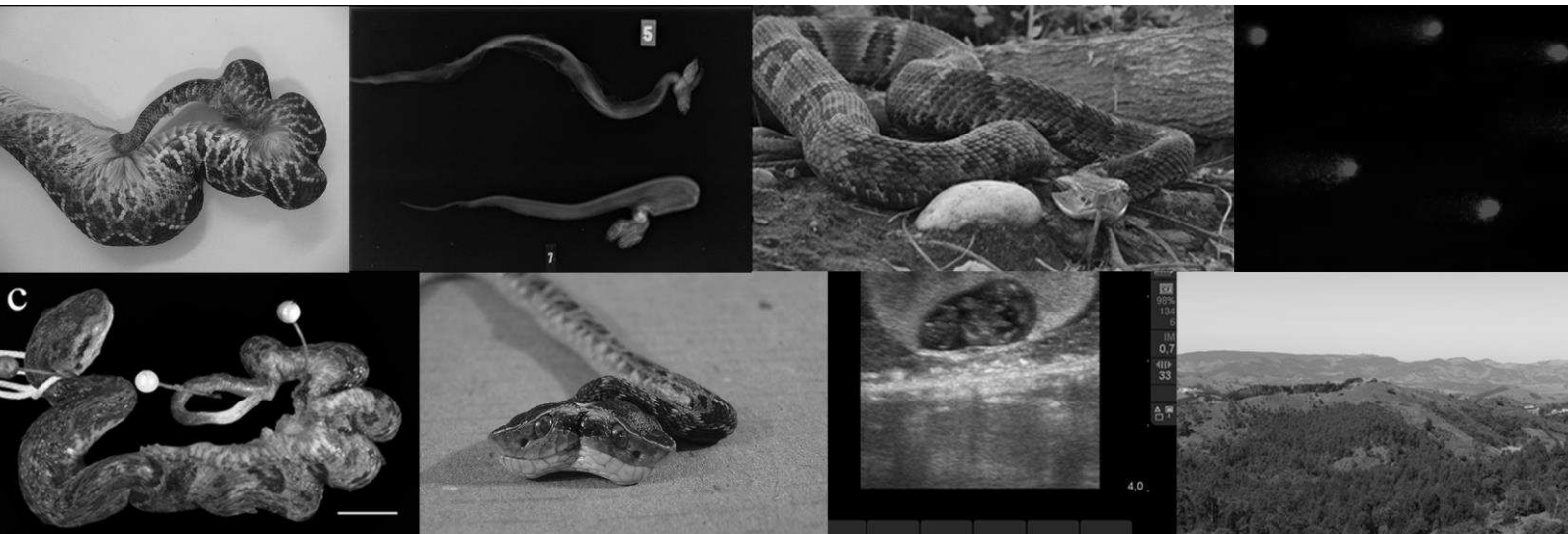


SÁVIO STEFANINI SANT'ANNA

Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro:
caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA
e do comprimento materno e correlação com o uso do solo



São Paulo

2014

SÁVIO STEFANINI SANT'ANNA

Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro:
caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA
e do comprimento materno e correlação com o uso do solo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3008
FMVZ

Sant'anna, Sívio Stefanini

Malformações em viperídeos neotrópicos do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo / Sívio Stefanini Sant'anna. – 2014.

95 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Anomalias congênitas. 2. *Bothrops jararaca*. 3. *Crotalus durissus*. 4. Dismorfologia. 5. Ensaio de cometa. I. Título.

RESUMO

SANT'ANNA, S. S. **Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo** [Malformations in Neotropical viperids of Southeastern Brazil: anatomical and pathological characterization, analysis of DNA integrity and maternal length and correlation with land use]. 2014. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Malformações ou anomalias congênitas são deformidades que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e que, no caso dos répteis podem ter diversas causas, como genética, temperatura, radiação ou contaminantes entre outros fatores. Este estudo verificou as malformações em filhotes recém-nascidos de jararaca (*Bothrops jararaca*) e cascavel (*Crotalus durissus*) de fêmeas prenhes recém-capturadas na natureza (323 e 41 ninhadas respectivamente) do sudeste brasileiro. Após o nascimento, os filhotes foram medidos, pesados e o sexo foi verificado. Realizamos análise macroscópica em busca de malformações perceptíveis e conduzimos exames radiográficos a fim de descrever e documentar as anomalias. As jararacas apresentaram 129 indivíduos malformados entre 5427 recém-nascidos (2,4%); e as cascavéis tiveram 50 serpentes malformadas em 391 nascidos (12,7%). Anomalias na coluna vertebral foram as mais comuns para as duas espécies, seguidas de fusão nas placas ventrais e malformações oculares. Os filhotes de jararaca apresentaram uma maior variedade de malformações como esquistossomia, cauda retorcida, bicefalia e hidrocefalia, não encontradas em cascavéis. O Ensaio do Cometa não apresentou diferença estatística significativa no índice de dano do DNA (ID) das células das mães que pariram filhotes normais e das que pariram filhotes malformados. Os dois grupos apresentaram células com diferentes graus de dano no DNA. Quando comparamos o tamanho das mães e a frequência de malformações encontramos uma regressão positiva ($r^2= 0,67$). Devido à relação positiva entre idade e tamanho nos répteis concluímos que serpentes com idade mais avançada tendem a apresentar mais filhotes com malformações. O padrão de uso do solo (urbanização, agricultura, pecuária e vegetação nativa), foi correlacionado com a presença de filhotes com malformações, utilizando o Coeficiente de Spearman. Houve uma correlação positiva entre a presença de malformações e as áreas agrícolas ($r_s= 0,67$;

