente agrícola (Tabela 1, Fig. 5B e Fig. 6).

O índice gonadosomático não apresentou diferença entre os ambientes (Tabela 1), porém houve em comparação entre as espécies (Tabela 2).

As análises realizadas nas amostras de água detectaram 28 tipos de agroquímicos (Tabela 3) no ambiente agrícola, sendo que a atrazina estava muito acima dos valores permitidos pela legislação. Na amostra da unidade de conservação, não foi evidenciado valores consideráveis para os agroquímicos.

DISCUSSÃO

Os efeitos das pressões agrícolas nem sempre podem ser notados em determinados níveis, como de caráter histomorfológico. Entretanto, quando se utiliza ferramentas biométricas do epitélio germinativo outras condições podem ser verificadas, podendo haver modificações nas estruturas seminíferas, como diminuição do diâmetro testicular e aumento da distribuição das células pigmentares, evidenciados neste estudo. Esses efeitos podem refletir no sucesso reprodutivo, e consequentemente na dinâmica das comunidades sendo diretamente relacionadas à perda de biodiversidade e declínio das populações de anuros (Davidson et al., 2004; Grisolia, 2005).

Morfologia geral

Histologicamente, a arquitetura testicular das três espécies apresentou-se similar ao já relatado na literatura, sendo que neste arranjo os testículos são estruturados em unidades seminíferas arredondadas denominadas lóculos, sustentados por tecido conjuntivo (Oliveira e Vicentini, 1998). Esse tecido intersticial é constituído por células somáticas e imunes, além de fibras colágenas e reticulares e para algumas espécies como *P. cuvieri*, também abriga os melanócitos, que são células contendo melanina em seu citoplasma, conferindo ao órgão uma coloração escura (Franco-Belussi et al., 2009; 2012; Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Leite et al., 2015).

Os lóculos seminíferos são as unidades que comportam as células germinativas, que para os anuros essas se dispõem em cistos espermatogênicos, formados pelas projeções citoplasmáticas das células de Sertoli, onde cada cisto comporta células em um mesmo estágio de diferenciação do processo espermatogênico (Wake, 1968; Lofts, 1974; Rastogi et al., 1988; Oliveira e Vicentini, 1998; Oliveira et al., 2002; 2003). É comum observar nesse arranjo os cistos das células iniciais (espermatogônias) dispostos na margem do lóculo e com o desenvolver do processo meiótico estas células tendem a se direcionar para o lúmen onde geralmente encontram-se feixes de espermátides alongadas ou espermatozoides livres (Santos e Oliveira, 2007; 2008; Santos et al., 2011).

Assim como o observado nas três espécies, cada lóculo seminífero termina em uma porção desprovida de epitélio germinativo que convergem

para múltiplos ductulos que, posteriormente, saíram dos testículos em direção aos rins, disposição essa relatada também para *Lithobates catesbeianus* (Rheubert et al., 2017); *Discoglossus pictus* (Piprek et al., 2013); *Euphlyctis cyanophlyctis*, *Fejervarya limnocharis*, *Polypedates maculatus*, *Microhyla rubra*, *Duttaphrynus melanostictus* e *D. scaber* (Hiragond e Saidapur, 2000). Contudo, como não há literatura clara de como é o caminho espermático e pouco se sabe a cerca dos ductulos intratesticulares, em hipótese, a formação de pontes ductulares pode ser uma alteração morfofuncional relacionada à demanda reprodutiva desses animais, estando sujeita a sazonalidade do ciclo reprodutivo.

As diferenças da arquitetura testicular entre as espécies podem ser justificadas com base nos padrões morfológicos testiculares apresentados pelas famílias de anuros, já que tamanho do testículo, diâmetro locular, largura da área intersticial, número e forma dos lóculos seminíferos e pigmentação diferem de acordo com os clados estudados (Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Leite et al., 2015). Entretanto, visto que a diferença significativa para o diâmetro locular foi notada apenas em uma espécie entre os ambientes, este parâmetro pode não ser uma medida eficiente para associação dos efeitos dos agroquímicos, já que esta característica é influenciada também pelas flutuações relacionadas ao ciclo reprodutivo, e até mesmo pela condição nutricional desses animais (Guha et al., 1980; Emerson, 1997; Ko et al., 1998).

Contudo, diversos são os efeitos deletérios que os agroquímicos exercem nos testículos dos anuros, sendo relatadas varias histopatologias testiculares frente à exposição a esses compostos, como exemplo, nas rãs *Pelophylax bedriagae* e *Bufotes variabilis* submetidas a diferentes concentrações do inseticida Carbaryl apresentaram diminuição e deformidades dos túbulos seminíferos, aumento da área intersticial e aumento da frequência de células espermáticas em necrose (Çakici, 2013; 2015). Em *B. variabilis* esse inseticida causou necrose, hemorragia e desarranjos nos túbulos, bem como vacuolização e necrose das células germinativas, mostrando o potencial impacto que esses compostos têm, podendo levar a efeitos prejudiciais a espermatogênese e debilidade na fertilidade desses machos (Çakici, 2013; 2015).

Ainda sobre o epitélio seminífero, foi encontrada uma baixa frequência de ovócitos testiculares, sendo eles presentes em um indivíduo de *D. minutus* provenientes de área agrícola e em *P. cuvieri* e *B. albopunctata* coletados no ambiente preservado. Há certa controvérsia acerca da relevância da ocorrência dos ovócitos testiculares em anfíbios como indicador de efeitos de xenobióticos, levando em conta que a presença deles pode ser resultante de processos naturais do desenvolvimento gonadal (Jooste et al., 2005; Storrs-Méndez e Semlitsch, 2010). Além disso, algumas espécies apresentam padrões de desenvolvimento gonadal em tipos semi-diferenciados, onde as gônadas diferenciam-se inicialmente em ovários, independentemente do sexo genético, e posteriormente quando machos genéticos, este ovário se transforma em testículo, seguido por degeneração dos ovócitos e reorganização da gônada (Gramapurohit et al., 2000; Saidapur et al., 2001). Logo, esse ponto crucial de transformação da gônada pode estar sujeito a eventos estocásticos, podendo manter células ovarianas mesmo depois do desenvolvimento testicular. Outro fator é a grande capacidade de diferenciação apresentada pelos tipos celulares iniciais da espermatogênese, Kobayashi et al. (2015), ao exporem juvenis e sub-adultos de *Rana temporaria* a hormônios estrógenos, evidenciaram a formação de ovócitos a partir de espermatogônias primárias e secundárias iniciais, evidenciando o potencial de diferenciação que essas células mantem mesmo em machos reprodutivamente aptos.

Contudo, essa anomalia também vem sendo associada aos ambientes agrícolas, inclusive para *P. cuvieri*, onde Moresco et al. (2014) encontraram uma alta frequência desses ovócitos nesta espécie, em contraponto ao aqui relatado. Além disso, a presença dessas células em outras espécies de anuros é interpretado por alguns autores, como um indicador de efeito desmasculinizante exercido pelos cenários agrícolas e seus agroquímicos (Hayes et al., 2003; 2010a; Smith et al., 2005; Spolyarich et al., 2011; Sanchez et al., 2014), sendo relatada a ocorrência desde juvenis a adultos e, sobretudo, correlacionados ao herbicida Atrazina (Hayes et al., 2003; 2010a; Murphy et al., 2006; McDaniel et al., 2008; Trachantong et al., 2013), composto este, que foi detectado com valores altos na amostra de água da área agrícola, neste estudo.

Outra característica bastante peculiar evidenciada em alguns anuros é a pigmentação interna, como a encontrada nos testículos de *P. cuvieri*. A melanina presente nessas células pigmentares confere a esse tipo celular varias funções de proteção a agentes estressores, como radiação ultravioleta (Franco-Belussi et al., 2016), variação térmica (Santos et al., 2014), atividade neutralizadora de radicais livres (McGraw, 2005), respostas a compostos de bactérias (Franco-Belussi e Oliveira, 2011; Franco-Belussi et al., 2014), e respostas a xenobióticos, incluindo os agroquímicos (Oliveira et al., 2017). Em nosso estudo, foi evidenciado que em *P. cuvieri* a pigmentação testicular foi maior no ambiente agrícola quando comparado com a unidade de conservação. Respostas similares foram relatadas por Sanchez et al. (2014) e Oliveira et al. (2017) para *Rhinella fernandezae* e *P. cuvieri*, respectivamente, onde anuros viventes em agrossistemas mostraram uma área pigmentar maior do que os animais viventes em ambientes sem a influência dessa matriz. Desta forma é possível sugerir que esse tipo celular também pode atuar como uma linha de defesa frente aos agroquímicos.

Quanto ao índice gonadossomático, resultados similares já foram relatados para outros anuros em cenários agrícolas ou em exposição a agroquímicos, para outras espécies de anuros como em *Lithobates clamitans*, *L. catesbeianus*, *L. pipiens* (Murphy et al., 2006; Knight et al., 2013); *Fejervarya limnocharis* (Thammachoti et al., 2012); *B. pulchella* (Brodeur et al., 2012) e *Xenopus laevis* (Hecker et al., 2004; 2005), sendo que mesmo que não tenha havido diferença significativa, estes autores relatam outros efeitos como alterações na testosterona plasmática e contagem de espermatozoides. Além disso, é esperada a diferença interespecífica encontrada no índice, levando em conta que alguns fatores ecológicos exibem relações com o tamanho testicular e suas estruturas como, por exemplo, níveis de hormônios andrógenos, tamanho da desova, comportamento de poliandria, que leva a competição espermática, entre outros (Emerson, 1997; Prado e Haddad, 2003).

É notório que os efeitos deletérios que os agroquímicos exercem, sejam de forma isolada ou em misturas complexas, pois nas amostras de água no ambiente agrícola foram detectados 28 tipos diferentes de agroquímicos sendo que a atrazina estava com valores muito acima do permitido pela legislação

brasileira (valor encontrado: 5349,940 µg/L, valor referencial: 2 µg/L). Na literatura, diversos são os efeitos da atrazina nos anuros, sendo fortemente associada como agente feminizador, causando diversas anormalidades, como eliminando caracteres sexuais secundários (e.g., calos nupciais, diminuição da musculatura da laringe, responsável pelo controle de vocalização de machos); causando diminuição da testosterona plasmática; anormalidades gonadais como lóculos mal formados, diminuição de células germinativas, maiores incidências de ovócitos, entre outras mal formações gonadais (Hayes et al., 2003 ;2010a; Sai et al.,2015). Ademais, muitas vezes a exposição a misturas de agroquímicos pode causar mais impacto do que um composto isolado (Relyea, 2009), sendo que de forma direta leva ao aumento da letalidade (Hua e Relyea, 2014), mas também pode induzir imunossupressão, deixando os anuros mais susceptíveis a patógenos como fungos (Buck et al., 2015), de forma que esse sinergismo entre efeitos torna o cenário de declínio mundial de anfíbios muito mais complexo e intenso (Blaustein et al.,1994; 2011).