$p=0,01$), mas negativa quando comparados às áreas de vegetação nativa ($r_s = -0,57$; $p=0,03$). Não houve correlação entre a pecuária ou urbanização e malformações em jararaca. Malformações em cascavel não apresentaram quaisquer correlações com o padrão de uso do solo, sendo que tal condição pode ser resultado da baixa amostragem desta espécie no presente estudo. Serpentes são animais de topo de cadeia e se mostram como bons indicadores biológicos. A presença e diversidade de malformações apresentadas, aliadas ao fato de haver correlação com os padrões do uso do solo, demonstram a necessidade de se realizar um estudo mais aprofundado e interdisciplinar das causas destes fenômenos e um monitoramento destas espécies para se ter um panorama temporal do problema .

Palavras-chave: Anomalias congênitas. *Bothrops jararaca*. *Crotalus durissus*. Dismorfologia. Ensaio do cometa.

ABSTRACT

SANT'ANNA, S. S. **Malformations in neotropical viperids of southeastern Brazil: anatomical and pathological characterization, analysis of DNA integrity and maternal length and correlation with land use** [Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo]. 2014. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Malformations or congenital anomalies are deformities that occur during embryonic development and in the case of reptiles may have several causes, such as genetics, temperature, radiation, contaminants and other factors. This study assessed malformations in newborn of pit viper (*Bothrops jararaca*) and South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) from wild captured pregnant females (323 and 41 litters respectively) in southeastern Brazil. Newborn snakes were measured, weighed, sexed and studied grossly and by radiography for the presence of malformations. We performed macroscopic analysis in search of noticeable defects and radiographic examinations conducted in order to describe and document the deficiencies. A hundred twenty -nine malformed pit vipers were identified from 5,427 births (2.4%), while 50 malformed rattlesnakes were found from 391 births (12.7%). Spinal abnormalities were the most common in both species, followed by fusion of ventral scales. Pit vipers showed a greater range of malformations including schistosomia, kinked tail, bicephaly and hydrocephaly. There was no statistically significant difference in the index of DNA damage (ID) determined by the Comet Assay in the erythrocytes of mothers that delivered normal litters compared to the erythrocytes of the ones that delivered malformed neonates, both groups containing cells with different degrees of DNA damage. When comparing the length of the pit viper mothers with the frequency of malformations, a positive regression ($r^2 = 0.67$) was found. Due to the positive relationship between age and size in snakes we conclude that older animals tend to have more malformed offspring. The patterns of land use (urbanization, agriculture, livestock and native vegetation) have been correlated with the presence of neonates with malformations. There was a positive correlation between the presence of malformations in pit viper neonates and agricultural areas ($r_s = 0.67$, $p = 0.01$) but a negative one when compared to areas of native vegetation ($r_s = -0.57$, $p = 0.03$). There was no correlation

between urbanization or livestock and malformations in pit vipers. Malformations in rattlesnake did not show any correlation with the pattern of land use, and such condition could be the result of the poor sampling of this species in the present study. As snakes are in the top of the animal food-chain they are good biological indicators. The presence and diversity of malformations presented, coupled with the correlation with the patterns of land use, demonstrate the need to undertake further interdisciplinary study of the causes of these phenomena and the behavior of these species to have a temporal overview of the problem.

Keywords: Congenital anomalies. *Bothrops jararaca*. *Crotalus durissus*. Dysmorphology. Comet assay.