CONCLUSÕES

Em suma, em caráter morfológico geral não houve alterações visíveis na arquitetura testicular, entretanto, quando analisados caracteres morfométricos, alguns parâmetros exibiram diferença significativa na comparação ambiental, sendo que em *D.minutus* o diâmetro dos lóculos seminíferos foi menor na área agrícola; porém esse parâmetro não configura um bom indicador, já que nas outras espécies não houve essa diferença. Em *P. cuvieri* a pigmentação testicular foi diferente entre os ambientes, de forma a aumentar no ambiente com agricultura, levando a sugerir que essas células podem conferir uma proteção frente a agentes xenobióticos, como os agroquímicos.

Mesmo não tendo sido detectados maiores efeitos na morfologia testicular no presente estudo, é importante salientar que esses animais estão expostos a uma gama de agroquímicos evidenciados na amostra de água, sendo extensiva a literatura sobre os efeitos desses contaminantes nos anuros. Outro ponto a ser considerado é que, mesmo apresentando todas as células da linhagem germinativa nos dois cenários, a morfologia como ferramenta não confere informações a cerca da viabilidade dessas células, que podem ter

extenso dano genético, interferindo nos processos reprodutivos dos anuros do cerrado, com reflexo na dinâmica das comunidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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* .v.8.p.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.
- BRODEUR, J.C.; CANDIOTI, J.V.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L.; RONCO, A.E. (2012). Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from na Agroecosystem Experiencing Severe Drought. *Journal of Herpetology*.v.46(1).p.72-78.
- 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.
- ÇAKICI, Ö. (2013). Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of Levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91.1 : 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.
- 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.
- DAVIDSON, C. (2004). Declining Downwind: Amphibian Population Declines in California ans Historical Pesticides Use. *Ecological Applications*.v.14(6).p.1892-1902.
- EMERSON, S.B. (1997). Testis size variation in frogs: testing the alternatives. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v.41.p. 227–235.
- FEARNSIDE, P. M. (2001). Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. *Environmental Conservation*.v. 28.p. 23-38.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. (2009). Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *The Anatomical Records*. v.292. p. 178-182.

- FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. (2011). Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura:Leuperidae). *Zoology*.v.114.p.298-305.
- FRANCO-BELUSSI, L; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R; OLIVEIRA, C. (2012). Visceral Pigmentation in Three Species of the Genus *Scinax* (Anura: Hylidae): Distinct Morphological Pattern. *The Anatomical Records* v.295. p. 298-306.
- FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G.B.; FREITAS, J.S.; OLIVEIRA, C. (2014). Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Animal Biology*.v.64.p.261-275.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H.N.; OLIVEIRA, C. (2016). Internal Pigment Cells Respond to External UV Radiation in Frogs. *The Journal of Experimental Biology*.v.210.p.1378-1383.
- 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. *Environ Health Perspect* .v.103(4).p.31-36.
- GRAMAPUROHIT, N.P.; SHANBHAG, B.A.; SAIDAPUR, S.K. (2000). Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipis*. *Geneneral and Comparative Endocrinology* .v.119.p. 256–264.
- GRISOLIA, C.K. (2005). Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: UNB.
- GUHA,K.; JORGENSEN, B.; LARSEN, L.O. (1980). Relationship between nutritional state and testes function,together with observations on patterns of feeding,in the toad, *Bufo bufo bufo*. *Journal of Zoology*.v.191.p.147-155.
- HAYES, T.B.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; 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.

- HECKER, M.; GIESY, J.P.; JONES, P.D.; JOOSTE, A.M.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.R.; SMITH, E.E.; VAN DER KRAAK, G.; KENDALL, R.J.; DU PREEZ, L. (2004). Plasma Sex Steroid Concentrations and Gonadal Aromatase Activities in African Clawed Frog (*Xenopus laevis*) from South Africa. *Environmental Toxicology Chemistry*.v.23(8).p.1996-2007.
- HECKER, M.; PARK, J.W.; MURPHY, M.B.; JONES, P.D.; SOLOMON, K.R.; VAN DER KRAAK, G.; CARR, J.A.; SMITH, E.E.; DU PREEZ, L.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. (2005). Effects of Atrazine on CYP19 Gene Expression and Aromatase Activity in Testes and on Plasma Sex Steroid Concentrations of Male African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicological Sciences*.v.86(2).p.273-280.
- HIRAGOND, N.C.; SAIDAPUR, S.K. (2000). The Excurrent Duct System of Sperm Transport in *Rana cyanophlyctis*, *Rana limnocharis*, *Polypedates maculatus*, *Microhyla rubra*, *Bufo melanostictus* and *Bufo fergusonii*. *Zoological Science*.v.17.p.453-458.
- 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.
- JOOSTE, A.M.; DU PREEZ, L.H.; CARR, J.A.; GIESY, J.P.; GROSS, T.S.; KENDALL, R.J.; SMITH, E.E.; VAN DER KRAAK, G.L.; SOLOMON, K.R. (2005). Gonadal development of larval male *Xenopus laevis* exposed to Atrazine in outdoor microcosms. *Environmental Science & Technology*.v. 39.p. 5255-5261.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*.v.19.p.707-713.
- KNIGHT, L.A.; CHRISTENSON, M.K.; TREASE, A.J.; DAVIS, P.H.; KOLOK, A.S. (2013). The spring runoff in Nebraska's (USA) Elkhorn River watershed and its impact on two sentinela organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*.v.32(7).p.1544-1551.
- KO, S.K.; KANG, H.M.; IM, W.B.; KWON, H.B. (1998). Testicular cycles in three species of Korean Frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugulosa* and *Rana dybowskii*. *General and Comparative Endocrinology*.v.111.p.347-358.
- KOBAYASHI, T.; KUMAKURA, M.; YOSHIE, S.; SUGISHIMA, T.; HORIE, Y. (2015). Dynamics of Testis-ova in a Wild Population of Japanese Pond Frogs, *Rana nigromaculata*. *Journal Experimental Zoology*.v.323.p.74-79.
- LEITE, G.B.; FRANCO-BELUSSI, L.F.; PROVETE, D.B.; OLIVEIRA, C. (2015). Comparative testis morphology of Neotropical anurans. *Zoologischer Anzeiger- A Journal of Comparative Zoology*.v.257. p. 29-38.

- LIVINGSTONE, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.57.p. 195-211.
- LOFTS, B. (1974). Reproduction. In: LOFTS, B. (Ed.), *Physiology of the Amphibian*. 1st ed. Academic Press, New York, pp. 107–218
- MANN, R.M.; HYNE, R.V.; CHOUNG, C.B.; WILSON, S.P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risk in a complex environment. *Environmental Pollution*. v. 157. p. 2903-2927.
- MCCOY, K.A.; BORTNICK, L.J.; CAMPBELL, C.M.; HAMLIN, H.J.; GUILLETTE, L.J.; ST MARY, C.M. (2008). Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*. 116(11):1526-1532.
- MCCOY, K.A.; AMANTO, C.M.; GUILLETTE JR, 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
- MCDANIEL, T.V.; MARTIN, P.A.; STRUGER, J.; SHERRY, J.; MARVIN, C.H.; MCMASTER, M.E.; CLARENCE, S.; TETREAULT, G. (2008). Potencial endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*.v.88.p.230-242.
- MCGRAW, K.J. (2005). The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants?. *Animal Behaviour*. v.69. p. 757–764.
- MORESCO, R.M.; MARGARIDO, V.P.; OLIVEIRA, C. (2014). A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. *Environmental Research*. v. 132. p. 6-11.
- MURPHY, M.B.; HECKER, M.; COADY, K.K.; TOMPSETT, A.R.; JONES, P.D.; DU PREEZ, L.H.; EVERSON, G.J.; SOLOMON, K.R.; CARR, J.A.; SMITH, E.E.; KENDALL, R.J.; VAN DER KRAAK, G.; GIESY, J.P. (2006). Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicology*.v.26.p.230-245.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A. (1998). Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura Hylidae). *Biociências*. v.6 (1).p. 79–88.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. (2002). Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia Anura). *Revista Chilena de Anatomia* v.20 (3).p. 263–268.

- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A.; TABOGA, S.R. (2003). Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura Hylidae). *Caryologia* .v.56 (1).p.75–83.
- OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. (2012). Comparative Morphology of Anuran Testes.In: NEMOTO,Y.; INABA, N. Testis: Anatomy, Physiology and Pathology. *Nova Science Publishers*.p.111-126.
- OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI ,L.Z.; SANTOS, L.R.S. (2017). Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans. In: LARRAMENDY, M.L. Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Models. United Kingdom. *The Royal Society of Chemistry*.p.125-138.
- PIPREK, R.P.; PECIO, A.; SZYMURA, J.M. (2013). Modifications of the Testis in Response to Sperm Bundle Foormation in the Mediterranean Painted Frog *Discoglossus pictus* Otth, 1837(Amphibia: Anura: Discoglossidae). *Journal of Herpetology*.v.47(2). p.331-336.
- PRADO, C.P.A.; HADDAD, C.F.B.; (2003).Testes Size in Leptodactylid Frogs and Occurrence of Multimale Spawning in the Genus *Leptodactylus* in Brazil. *Journal of Herpetology*.v.37(2).p.354-362.
- QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE, C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* 4:1–4.
- RASTOGI, R.K.; BAGNARA, J.T.; IELA, L.; KRASOVICH, M.A. (1988). Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*. v.197 (3). p. 277–302.
- RELYEA, R.A. (2009). A Cocktail of Contaminants:how Mixtures of Pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*.v.159.p.363-376.
- RHEUBERT, J.L.; COOK, H.E.; SIEGEL, D.S.; TRAUTH, S.E. (2017). Histology of the Urogenital System in the American Bullfrog (*Rana catesbeiana*), with Emphasis on Male Reproductive Morphology. *Zoological science*.v.34.p.445-451.
- 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.