1 INTRODUÇÃO

Os humanos sempre tiveram as malformações como um fator presente na sua cultura. Desde os primórdios da humanidade existem indícios da preocupação com as anomalias congênitas, em esculturas do período neolítico da Ásia Menor de 6500 a.C. ou na mais antiga citação escrita datando de 4.000 anos, registrada em tábuas de argila na Babilônia (WARKANY, 1972). Para os Babilônios, que acreditavam no poder das estrelas e constelações, as malformações eram um reflexo dos astros e, portanto podiam ser usadas para prever o futuro tão bem quanto as próprias estrelas. Este aspecto permeou a cultura grega e romana e a palavra latina *monstrum* deriva de *mostrare* (BARROW, 1971), indicando a capacidade de previsão. Esta foi também a primeira forma de explicar o aparecimento de humanos e animais malformados, ou seja, uma manifestação dos céus. Ainda no campo do sobrenatural, quase todas as culturas criaram seres místicos, tanto deuses como demônios, e não é difícil de aceitar que tenham tido origem a partir de indivíduos, animais ou humanos, com anomalias congênitas. Como exemplos, temos Cérbero, o cão com três cabeças, a Hidra, um ser com várias cabeças de serpentes, e o deus romano Janus com duas cabeças, entre tantos outros (SCHUMACHER, 2004). Outra concepção muito difundida desde a Antiguidade e que até os dias de hoje encontramos resquícios na nossa cultura, é a chamada “impressão materna”. Esta teve grande aceitação até o século XIX, acreditando que os pensamentos maternos poderiam causar alterações na formação do bebê. Ainda hoje encontramos esta crença na cultura popular (SANTOS, 2005), tanto que devemos satisfazer os desejos de uma mulher grávida para que o bebê não nasça com as feições do desejo. Apesar de já existirem tentativas de explicações lógicas para o surgimento das malformações desde a antiguidade, até a época medieval perdurou o pensamento teológico e supersticioso da origem das anomalias.

A fundação da Anatomia como ciência por Vesalius, no século XVI, marcou o início da reorientação gradual de interpretação e explicação dos fenômenos de malformação, e ao final do séc. XVIII Etienne Geoffroy de Saint-Hilaire cunhou o termo Teratologia, do grego *terato* = monstro e *logos* = estudo (SCHUMACHER, 2004), que vem a ser a ciência que estuda as malformações congênitas. Mais recentemente começou-se a

usar o termo dismorfologia, já que o termo teratologia trata do estudo dos monstros e a maioria das anomalias não chega a ser monstruosidades (SMITH, 1966).

Na metade do séc. XX, as explicações para o nascimento de indivíduos com anomalias congênitas eram baseadas em causas ambientais específicas como a radiação, infecção (rubéola e toxoplasmose), deficiência do ácido fólico; causas genéticas específicas, como a relação entre genes dominantes e recessivos; e por último, causas não identificadas (FRASER, 1959). Mas a partir dos anos 60 um novo caminho se abriu devido ao uso do medicamento talidomida por mães durante a gestação. Talidomida é um derivado do ácido glutâmico usado no final dos anos 50 como sedativo. Passou também a ser utilizado contra enjoos e receitado para mulheres durante a gravidez (GHOREISHI, 2014). No entanto, no final de 1961 e início de 1962, vários autores começaram a relatar casos de malformações associados ao uso de talidomida por gestantes (MCBRIDE, 1961; LENZ et al., 1962; SPEIRS, 1962). Comprovou-se que o medicamento estava associado ao nascimento de bebês com malformações nos membros (focomelia, dismelia, amelia e hipoplasticidade óssea) e anomalias congênitas em orelha, coração e órgãos internos (FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004). A partir desta descoberta, muitas mudanças ocorreram na liberação de novos medicamentos para a população, mas também se percebeu a influência de substâncias químicas exógenas como causa das malformações em humanos e outros animais.

Associado a esta tragédia, as questões de saúde e ambientais causaram um aumento significativo na quantidade de pesquisas e publicações sobre agentes teratogênicos e malformações congênitas (MORGAN et al., 1988). Atualmente, produtos a serem utilizados no mercado brasileiro, como medicamentos ou insumos agrícolas, necessitam passar por testes de teratogenicidade (BRASIL, 1989; 1997).

Simultaneamente, entre o final do século XIX e início do séc. XX, ocorreu um grande desenvolvimento do uso de produtos químicos na agricultura contra pragas e doenças, baseados em compostos inorgânicos (flúor, chumbo, arsênico, mercúrio entre outros). Esta foi chamada de primeira geração de agrotóxicos (ALVES FILHO, 2002). Em 1932, a síntese de um inseticida a base de tiocianato inaugura a segunda geração de agrotóxicos, que são compostos por organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (FARIA, 2009). O dicloro-difenil-tricloroetano ou DDT, por exemplo, foi usado largamente no pós Segunda Guerra Mundial até início dos anos 70 para controle de mosquitos vetores de doenças e na agricultura. No entanto, a publicação do livro

Primavera Silenciosa (*The Silent Spring*, CARSON (1962) aliada a artigos científicos (MOORE, 1967; RATCLIFFE, 1967; SELBY et al., 1969), demonstrando os perigos destes compostos que não eram específicos e persistiam no ambiente, fizeram com que os inseticidas clorados fossem banidos dos Estados Unidos da América em 1972 (COPE; LEIDY; HODGSON, 2004).