- SAIDAPUR, S.K.; GRAMAPUROHIT, N.P.; SHANBHAG, B.A. (2001). Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology* .v.124.p. 115–123.
- 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. (2007). Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*.v.24(1).p.64-70.
- 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.
- SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. (2011). Germ Cell Dynamics during the Annual Reproductive Cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoological Science*.v.28.p.840-844.
- SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R; BORGES, R.E.; OLIVEIRA, C. (2014). Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anatomical Records*.v.297.p.864-875.
- 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.
- SMITH, E.E.; DU PREEZ, L.H.; GENTLES, A.; SOLOMON, K.R.; TANDLER, B.; CARR, J.A.; VAN DER KRAAK, G.L.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P.; GROSS, T.S. (2005). Assessment of laryngeal muscle and testicular cell types in *Xenopus laevis* (Anura Pipidae) inhabiting maize and nonmaize growing areas of South Africa. *Afr. J. Herpetology*. v.54.p. 69–76.
- SPOLYARICH, N.; HYNE, R.V.; WILSON, S.P.; PALMER, C.G.; BYRNE, M. (2011). Morphological abnormalities in frogs from a rice-growing region in NSW, Australia, with investigations into pesticides exposure. *Environmental Monitoring Assessment*. V. 173. p. 397-407.
- STORRS-MÉNDEZ, S.I.; SEMLITSCH, R.D. (2010). Intersex gonads in frogs: understanding the time course of natural development and role of endocrine disruptors. *Journal of Experimental Zoology: Molecular and Developmental Evolution*. v. 314B.p. 57-66.
- THAMMACHOTI, P.; KHONSUE, W.; KITANA, J.; VARANUSUPAKUL, P.; KITANA, N. (2012). Morphometric and Gravimetric Parameters of the Rice Frog *Fejervarya limnocharis* Living in Areas with Different Agricultural Activity. *Journal of Environmental Protection*.v.3.p.1403-1408

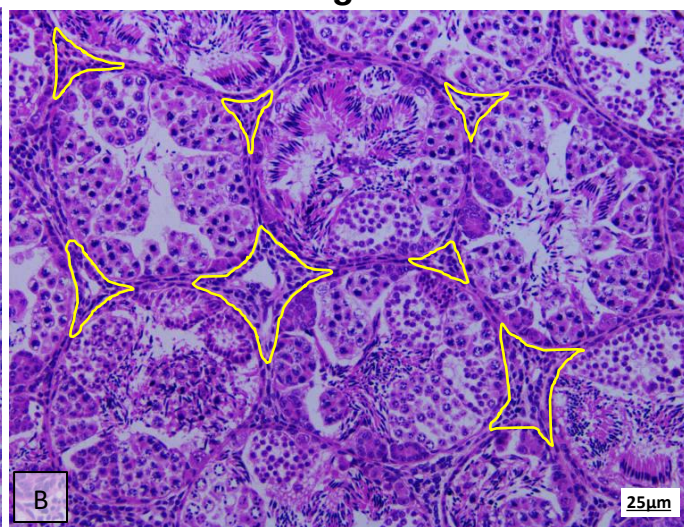
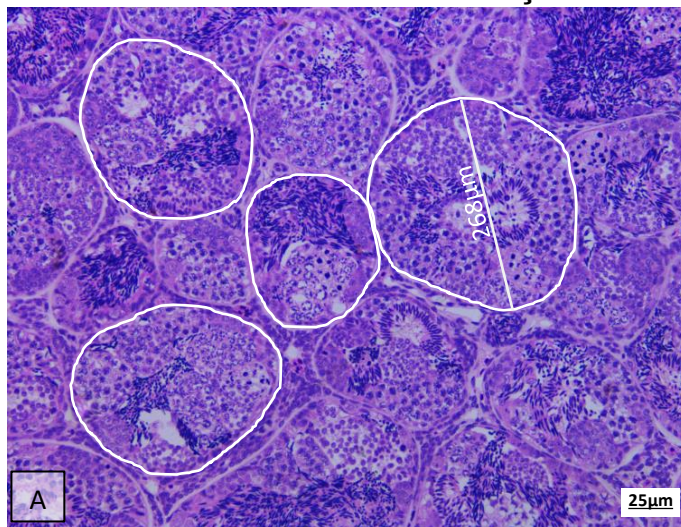
- TRACHANTONG, W.; PROMYA, J.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. (2013). Effects of atrazine herbicide on metamorphosis and gonadal development of *Hoplobatrachus rugulosus*. *Maejo Internacional Journal of Science and Technology*. v.7. p.p 60-71.
- VERA-CANDIOTI, J.; NATALE, G.S.; SOLONESKI, S.; RONCO, A.E.; 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.
- WAKE, M.H. (1968). Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. IN. The gonads and the fat bodies. *Journal of Morphology*. v.126 (3).p. 291–331.

PRANCHA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

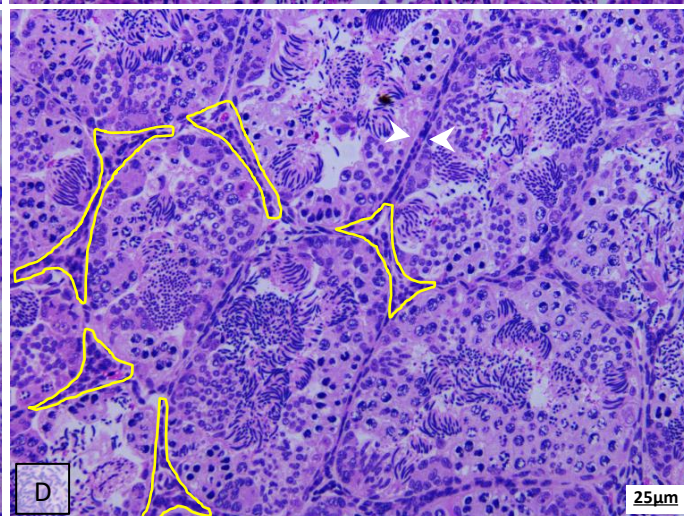
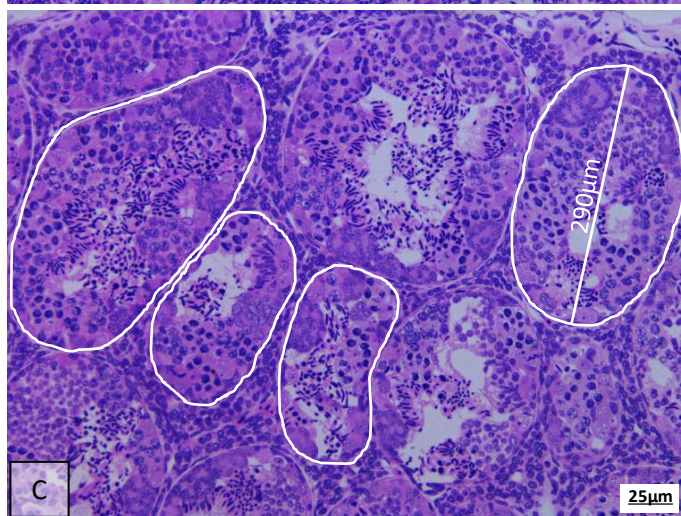
Unidade de Conservação

Área agrícola

D. minutus



B. albopunctata



P. cuvieri

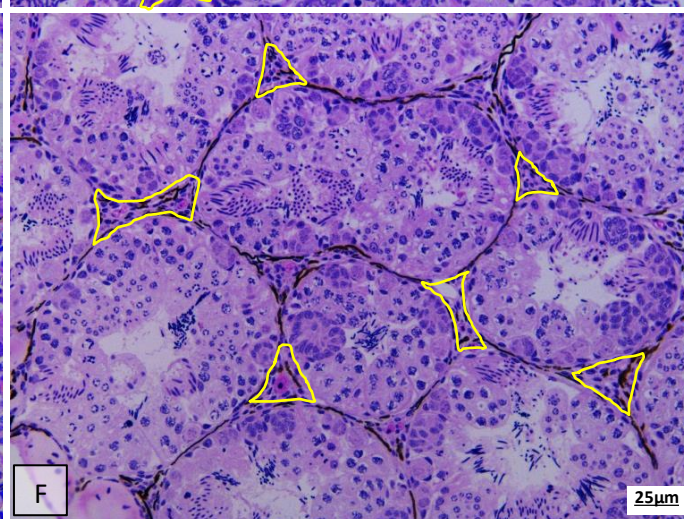
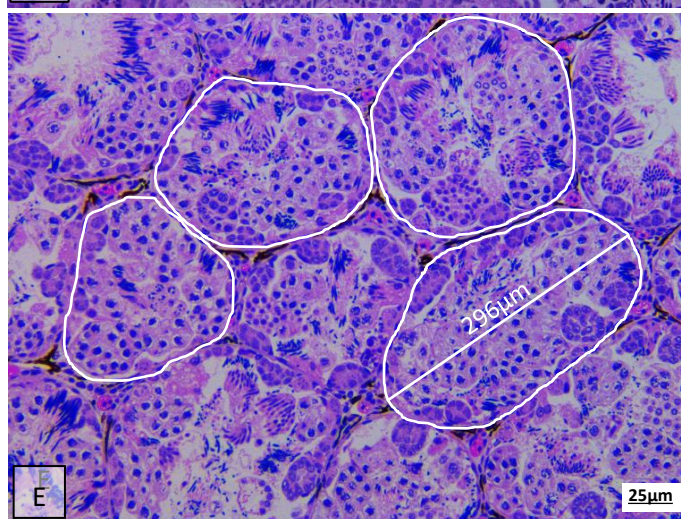


Figura 1: Arquitetura testicular das três espécies de ambiente preservado (A, C, E), e em área agrícola (B, D, F). É possível identificar os lóculos seminíferos circunscritos em branco, bem como as diferenças entre as espécies no formato e diâmetro locular médio, e o arranjo da área intersticial destacados em amarelo. *D. minutus* com lóculos mais arredondados, com espessamento da área intersticial nos pontos de intersecção dos lóculos; *B. albopunctata* com lóculos mais alongados com espessamento da área intersticial bem pronunciado, com varias bandas de células (cabeça de setas); Em *P. cuvieri* é bastante evidente a pigmentação testicular margeando os lóculos seminíferos, e seus lóculos apresentam formas mais variadas. Coloração H-E.