No Brasil, é a partir do pós-guerra que se intensifica o uso dos praguicidas. De acordo com Paschoal (1979), os primeiros produtos empregados no país para o controle de pragas foram os de origem mineral e vegetal. O primeiro inseticida orgânico - sintético a ser usado foi o DDT, introduzido no Brasil em fins de 1943, sob a denominação de Gesarol. Junto com o Estado do Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná são os estados que sofreram maior impacto do uso de praguicidas, ou pelo menos são os que se têm mais informações (PASCHOAL, 1979). O consumo de agrotóxicos, expresso em quantidades de ingrediente ativo, passou de 16 mil toneladas em 1964 (RUEGG et al., 1987) para 60,2 mil toneladas em 1991 (FUTINO; SILVEIRA, 1991; GOELLNER, 1993). Nos anos 80, o Brasil tornou-se o terceiro consumidor mundial de agrotóxicos, sobre uma estrutura institucional precaríssima, em termos de legislação, pesquisa, fiscalização, comercialização, formação, ética profissional e extensão rural (PASCHOAL, 1983). Esta situação continua, sendo que cerca de 50% dos agricultores que fazem uso de agrotóxicos não receberam orientação técnica para tal (IBGE, 2009). Neste contexto de uso, muitas vezes indiscriminado de praguicidas e fertilizantes químicos, é que sobrevive a fauna selvagem.

Independente da espécie animal em questão, existem princípios básicos na teratogenia. Entre estes, temos que a suscetibilidade ao agente teratogênico varia dependendo do estágio de desenvolvimento, e que as manifestações do agente são dose-dependente (WILSON, 1959).

A espécie humana possui cerca de 2-3% das crianças nascidas apresentando anomalias identificáveis ao nascer (ROGERS; KAVLOCK, 1998). Uma estimativa de Brent e Beckman (1990) creditam de 15-20% das malformações nos seres humanos a fatores genéticos, cerca de 10% a fatores ambientais e 65% a fatores desconhecidos. Se para espécie humana, que é uma das mais estudadas, a causa de mais da metade das malformações não é conhecida, o que se pode afirmar sobre os animais silvestres?

De maneira geral, a teratologia da fauna selvagem muitas vezes se restringe a relatos anedóticos (HELLGREN et al., 1984; LINNEHAN, 1989; POWELL et al., 2009).

Pesquisas que apresentam resultados envolvendo uma gama maior de indivíduos, como é o caso do estudo de Trupkiewicz, Gulland e Lowenstine (1997) com elefantes marinhos (*Mirounga angustirostris*), são raros. Para anfíbios esta situação é diferenciada. Desde a descoberta de diversos anfíbios com malformações em Minnesota (KAISER, 1997; SCHMIDT, 1997), muitos artigos surgiram com este grupo animal (ANKLEY et al., 2002; ANKLEY et al., 2004; TAYLOR et al., 2005).

Para os répteis, e principalmente para as serpentes, a grande maioria é relato de casos de bicefalia (AMARAL, 1926; BELLUOMINI, 1959; BELLUOMINI; LANCINI, 1960; BELLUOMINI, 1965; BELLUOMINI et al., 1978; ORÓS et al., 1997), associados a uns poucos casos de malformações na coluna (PENDLEBURY, 1976; BELLAIRS, 1981; ANDRADE; ABE, 1992; ROTHSCHILD; SCHULTZE; PELLEGRINI, 2012).

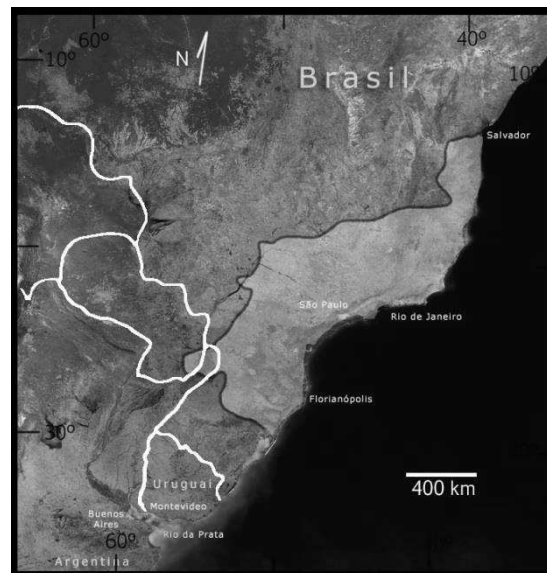
A serpente *Bothrops jararaca* Wied 1824, ou jararaca (figura 1.1), é um viperídeo neotropical cuja distribuição vai do estado da Bahia ao Rio Grande do Sul no Brasil e norte da Argentina (figura 1.2)(CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004) coincidindo com o Domínio Morfoclimático Tropical Atlântico ou Mata Atlântica (AB'SABER, 1977). É uma espécie que habita desde áreas de Florestas Ombrófilas Densas até formações degradadas por ação antropogênica (capoeiras) e áreas de cultivo (SAZIMA, 1992). Apesar de ser encontrada em atividade durante o dia é uma espécie de hábitos noturnos, se alimentando de presas ectotérmicas (quilópodes, anfíbios e lagartos) quando jovem e modificando seu hábito alimentar à medida que cresce, passando a ingerir presas endotérmicas (roedores e aves) (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002). O ciclo reprodutivo é semelhante ao encontrado para outras *Bothrops*, com o período de reprodução no final do outono e início do inverno (abril-junho) e nascimentos no verão (janeiro-abril) (SAZIMA, 1992; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Segundo Sazima (1992) o tamanho das ninhadas podem variar de 3 a 34 filhotes, com os filhotes nascendo com média de 24,5 cm (machos) e 25,3 cm (fêmeas) de comprimento rostro-cloacal (crl). Junto com outras *Bothrops* é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil.

Figura 1.1 – Imagem de uma fêmea adulta de jararaca (*Bothrops jararaca*)



Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Figura 1.2 - Distribuição da jararaca (*Bothrops jararaca*)



Fonte: (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004).

A cascavel, ou *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758)(figura 1.3), é um viperídeo de ampla distribuição, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina (CAMPBELL;

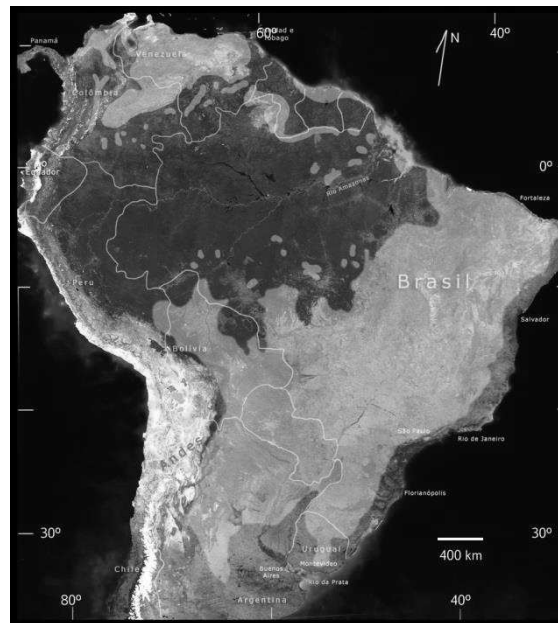
LAMAR; BRODIE, 2004). No Brasil, é encontrada em ambientes de vegetação mais aberta, como cerrado, caatinga, campos, evitando as florestas úmidas como a Floresta Amazônica e Mata Atlântica (figura 1.4). Também por ser vista em áreas antropizadas como lavouras e pastagens e devido a ocupação humana tem sido encontrada em ambientes onde outrora não ocorriam (BASTOS; ARAÚJO; SILVA, 2005). Tem como característica marcante a presença de um guizo na ponta da cauda formado por anéis de queratina, que aumentam em número conforme a serpente realiza as ecdises. É uma serpente de ciclo reprodutivo bianual, semelhante ao da jararaca, com cópulas no outono-inverno e nascimentos no verão (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS; PUERTO, 1995). Durante o período de cópula, machos realizam o comportamento de dança combate, no qual eles tentam subjugar o oponente sem, no entanto, utilizar de picadas ou mordidas (observação pessoal). Não apresenta mudança ontogenética na sua dieta sendo uma serpente basicamente rodentívora, mas se alimentando também de pequenos marsupiais, e raramente de lagartos (SANT'ANNA; ABE, 2007). É responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos no Brasil, mas em algumas regiões esse número pode ser de 20-25% (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1991).

Figura 1.3 - Imagem de uma fêmea adulta de cascavel (*Crotalus durissus*)



Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Figura 1.4 - Distribuição da cascavel (*Crotalus durissus*)



Fonte: (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004).