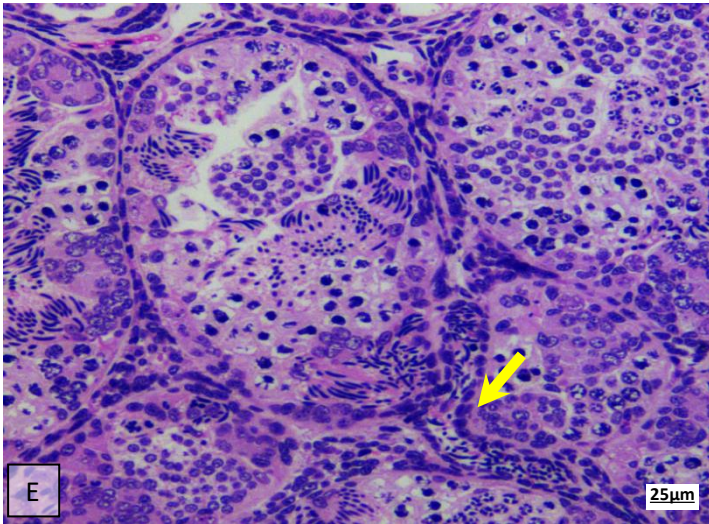
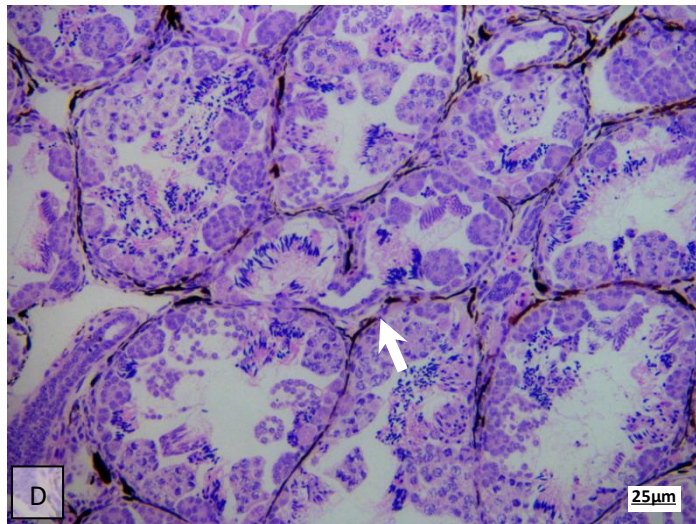
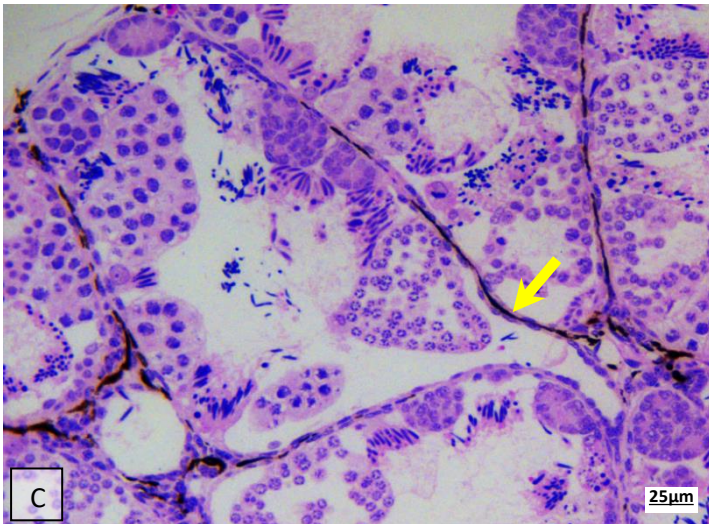
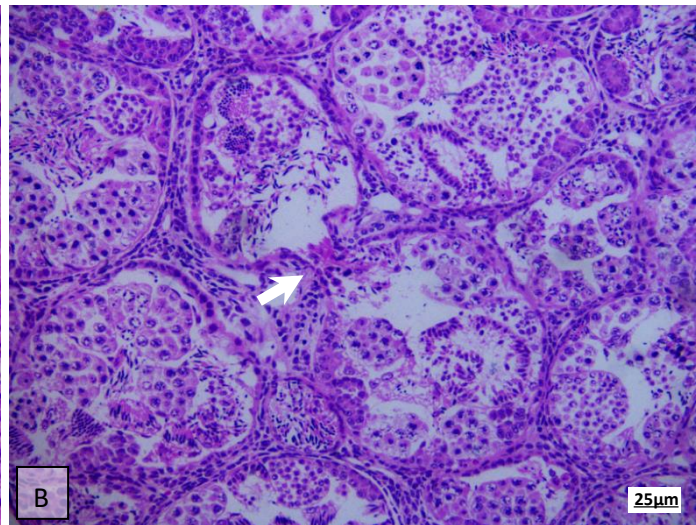
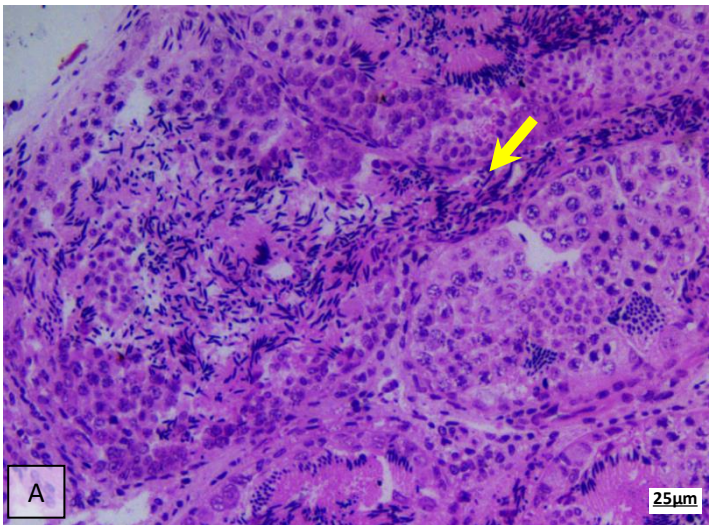


Figura 2: Características morfológicas peculiares dos ductulos. Em **A,C** e **E** é visível a continuidade de um ductulo com a parede locular (seta amarela), onde há espermatozoides se direcionando do lóculo para a luz do ductulo anexo (seta branca). Coloração Hematoxilina e Eosina. **A,B** – *D. minutus*; **C,D** – *P. cuvieri*; **E-B.albopunctata**. Coloração H-E.

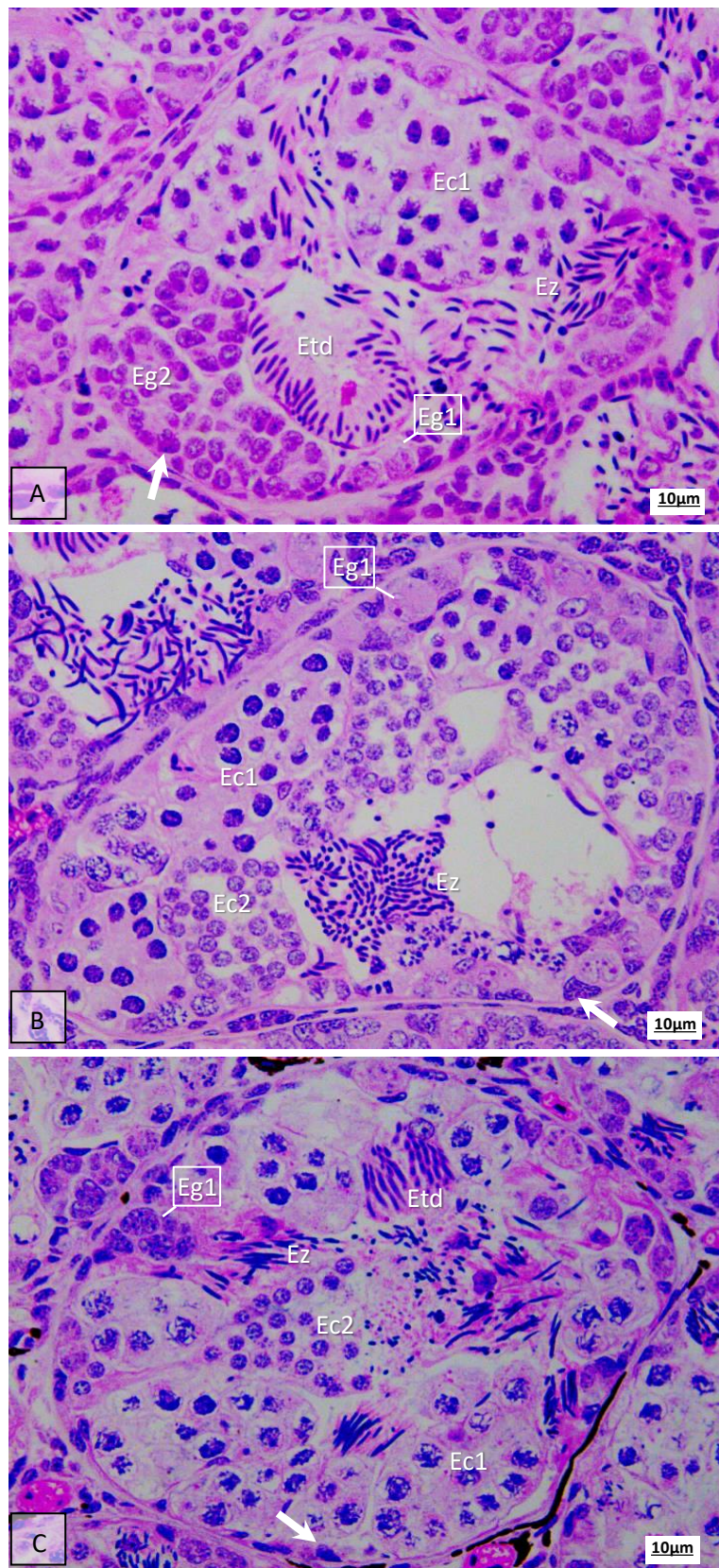


Figura 3: Detalhe dos lóculos seminíferos para as três (A, B, C), onde é possível observar a estruturação dos cistos germinativos formados pelas células de Sertoli (setas), e os diferentes tipos celulares da linhagem espermatogênica. **A** – *D. minutus*; **B** – *B. albopunctata*; **C**– *P. cuvieri*. Eg1: espermatogônia primária; Eg2: espermatogônia secundária; Ec1: espermatócito primário; Ec2: espermatócito secundário; Etd: espermatíde; Ez: espermatozoide. Coloração H-E.