Nos capítulos subsequentes iremos descrever, analisar, documentar e quantificar as malformações apresentadas pelos filhotes de jararaca e cascavel nascidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, de mães recém-capturadas na natureza (Capítulo 1 - este capítulo foi submetido à publicação como artigo ao *Jornal of Comparative Pathology*); comparar a integridade do DNA entre mães progenitoras de ninhadas com filhotes malformados com as que pariram filhotes macroscopicamente normais (Capítulo 2); e por último correlacionar a presença de filhotes apresentando anomalias congênitas com o padrão do uso do solo (agricultura, pecuária, vegetação nativa e área urbana) das localidades de procedência das mães (Capítulo 3).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos grandes avanços na área da teratologia, ou dismorfologia, em humanos e animais de laboratório, o conhecimento sobre as malformações ou anomalias congênitas ainda possui uma grande lacuna quando se trata de animais silvestres (LEIPOLD, 1980). Após os anos sessenta e setenta do século 20, ficou claramente demonstrado que a fauna e flora além serem atingidas de uma maneira direta e rápida pelas ações antropogênicas como desmatamentos, caça, introdução de espécies exóticas e etc., também estão sendo prejudicadas de uma maneira lenta, silenciosa e despercebida, pelos contaminantes e poluentes que lançamos no ambiente. O declínio das populações de anfíbios que vem ocorrendo por todo o planeta (HOULAHAN et al., 2000; STUART et al., 2004), sem que saibamos quais são as causas e como interromper este processo, talvez seja o alerta mais recente que tenhamos tido para nos focar neste problema. A ciência que relaciona o ambiente e contaminantes é a ecotoxicologia, uma vertente científica em amplo desenvolvimento nos últimos anos. Artigos e livros têm sido publicados como intuito de compreendermos melhor o que está acontecendo com o ambiente e fauna/flora que nele sobrevive. Casos de malformações em animais silvestres induzidos por contaminantes ambientais estão sendo comprovados, assim como outros processos que acometem a vida selvagem.

O Brasil é um país megadiverso em termos biológicos, mas que possui grande parte do território destinado à agricultura e que nas últimas décadas aumentou significativamente o uso de pesticidas, fertilizantes e herbicidas na agropecuária (FUTINO; SILVEIRA, 1991). No entanto não tem se dado a devida atenção aos cuidados com o uso destes insumos agrícolas pelas pessoas que lidam no campo. Como muitos destes produtos acabam se dirigindo aos corpos de água, têm surgido muitos estudos de contaminação em animais aquáticos, principalmente peixes (MATSUSHITA; SOUZA, 1994; BIDONE et al., 1997; VIDAL, 2010). Mas falta uma discussão aprofundada sobre o que tem ocorrido com os vertebrados terrestres brasileiros nos agroecossistemas.

Por serem animais de topo de cadeia e distribuídos em diversos tipos de habitats as serpentes se mostram como bons indicadores biológicos. Também as escolhemos por estarem apresentando um conjunto de alterações patológicas, as anomalias congênitas, visíveis e identificáveis. Os viperídeos, por nós estudados,

apresentaram uma grande diversidade de malformações em diversas partes do corpo, principalmente a jararaca (*Bothrops jararaca*). Também demonstramos que há uma correlação entre as malformações observadas em filhotes de jararaca e os padrões do uso do solo. Áreas com maiores atividades agrícolas apresentaram correlação positiva com as frequências de malformações, ao mesmo tempo em que localidades com maiores áreas de vegetação nativa apresentaram uma correlação negativa. Em relação à cascavel (*Crotalus durissus*) não foi possível chegar a uma conclusão definitiva, talvez devido à pequena amostragem. Também não foi possível identificar se está ocorrendo um aumento ou não nas malformações, ou se as mesmas estão modificando, pela ausência de pesquisas sistemáticas no passado. No entanto cabe, a partir deste estudo, realizar um monitoramento destas espécies para que possamos ter um panorama temporal do problema.

Esse foi apenas um início. Novas dúvidas surgiram, mas fica claro para quem se aventurar neste campo a necessidade de compor grupos multidisciplinares que atuem desde a biologia dos animais no campo, passando pelas enfermidades, toxicologia e chegando ao nível celular. O ensaio do cometa (ou "*single cell gel electrophoresis*") é uma ferramenta que tem tido grande destaque nos estudos de ecotoxicologia, pois de uma maneira relativamente barata, rápida e simples consegue analisar direta e individualmente problemas ocorridos no DNA das células.