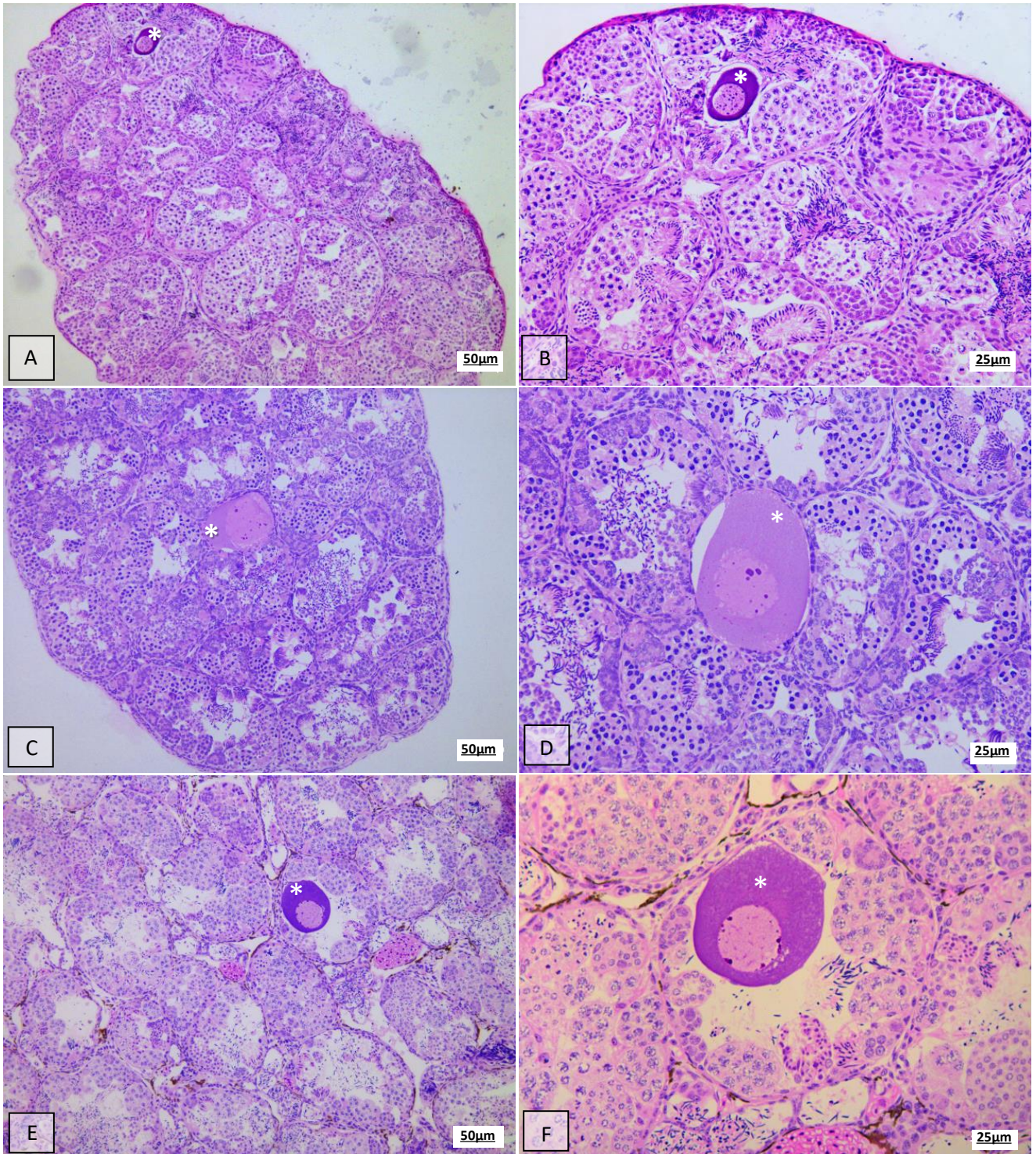


Figura 4: Ovócitos testiculares encontrados em *D. minutus* (A,B) coletado em área agrícola, e em *B. albopunctata* (C,D) e *P. cuvieri* (E,F) coletado em ambiente preservado. Observa-se o ovócito atípico (*) circundado pelos cistos de células da linhagem espermatogênica, ocupando grande extensão do lóculo, no caso de *B. albopunctata* ocupando um lóculo por completo. Coloração H-E.

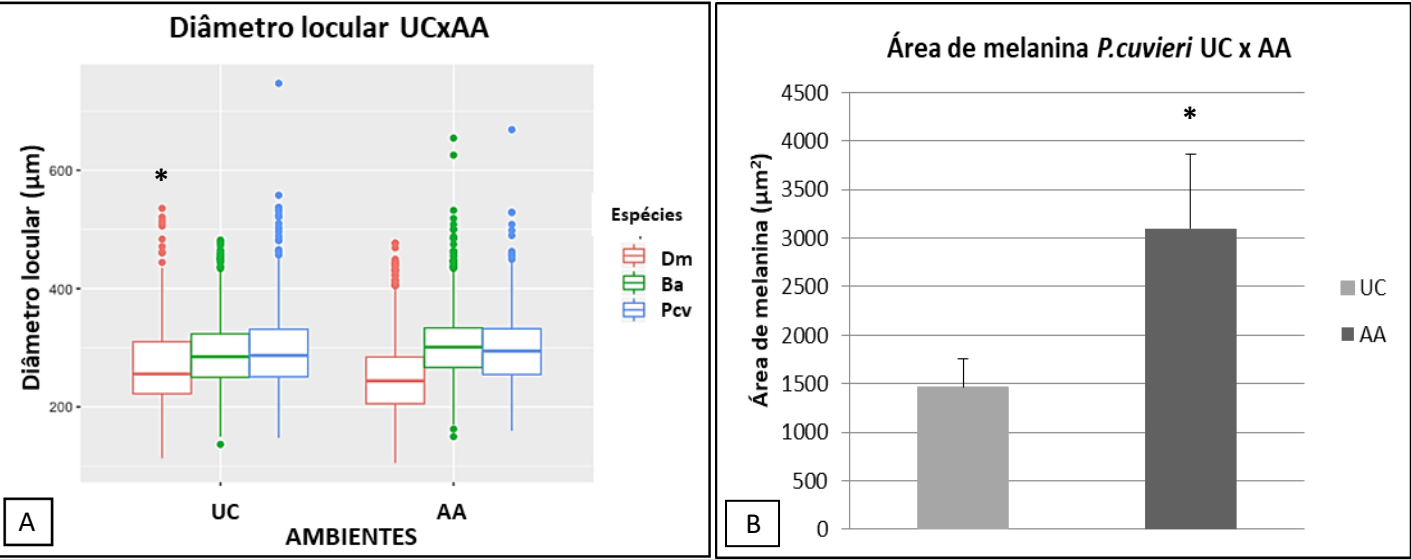


Figura 5: Comparação entre o diâmetro locular (A) e a pigmentação testicular (B) entre os ambientes. Em (A) boxplot evidenciando que houve diferença no diâmetro apenas em *D.minutus* (*). A linha horizontal representa a média dos valores, os pontos correspondem aos maiores e menores valores. Em (B), a pigmentação em *P.cuvieri*, esta foi significativamente maior na área agrícola (*). UC – Unidade de conservação; AA – Área Agrícola; Dm – *D.minutus*; Ba- *B. albopunctata*; Pcv – *P. cuvieri*. Média±SE.

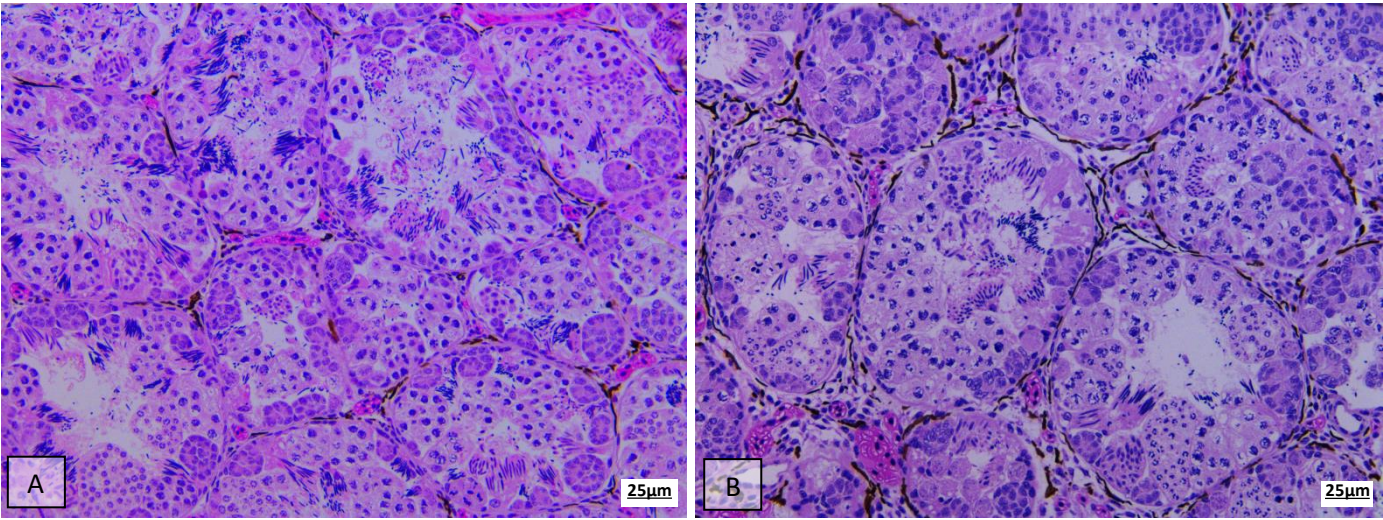


Figura 6: Diferença na pigmentação testicular em *P. cuvieri*, sendo que no ambiente agrícola (B) houve maior área pigmentada em comparação à unidade conservação (A). Coloração H-E.

Tabela 1: Valores das médias gerais dos parâmetros analisados, bem como os valores estatísticos da comparação ambiental, gerados pelo teste de GLM, considerando como significativo $p < 0,05$. **D.LOC**- Diâmetro locular; **IGS** – Índice gonadossomático; **A.PIG**– área pigmentada

Espécie	Parâmetro	Unidade de Conservação		Área Agrícola		Valores Estatísticos				
		Média	Desvio	Média	Desvio	p	σ^2	T ₀₀ espécie:animal	N espécie:animal	ICC espécie:animal
<i>D. minutus</i>	D.LOC	268µm	65 µm	250µm	61µm	<0,0001	3215	665,759	30	0,172
	IGS	0,15%	0,06%	0,20%	0,10%	0,7	0	0	30	0,255
<i>B. albopunctata</i>	D.LOC	290µm	58µm	301µm	58µm	0,6	3214,918	665,759	30	0,172
	IGS	0,11%	0,03%	0,14%	0,03%	0,9	0	0	30	0,255
<i>P. cuvieri</i>	D.LOC	296µm	67µm	298µm	62µm	0,9	3215	665,759	30	0,172
	IGS	0,30%	0,09%	0,37%	0,11%	0,2	0	0	30	0,255
	A.PIG	1466µm ²	9365µm ²	3100µm ²	2421µm ²	<0,0001	2504880	967036,115	10	0,279

Tabela 2: Valores estatísticos da comparação dos parâmetros entre as espécies, gerados pelo teste de GLM, considerando como significativo $p < 0,05$. **DM**- *D. minutus*; **BA**-*B. albopunctata*; **PVC**- *P. cuvieri*.

Parâmetros	Comparações	p	z
Índice Gonadossomático	DM - BA	0,14	1,878
	DM - PCV	<0,0001	-6,058
	BA - PCV	<0,0001	-7,935
Diâmetro locular	DM - BA	<0,0001	-19,895
	DM - PCV	<0,0001	-19,399
	BA - PCV	0,87	0,873

Tabela 3: Valores das concentrações dos agroquímicos encontrados nas amostras de água dos ambientes. **VMP** – Valores máximos permitidos; **µg/L** – micrograma por litro.

Compostos	Valor encontrado (µg/L)	Referência (VMP) (µg/L)	
	Unidade de Conservação	Área Agrícola	
2,4-D + 2,4,5-T	<0,01	<10	30µg/L
Aldicabe+Aldicarbessulfona +Aldicarbessulfóxido	<0,01	<5	10µg/L
ALACLOR	<0,05	<0,053	20µg/L
ALDRIN	<0,03	<0,03	0,03µg/L
DIELDRIN	<0,03	<0,03	0,03µg/L
ATRAZINA	<0,05	5349,94	2µg/L
CARBENDAZIM+BENOMIL	<0,01	<20	120µg/L
CARBOFURANO	<0,1	<1,048	7µg/L
CLORDANO	<0,01	<0,011	0,2µg/L
CLORPIRIFÓS+CLORPIRIFÓS-OXON	<0,1	<0,105	30µg/L
DDT	<0,01	<0,011	1µg/L
DIURON	<0,01	<20	90µg/L
ENDOSSULFAN	<0,1	<0,101	20µg/L
ENDRIN	<0,03	<0,031	0,6µg/L
GLIFOSATO	<0,01	<110	500µg/L
LINDANO	<0,01	<0,01	2µg/L
MANCOZEBE	<0,01	<20	180µg/L
METOLACLORO	<0,05	<0,050	10µg/L
METAMIDOFÓS	<0,01	<1,0	12µg/L
MOLINATO	<0,1	<0,104	6µg/L
PARATIONA METÍLICA	<0,25	<0,250	9µg/L
PENDIMENTALINA	<0,05	<0,051	20µg/L
PERMETRINA	<0,1	<0,103	20µg/L
PROFENOFÓS	<0,01	<20	60µg/L
SIMAZINA	<0,05	<0,051	2µg/L
TEBUCONAZOL	<0,01	<20	180µg/L
TERBUFÓS	<0,01	<0,5	1,2µg/L
TRIFLURALINA	<0,05	<0,051	20µg/L

CAPÍTULO 2

Repercussões morfofuncionais no epitélio germinativo de machos de anuros em agroecossistema e unidade de conservação do Cerrado

Wadson Rodrigues Rezende¹; Raquel de Sousa Santos²; Lilian Franco Belussi³; Classius de Oliveira⁴.

^{1,4} Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP)

³ Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Campus Sorocaba

² Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde- GO

RESUMO: Algumas das principais causas do declínio mundial de anfíbios estão relacionadas às práticas agrícolas. Estas são responsáveis por causar fragmentação de habitats, incluindo no Cerrado, onde muito do bioma foi convertido em áreas cultivadas. Além disso, as atividades agrícolas carregam consigo os agroquímicos, compostos com potencial efeito desregulador em organismos não alvos, como os anuros. A exposição a esses compostos exerce inúmeros efeitos deletérios nos testículos dos anuros, podendo comprometer a reprodução e consequente manutenção das comunidades. Tendo isso em vista, este estudo objetivou comparar morfometricamente o epitélio germinativo e as unidades seminíferas nos testículos de três espécies de anuros do Cerrado (*Dendropsophus minutus*, *Boana albopunctata* e *Physalaemus cuvieri*) provenientes de área agrícola e unidade de conservação. Houve diferença na comparação dos parâmetros testiculares entre os ambientes e também entre as espécies. Em *D. minutus* a área locular, espermatogônias e espermatozoides mostram valores mais baixos na área agrícola. Já *B. albopunctata* mostrou uma resposta inversa, tendo área locular, espermatócitos e espermatozoides em maior proporção em ambiente de agricultura. *Physalaemus cuvieri* apresentou maiores médias da área locular e espermatogônias no ambiente agrícola, porém os espermatozoides tiveram valores mais baixos nesse cenário. Nossos resultados sugerem que pode haver influência dos ambientes nos parâmetros testiculares, de forma que cada espécie respondeu diferentemente, reforçando a importância de se investigar esses efeitos em diferentes espécies, já que essas reagem de formas diferentes a essas pressões.

Palavras chave: Anfíbios; Espermatogênese; Agricultura; Morfometria.

INTRODUÇÃO

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). Além das grandes transformações na paisagem natural, a agricultura necessita de muita tecnologia mecânica e bioquímica para otimização da sua produção, sendo adicionados vários insumos, como agroquímicos, fertilizantes e corretivos, irrigação sem controle, entre outros (Cunha et al., 2008).

Os agroquímicos aplicados nas plantações tem por finalidade a eliminação de organismos considerados nocivos aos cultivos, logo, esses compostos têm grande potencial tóxico e biocida (Carneiro et al., 2012). Além disso, espécies não alvo, como os anuros, viventes em agroecossistemas estão excessivamente expostos a esses xenobióticos (Vera-Candioti et al., 2010). Dentre os vertebrados, os anuros são detentores de características que os tornam extremamente susceptíveis aos efeitos dos xenobióticos, como seu ciclo de vida duplo, na maioria das vezes, com fase larval aquática e fase adulta terrestre (Blaustein et al., 1994; 2011). Desta forma, estão sujeitos as perturbações nesses dois ambientes, além de possuir alta permeabilidade cutânea (Quaranta et al., 2009) e baixa taxa de dispersão (Blaustein et al., 1994).

Considerando que os agroquímicos podem atuar como desreguladores endócrinos, eles podem interferir na sinalização hormonal de organismos não alvos como os anfíbios, afetando a regulação de processos fisiológicos como os envolvidos na reprodução (Guillete et al., 1995). Esses compostos podem, por exemplo, afetar a espermatogênese quando agem através de rotas hormonais ou atuar diretamente no tecido testicular (Toppari et al., 1996; Fattahi et al., 2012) alterando a anatomia e função das estruturas e órgãos reprodutivos, o que pode resultar em anormalidades estruturais com falhas reprodutivas (Hayes et al., 2003; 2010a; McCoy et al., 2008; 2017), agindo diretamente na dinâmica populacional, e consequentemente, nas comunidades (Hayes et al., 2010b).

Neste contexto, pouco se sabe sobre os efeitos gerados pela pressão agrícola nos testículos de anuros do Cerrado. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar se anuros machos de ambientes agrícolas apresentam alterações nos lóculos seminíferos e células germinativas quando comparados a animais vivos em unidade de conservação. Especificamente, hipotetizamos que, levando em conta o potencial desregulatório dos agroquímicos, anuros vivos em áreas agrícolas apresentem alterações nas estruturas seminíferas e na distribuição das células germinativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de espécimes e processamento

Para realizar este estudo, foram selecionadas três espécies de anuros do cerrado, sendo elas *Dendropsophus minutus* (Hylidae), *Boana albopunctata* (Hylidae) e *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae). Foram amostrados 10 indivíduos de cada espécie (n=10) em dois cenários distintos, sendo uma área agrícola (**AA**) no município de Rio Verde – GO (17° 47' 51,99"S, 50° 54' 03,56" O), neste foram selecionadas poças permanentes e semipermanentes alocadas nas curvas de nível de plantio de soja; o outro cenário consistiu em uma unidade de conservação (**UC**) representado pelo Parque Nacional das Emas, Mineiros - GO (18°15.573'S, 052° 53.307'O), sendo amostradas poças permanentes margeadas por vegetação típica do cerrado. As coletas foram feitas através de excursões noturnas durante os meses de outubro e novembro de 2014 e 2016, no período de atividade reprodutiva desses animais, onde só foram coletados machos em plena atividade de vocalização (Licença SISBIO nº34485-1). Em adição, foram coletadas uma amostra de 1000mL de água nos dois tipos de cenários, estas foram encaminhadas para laboratório específico, submetidas a cromatografia gasosa e líquida e espectrometria de massa para a detecção de compostos dos tipos organoclorados, organofosforados e carbamatos.

Após coletados, os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde (IF Goiano), onde foram eutanasiados em anestésico (Benzocaína, 5g/L) e destinados às análises anatômicas e morfológicas. Os indivíduos foram pesados em balança

analítica (modelo AUW-220D, precisão de 0,0001g), e obtido também o comprimento rostro-cloacal (mm) com paquímetro digital (precisão 0,01 mm).

Em seguida, os testículos foram removidos, pesados (g) em balança analítica, e medidos em seu eixo maior (mm) com paquímetro digital, sendo direcionados para fixação em solução de Metacarn (60% Álcool metílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, seguido desidratação em série alcoólica crescente e inclusão em historesina do tipo metacrilato glicol (Historesin Leica®).

Parâmetros morfométricos

Para as análises morfométricas do epitélio germinativo, de cada indivíduo, foram retiradas 25 secções histológicas de 2 μ m, onde foram selecionados 100 lóculos seminíferos inteiros, escolhidos de forma aleatória, sendo avaliado os parâmetros: área locular e área dos cistos espermátogênicos (espermátogônias; espermátócitos e espermatozoides).

A área locular foi obtida através da circunscrição dos lóculos seminíferos. Já quanto aos cistos espermátogênicos, as medidas da área desses, foram obtidas pelo contorno dos cistos sendo categorizados de acordo com Santos e Oliveira (2008) em: espermátogônias (primárias + secundárias); espermátócitos (primários + secundários); espermatozoides (os quais foram considerados desde espermátides redondas e alongadas à espermatozoides em feixes e livres no lúmen). Essas medidas foram efetuadas através da ferramenta de criação de polígonos no Software Image Pró-plus 6.0. Além disso, levando em conta que nem toda a extensão do lóculo é preenchida com epitélio germinativo foi extraída também a área do espaço intralocular, este consiste no espaço luminal e no espaçamento que há entre os cistos, essa medida foi obtida através do cálculo usando a soma da área dos cistos germinativos subtraídos da área locular.

Para testar a nossa hipótese da influência dos ambientes na morfometria testicular, foi utilizado um teste de Modelos Lineares Generalizados (GLM), sendo aplicado tanto para a área locular quanto para a área dos cistos espermátogênicos. Tendo assim, por variável preditora os tipos de ambientes (variável categórica de dois níveis) nos parâmetros morfométricos testiculares (variáveis resposta contínuas). As análises estatísticas dos parâmetros foram

executadas pelo programa R v.3.4.3 (R Development Core Team), sendo considerado o valor de $p < 0,05$ como significativo.