Este estudo, a nosso ver, contribui significativamente para a discussão da influência antropogênica sobre a fauna de vertebrados terrestres no Brasil no que tange à sua relação com a agropecuária, abrindo perspectivas para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 52, n., p. 1-21, 1977.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W., HOGGREN, M., DOUGLAS, M. E. (Ed.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002, p.445-462.
- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume 2002. 188 p.
- AMARAL, A. Collectanea ophiologica. 13. Bicephalia em ophidios. **Revista Museu Paulista**, v. 15, p. 95-101, 1926.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Malformações em ninhadas de caïçaca, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 61-67, 1992.
- ANKLEY, G. T.; DIAMOND, S. A.; TIETGE, J. E.; HOLCOMBE, G. W.; JENSEN, K. M.; DEFOE, D. L.; PETERSON, R. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformations in the northern leopard frog (*Rana pipiens*). **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 13, p. 2853-2858, 2002.
- ANKLEY, G. T.; DEGITZ, S. J.; DIAMOND, S. A.; TIETGE, J. E. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BARROW, M. V. A brief history of teratology to the early 20th century. **Teratology**, v. 4, p. 119-129, 1971.
- BASTOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. F. B.; SILVA, H. R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.
- BELLAIRS, A. D. A. Congenital and developmental diseases. In: COOPER, J. E. E JACKSON, O. F. (Ed.). **Disease of the reptilia**. London: Academic Press, 1981. v.2, p.469-485.
- BELLUOMINI, H. E. Bicephalia em *Xenodon merremii* (Wagler 1824) (Serpentes). **Memórias Instituto Butantan**, v. 28, p. 85-90, 1959.
- BELLUOMINI, H. E.; LANCINI, A. R. Bicephalia em *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hall lowell) 1845 (Serpentes). Descrição de um teratódimo deródimo. **Memórias Instituto Butantan**, v. 29, p. 175-180, 1960.

BELLUOMINI, H. E. Serpenti bicefali. Revisione del materiale esistente nell'Istituto Butantan, Dipartimento di Zoologia e nell'Istituto Pinheiros, São Paulo-Brasile. **Archivo Zoologico Italiano**, v. 50, p. 129-144, 1965.

BELLUOMINI, H. E.; DE BIASI, P.; PUORTO, G.; BORELLI, V. Bicefalia em *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). (Serpentes: Viperidae, Crotalinae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 40, p. 41-77, 1978.

BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; CID DE SOUZA, T. M.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajós River Basin, Pará State, Amazon, Brazil: a screening approach. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, n. 2, p. 194-201, 1997.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e de outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução Nº 251, de 07.08.1997 – Dispõe sobre a pesquisa de novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997.

BRENT, R. L.; BECKMAN, D. A. Environmental teratogens. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 66, n. 2, p. 123-163, 1990.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the Western hemisphere**: Comstock Pub. Associates Ithaca, 2004, v.1. 1032 p.

CARSON, R. P. **The silent spring**. New York: Houghton Mifflin, 1962. 375 p.

COPE, W. G.; LEIDY, R. B.; HODGSON, E. Classes of toxicants: use classes. In: HODGSON, E. (Ed.). **A textbook of modern toxicology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, p 49-74.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 24, n., p. 87-96, 1991.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

FRASER, F. C. Causes of congenital malformations in human beings. **Journal of Chronic Disease**, v. 10, n., p. 97-110, 1959.

FUTINO, A. M.; SILVEIRA, J. M. J. F. A indústria de defensivos agrícolas no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v. 38, n. Tomo especial p. 1-43, 1991.

GHOREISHI, K. Thalidomide. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of toxicology**. Oxford: Academic Press, 2014, p.523-526.

GOELLNER, C. I. **Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil**: análise do seu impacto sobre o meio ambiente e a saúde humana. São Paulo: Artgraph, 1993. 102 p.

HELLGREN, E. C.; LOCHMILLER, R. L.; THOMAS, M. W.; GRANT, W. E. Cyclopia, congenital limb deformity, and osteomyelitis in the collared peccary, *Tayassu tajacu* (L.). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 4, p. 354-357, 1984.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER, A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752-755, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**: secondary title. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.

KAISER, J. Deformed frogs leap into spotlight at health workshop. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2051-2052, 1997.

LEIPOLD, H. W. Congenital defects of zoo and wild mammals: a review. In: MONTALI, R.; MIGAKI, G. (Ed.). **The comparative pathology of zoo animals**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1980, p.457-470.

LENZ, W.; PFEIFFER, R. A.; KOSENOW, W.; HAYMAN, D. J. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7219, p. 45-46, 1962.

LINNEHAN, R. M. Congenital encephalocele in a mandarin duckling (*Aix galericulata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, n. 2, p. 231-233, 1989.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W., HOGGREN, M., DOUGLAS, M. E. (Ed.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002, p.307-328.

MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Resíduos de pesticidas organoclorado em algumas espécies de peixe comercial da planície de inundação do alto Rio Paraná, região de Porto Rico (PR), Brasil. **Arquivos Biologia Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 637-644, 1994.

MCBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 278, n. 7216, p. 1358, 1961.

MOORE, N. W. A synopsis of the pesticide problem. In: CRAGG, J. B. (Ed.). **Advances in ecological research**: Academic Press, 1967. v. Volume 4, p.75-129.

MORGAN, H. B.; DANFORO, G. S.; HOLLAND, F. M.; MILLER, K. C.; OWENS, E. T.; RICCI, B. E.; UPPULURI, S. Y.; WASSOM, J. S. How to obtain information about the teratogenic potential of chemicals. In: KOLB, M. (Ed.). **Studies in environmental science**: Elsevier, 1988. v. 31, p.6-41.

ORÓS, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; MONTEROS, A. E.; RODRÍGUEZ, F.; HERRÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, A. Tracheal malformation in a bicephalic Honduran milk snake (*Lampropeltis hondurensis*) and subsequent fatal *Salmonella arizonae* infection. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 3, p. 331-335, 1997.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental**: problemas e soluções. Rio de Janeiro: FGB, 1979. 102 p.

PASCHOAL, A. D. Biocidas: morte a curto e a longo prazo. **Revista Brasileira Tecnologia**, v. 14, n. 1, p. 24-40, 1983.

PENDLEBURY, G. B. Congenital defects in the brood of a prairie rattlesnake. **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, n. 11, p. 2023-2025, 1976.

POWELL, J. W. B.; ARCHIBALD, R. T.; CROSS, C. A.; ROTSTEIN, D. S.; SOOP, V. M.; MCFEE, W. E. Multiple congenital cardiac abnormalities in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 3, p. 839-842, 2009.

RATCLIFFE, D. A. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. **Nature**, v. 215, p. 208-201, 1967.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: Korach, K. S. (Ed.). **Reproductive and developmental toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1998, p. 47-71.

ROTHSCHILD, B. M.; SCHULTZE, H.-P.; PELLEGRINI, R. **Herpetological osteopathology**: annotated bibliography of amphibians and reptiles. New York: Springer, 2012

RUEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; UNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W. Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, J. E GARCIA, R. C. (ED.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed. Caetés, 1987, p. 171-207.

SALOMÃO, M. D.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): feeding, reproduction and snakebite. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, n. 2, p. 101-106, 1995.

SANT'ANNA, S. S.; ABE, A. S. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 42, n. 3, p. 169-174, 2007.

SANTOS, S. **Para geneticistas e educadores**: o conhecimento cotidiano sobre herança biológica. São Paulo: Annablume, Fapesp, Sociedade Brasileira de Genética, 2005

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. R. (Ed.). **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992, p. 199-216.

SCHMIDT, C. W. Amphibian deformities continue to puzzle researchers. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 7, p. 324A-326A, 1997.

SCHUMACHER, G.-H. Teratology in cultural documents and today. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 186, n., p. 539-546, 2004.

SELBY, L. A.; NEWELL, K. W.; HAUSER, G. A.; JUNKER, G. Comparison of chlorinated hydrocarbon pesticides in maternal blood and placental tissues. **Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 247-255, 1969.

SMITH, D. W. Dysmorphology (teratology). **Journal Pediatrics**, v. 69, n. 6, p. 1150-1169, 1966.

SPEIRS, A. L. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7224, p. 303-305, 1962.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

TAYLOR, B.; SKELLY, D.; DEMARCHIS, L. K.; SLADE, M. D.; GALUSHA, D.; RABINOWITZ, P. M. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1497-1501, 2005.

TRUPKIEWICZ, J. G.; GULLAND, F. M. D.; LOWENSTINE, L. J. Congenital defects in northern elephant seals stranded along the central California coast. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 2, p. 220-225, 1997.

VIDAL, L. G. **O uso do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) como sentinela da poluição ambiental por compostos organoclorados (DDT, PCB, HCH, HCB e Mirex) em baías costeiras do Estado do Rio de Janeiro**. Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 75 p.

WARKANY, J. Congenital malformations through the ages. In: KLINGERG, M., (Ed.). **Drugs and fetal development** (Advances in experimental medicine and biology). Springer US, 1972. v. 27, p. 7-15.

WILSON, J. G. Experimental studies on congenital malformations. **Journal of Chronic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 111-130, 1959.