Devido ao design experimental, para o tratamento estatístico dos dados, algumas covariáveis tiveram que ser incluídas, pois além de comparar a área locular entre os ambientes, também foi comparado entre as espécies. Para controlar a influência dos fatores “indivíduos amostrados e quantidade de fotomicrografias”, estes foram considerados covariantes, para mensurar com efetividade o efeito dos tipos de ambientes na morfometria testicular.

Assim como para a área locular, o mesmo sistema foi utilizado para a área dos cistos espermatogênicos, levando-se em consideração também que os tipos celulares não são independentes entre si, já que se trata de um processo e cada tipo celular dará origem ao próximo (segundo Sanchez et al., 2014).

RESULTADOS

Na análise das amostras de água dos ambientes (Tabela 1), foram identificados 28 tipos de agroquímicos, onde a Atrazina apresentou valores muito acima do valor referencial na amostra do ambiente agrícola (concentração encontrada: 5349,940 $\mu\text{g/L}$, valor referencial: 2 $\mu\text{g/L}$), já na unidade de conservação não apresentou valores consideráveis para compostos de origem agroquímica.

Parâmetros morfométricos

Todos os parâmetros avaliados apresentaram diferença significativa quando comparados entre os ambientes, onde essas respostas tiveram íntima relação com as espécies, cada uma respondendo de forma diferente. As Tabelas 2 e 3 sumarizam os valores das medias gerais dos parâmetros analisados, e também os resultados estatísticos.

No hilídeo *D.minutus* foi evidenciado diferença para a área locular, e na área dos cistos de espermatogônias e espermatozoides, quando comparado entre os ambientes (Fig. 2A, B), sendo que na área agrícola os valores tiveram menores proporções (Fig. 1A), mostrando uma queda de cerca de 7% da área ocupada por espermatozoides. Já o outro hilídeo, *B. albopunctata*, mostrou uma resposta inversa a *D. minutus*, tendo a maioria de seus parâmetros

maiores na área agrícola, havendo diferença quando a área locular, espermátocitos e espermatozoides (Fig. 1B e Fig. 2A, C).

Para *P. cuvieri* a área locular, e área dos cistos de espermatogônias e espermatozoides foram diferentes entre os dois tipos de ambiente (Tabela 2 e Fig. 6A). Nesta espécie, as distribuições dos valores dos parâmetros testiculares mostraram-se dispares, onde a área locular e as espermatogônias tiveram proporções maiores em área agrícola; os espermátocitos não apresentaram diferença; os espermatozoides apresentaram maiores valores de área ocupada, na unidade de conservação (Fig. 1C e Fig. 2A, D).

Todos os parâmetros analisados apresentaram diferença quando comparado entre as espécies (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos neste estudo acerca dos parâmetros morfométricos testiculares, sugerimos que pode haver influência dos ambientes agrícolas sobre as estruturas reprodutivas dos anuros, sendo que cada espécie apresentou respostas diferentes a esse fator, onde os tipos celulares espermatogênicos tiveram significativa redução para algumas espécies em áreas agrícolas.

Xenobióticos como os agroquímicos podem afetar a espermatogênese, agindo através de rotas hormonais (desregulação endócrina) ou exercendo efeitos genotóxicos, passando, assim, pela barreira hemato-testicular (Toppari et al., 1996). Também podem atuar de forma direta no tecido testicular, onde muitos são os efeitos deletérios desses compostos nas estruturas gonadais, bem como no desenvolver do processo espermatogênico (Fattahi et al., 2012). O efeito dos ambientes agrícolas e seus insumos nas células germinativas e estruturas testiculares tem mostrado, por exemplo, uma grande influência na distribuição das células espermatogênicas, sendo relatado diminuição das espermatogônias em *Rhinella fernandezae* e *Dendropsophus sanborni* (Sanchez et al., 2014), e redução dos espermatozoides nos lóculos seminíferos em *Rhinella marina* (McCoy et al., 2017), como observado em *D. minutus* e *P. cuvieri* no presente estudo.

Além disso, outras histopatologias testiculares vêm sendo atribuídas a ação dos agroquímicos, como diminuição e deformidades dos lóculos seminíferos, aumento da área intersticial, vacuolização e necrose das células germinativas, entre outros efeitos (Çakici, 2013; 2015), mostrando o potencial impacto que esses compostos possuem, podendo levar a debilidade na fertilidade desses machos.

Outro ponto a ser considerado em relação aos estudos dos efeitos da pressão agrícola e seus insumos nas células germinativas, refere-se à magnitude das respostas, que são muito variáveis em função das espécies (Mathew, 2014; Sanchez et al., 2014; McCoy et al., 2017.), mesmo dentro de uma mesma família, como foi o caso dos hilídeos *B. albopunctata* e *D. minutus*, aqui analisadas, e *D. samborni*, relatada por Sanchez et al.(2014), que mostraram respostas diferentes nessas célula em condições similares. Desta forma, é plausível supor que as espécies apresentem diferentes sensibilidades a esses agentes, e a resposta frente a eles dependerá da susceptibilidade que cada uma possui, sendo algumas mais sensíveis que outras (Berrill et al., 1995; Howe et al., 2004; Jones et al., 2009; Hammond et al., 2012; Cothran et al.; 2013). Sendo assim, é justificável a diferença encontrada nas células germinativas aqui relatada.

Contudo, mesmo que as três espécies estudadas sejam consideradas generalistas, de ampla distribuição na América do Sul, e “pouco preocupantes” quanto a conservação (Brandão e Araújo, 1998; Haddad e Prado, 2005; IUCN, 2017), ainda assim, há grande importância nos estudo destas como bioindicadores, pois elas se mostraram susceptíveis de diferentes formas a essas pressões antrópicas agrícolas, principalmente *D.minutus* e *P.cuvieri*, mostrando efeitos desde diminuição das células germinativas aqui relatadas, a efeitos genotóxicos como o proposto por Gonçalves e colaboradores (2015; 2017).

Cabe salientar também, que na análise das amostras de água dos ambientes, foram identificados 28 tipos de agroquímicos, onde a Atrazina apresentou valores muito acima do valor referencial na amostra do ambiente agrícola, já na unidade de conservação não apresentou valores consideráveis para compostos de origem agroquímica. Esse agroquímico tem sido fortemente

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/IBAMA/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.; VELDHOF, N. (2004). Toxicity of Glyphosatebased 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*.Disponível 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.

PRANCHAS DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1: Valores das concentrações dos agroquímicos encontrados nas amostras de água dos ambientes. **VMP** – Valores máximos permitidos; **µg/L** – micrograma por litro.

Compostos	Valor encontrado (µg/L)	Referência (VMP) (µg/L)	
	Unidade de Conservação	Área Agrícola	
2,4-D + 2,4,5-T	<0,01	<10	30µg/L
Aldicabe+Aldicarbesulfona +Aldicarbesulfóxido	<0,01	<5	10µg/L
ALACLOR	<0,05	<0,053	20µg/L
ALDRIN	<0,03	<0,03	0,03µg/L
DIELDRIN	<0,03	<0,03	0,03µg/L
ATRAZINA	<0,05	5349,94	2µg/L
CARBENDAZIM+BENOMIL	<0,01	<20	120µg/L
CARBOFURANO	<0,1	<1,048	7µg/L
CLORDANO	<0,01	<0,011	0,2µg/L
CLORPIRIFÓS+CLORPIRIFÓS-OXON	<0,1	<0,105	30µg/L
DDT	<0,01	<0,011	1µg/L
DIURON	<0,01	<20	90µg/L
ENDOSSULFAN	<0,1	<0,101	20µg/L
ENDRIN	<0,03	<0,031	0,6µg/L
GLIFOSATO	<0,01	<110	500µg/L
LINDANO	<0,01	<0,01	2µg/L
MANCOZEBE	<0,01	<20	180µg/L
METOLACLORO	<0,05	<0,050	10µg/L
METAMIDOFÓS	<0,01	<1,0	12µg/L
MOLINATO	<0,1	<0,104	6µg/L
PARATIONA METÍLICA	<0,25	<0,250	9µg/L
PENDIMENTALINA	<0,05	<0,051	20µg/L
PERMETRINA	<0,1	<0,103	20µg/L
PROFENOFÓS	<0,01	<20	60µg/L
SIMAZINA	<0,05	<0,051	2µg/L
TEBUCONAZOL	<0,01	<20	180µg/L
TERBUFÓS	<0,01	<0,5	1,2µg/L
TRIFLURALINA	<0,05	<0,051	20µg/L

Tabela 2: Valores das médias gerais dos parâmetros analisados, bem como os valores estatísticos da comparação e ambiental, gerados pelo teste de GLM, considerando como significativo $p < 0,05$. **A.LOC** – Área locular; **GONIA** – Espermatogônia; **CITO**- Espermatócito; **ZOIDE**- Espermatozoide; **ESP.INT**- Espaço intralocular.

Espécie	Parâmetros	Unidade de Conservação		Área Agrícola		Valores Estatísticos				
		Média	Desvio	Média	Desvio	p	σ^2	T ₀₀ espécie:animal	N espécie:animal	ICC espécie:animal
<i>D. minutus</i>	A.LOC	42960 μm^2	17952 μm^2	37366 μm^2	16161 μm^2	<0,0001	238317889	74111727,1	30	0,237
	GONIA	4617 μm^2	3231 μm^2	3833 μm^2	2467 μm^2	<0,0001	7952717	582712	30	0,068
	CITO	8055 μm^2	5440 μm^2	7420 μm^2	5501 μm^2	0,06	26207150	3149459	30	0,107
	ZOIDE	9401 μm^2	7350 μm^2	652 μm^2	5401 μm^2	<0,0001	29196412,56	2251955	30	0,072
	ESP.INT	10174 μm^2	6115 μm^2	11183 μm^2	7521 μm^2	0,01	47461657	8674690,34	30	0,155
<i>B. albopunctata</i>	A.LOC	48210 μm^2	16098 μm^2	54644 μm^2	19260 μm^2	<0,0001	238317889,2	74111727,1	30	0,237
	GONIA	5035 μm^2	2850 μm^2	5168 μm^2	3193 μm^2	0,8	7952717	582712	30	0,068
	CITO	8044 μm^2	4875 μm^2	9728 μm^2	5734 μm^2	<0,0001	26207150	3149459	30	0,107
	ZOIDE	7057 μm^2	6035 μm^2	7855 μm^2	6016 μm^2	<0,0001	29196412,56	2251955	30	0,072
	ESP.INT	13721 μm^2	6330 μm^2	14234 μm^2	9453 μm^2	0,5	47461657	8674690,34	30	0,155
<i>P. cuvieri</i>	A.LOC	41373 μm^2	17128 μm^2	50606 μm^2	17980 μm^2	<0,0001	238317889	74111727,1	30	0,237
	GONIA	4221 μm^2	2653 μm^2	4852 μm^2	2989 μm^2	<0,0001	7952717	582712	30	0,068
	CITO	7383 μm^2	4971 μm^2	6891 μm^2	5734 μm^2	0,2	26207150	3149459	30	0,107
	ZOIDE	6179 μm^2	4318 μm^2	4718 μm^2	3596 μm^2	<0,0001	29196412,56	2251955	30	0,072
	ESP.INT	16980 μm^2	7065 μm^2	17703 μm^2	7620 μm^2	0,1	47461657	8674690,34	30	0,155

Tabela 3: Valores estatísticos da comparação dos parâmetros entre as espécies, gerados pelo teste de GLM, considerando como significativo $p < 0,05$. **DM**- *D. minutus*; **BA**-*B. albopunctata*; **PVC**- *P. cuvieri*.

Parâmetros	Comparações	p	z
Área locular	DM - BA	<0,0001	-19,971
	DM - PCV	<0,0001	-10,330
	BA - PCV	<0,0001	9,641
Espermatogônias	DM - BA	<0,0001	-9,473
	DM - PCV	0,0022	-3,364
	BA - PCV	<0,0001	6,110
Espermatócitos	DM - BA	<0,0001	-6,726
	DM - PCV	0,0014	3,488
	BA - PCV	<0,0001	10,214
Espermatozoides	DM - BA	0,01	2,816
	DM - PCV	<0,0001	13,995
	BA - PCV	<0,0001	11,180
Espaço Intralocular	DM - BA	<0,0001	-14,025
	DM - PCV	<0,0001	-28,317
	BA - PCV	<0,0001	-14,293

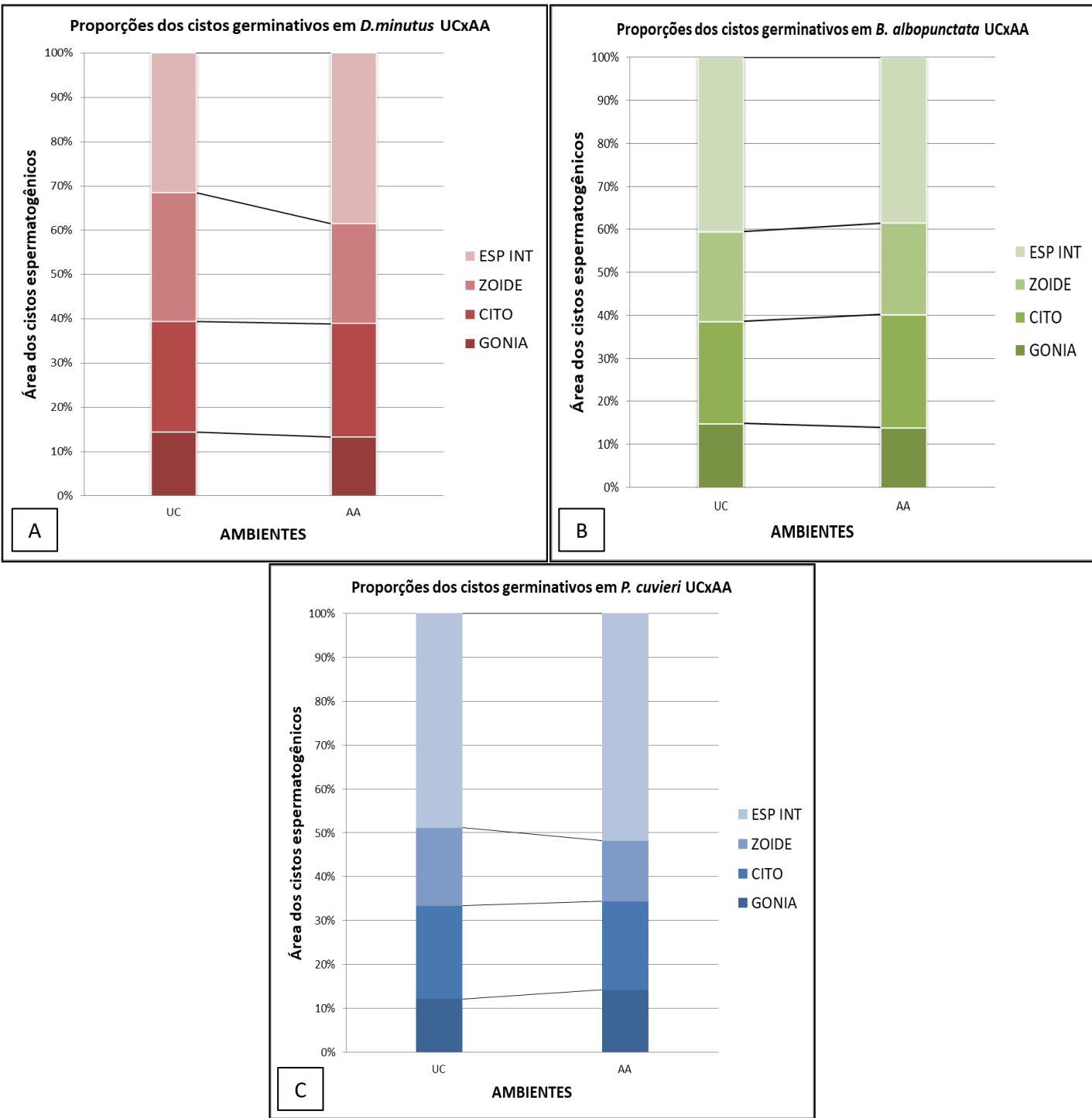


Figura 1: Proporções das médias da área dos cistos espermato gênicos das três espécies nos dois ambientes amostrados. **A-** *D. minutus*; **B-** *B. albopunctata*; **C-** *P. cuvieri*. **UC** – Unidade de Conservação; **AA-** Área agrícola. **GONIA-** espermato gônia; **CITO** – espermato cto; **ZOIDE-** espermato zoide; **ESP INT** – Espaço intralocular.

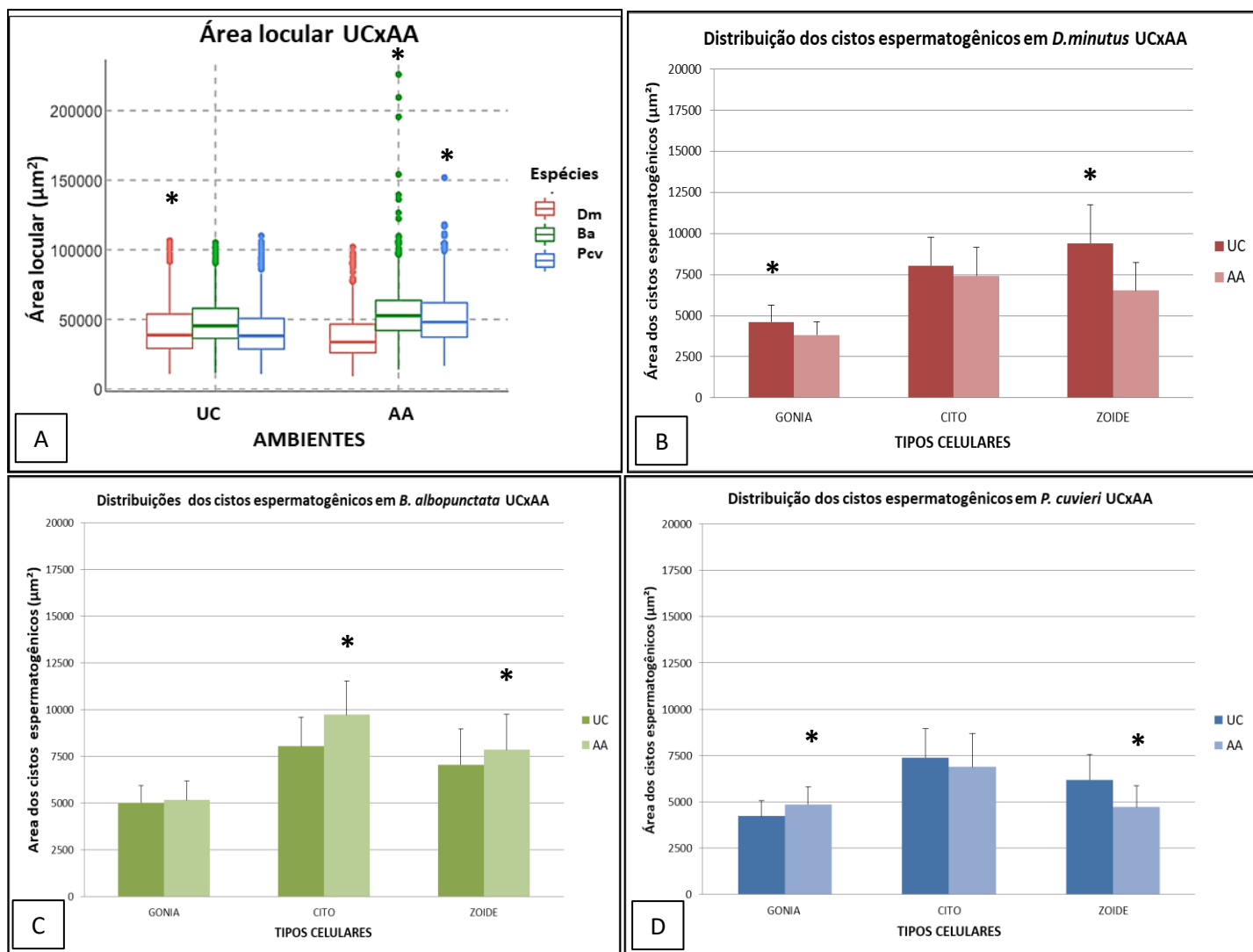


Figura 2: Comparação dos parâmetros testiculares entre a unidade de conservação (UC) e área agrícola (AA), o “*” indica onde houve diferença estatística significativa. Em **A**, boxplot mostra a comparação da área locular entre os ambientes, a linha horizontal representa o valor médio, os pontos indicam os maiores e menores valores. **B, C e D** os valores médios da área dos cistos espermatogênicos em *D. minutus* (Dm), *B. albopunctata* (Ba) e *P. cuvieri* (Pcv) respectivamente. **GONIA** - espermatogônia; **CITO** – espermatócito; **ZOIDE** - espermatozoide. Média $\pm$ SE.