



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

Wadson Rodrigues Rezende

**Avaliação de células imunológicas, do baço e do testículo de
Leptodactylus fuscus (Anura) em diferentes cenários
(área preservada, agricultura e área urbana).**

São José do Rio Preto
2023

Wadson Rodrigues Rezende

**Avaliação de células imunológicas, do baço e do testículo de
Leptodactylus fuscus (Anura) em diferentes cenários
(área preservada, agricultura e área urbana).**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto
2023

Rezende, Wadson Rodrigues.

Avaliação de células imunológicas, do baço e do testículo de *Leptodactylus fuscus* (Anura) em diferentes cenários (área preservada, agricultura e área urbana). / Wadson Rodrigues Rezende. -- São José do Rio Preto, 2023
120 p.: : il., tabs.

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

Orientador: Classius de Oliveira

1. Anuros. 2. Imunidade celular. 3. Reprodução. 4. Antropização. 5. Poluição ambiental. I. Título.

Wadson Rodrigues Rezende

**Avaliação de células imunológicas, do baço e do testículo
de *Leptodactylus fuscus* (Anura) em diferentes cenários
(área preservada, agricultura e área urbana).**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
UFG – Campus Samambaia, Goiânia - GO

Prof^a. Dr^a. Juliane Silberschmidt Freitas
UEMG – Câmpus de Ituiutaba - MG

Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva
UFG – Campus Samambaia, Goiânia – GO

Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
UFMS- Campo Grande - MS

São José do Rio Preto
01 de março de 2023

Dedico a todos aqueles que ao meu redor, mesmo não entendendo o que faço, sempre estiveram ao meu lado. Dedico também a criança cientista que sempre viveu em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha mãe Zoraide e meu pai Eliton, tenho em mim não só a vida que eles me deram, mas o infinito amor, apoio, confiança, e uma infinidade de outras coisas que renderiam outra tese. Cada palavra escrita aqui, antes de mais nada é dedicada a dar orgulho a eles.

Ao meu orientador Prof Dr. Classius de Oliveira e a Dr^a Lilian Franco-Belussi, mas antes mesmo a eles, a minha eterna orientadora Prof^a Dr^a Lia Raquel de Souza Santos, é difícil por em palavras o quanto eles me inspiraram, me transformaram, o quanto o mundo foi ampliado e minha visão se tornou vasta com o impulso que eles me deram.

Dedico mais ainda a todos os amigos, os de dentro e os que estão além dos muros da faculdade que levarei sempre comigo. Ao Tainã por estar comigo sempre por ser mais que um irmão, me acompanhando desde a entrada no primeiro laboratório, e por ser alguém que eu me inspiro. Ao Bruno, que se ele eu jamais conseguiria finalizar esse trabalho, sempre solícito. A Maysa, não só nossa técnica, mas uma pessoa colocada em minha vida para me ancorar nos dias difíceis e também alegrar nas inúmeras horas de laboratório. Dedico também a Rinneu, Rhayane, Gabriel, Luciana, Lara Zácari, Lara Gregorio, Erick, Ariane, Joice, e a todos que me aguentaram nesses últimos anos e que me ajudaram a seguir.

Ao IBILCE e ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde-GO, que além de instituições de ensino exímias, foram mais que essenciais na minha formação de vida e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES: 001 Wadson R.R) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 304552/2019-4 – Classius O.) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2018/01078-7 – Classius O.) aos quais agradeço, sem o auxílio financeiro se torna impossível produzir ciência de qualidade no Brasil.

*“Por trás da montanhas o sol vai deitar
A luz dessa torre não é mais meu lar
Eu acendo a fogueira e durmo no chão
Trocando o abrigo pela vastidão
Ouço o chamado de terras além
Que revelam as trilhas dos dias que vem
E eu sigo vagando nos dias que vem
Tão pouca comida e água pra mim
O corpo diz “não”, mas a estrada diz “sim”
Eu sou tão pequeno na imensidão
Que o único alento vem de uma canção
Sinto o chamado de terras além
Procure guiar-me nos dias que vem
Prometam ajudar-me com os dias que vem
Enfrento a aventura com esse refrão
Nem todos que vagueiam perdidos estão
Não importa a tristeza nem a solidão
Nem todos que vagueiam perdidos estão.”*

Canção adaptada da obra de J.R.R.
Tolkien

RESUMO

A atividade humana gera uma variedade de resíduos químicos (e.g. agroquímicos, fertilizantes agrícolas, metabólitos de fármacos, resíduos da queima de combustíveis, metais pesados) que são lançados no meio ambiente. Alguns desses compostos apresentam grande potencial de desregulação endócrina, interferindo na sinalização normal do organismo. Os anfíbios, por terem características particulares, são sensíveis à contaminação ambiental, que pode gerar efeitos deletérios em seus sistemas, em especial o imunológico e reprodutor. Tem-se proposto uma inter-relação entre as respostas imunes e a reprodutivas, de forma que a resposta de um pode alterar a resposta do outro. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo, avaliar como diferentes paisagens antropizadas (área agrícola e urbana) alteram a imunidade celular e a morfologia esplênica, bem como a morfometria testicular de *Leptodactylus fuscus*; e se há uma inter-relação entre suas respostas. Foram analisados biomarcadores morfométricos imunológicos (contagem diferencial de leucócitos, densidade estrutural volumétrica e quantificação de mastócitos do baço) e reprodutivos (área locular e dos cistos espermatogênicos), e índice de massa escalonar (IME), para estimar a condição corporal, em anuros coletados em diferentes cenários (cultivo de soja, cana, indústria sucroalcooleira, área urbana e unidade de conservação). Com esses marcadores, foram realizadas análises comparativas correlacionais, visando estabelecer a relação entre os sistemas. Com relação aos marcadores imunes, no baço dos animais em áreas impactadas, houve uma diminuição da polpa branca e um aumento da polpa vermelha, e na frequência de mastócitos e das células pigmentares (melanomacrófagos). Já os leucócitos apresentaram variação na composição dos diferentes tipos celulares, havendo um aumento de linfócitos e neutrófilos e diminuição de basófilos, eosinófilos e monócitos. Quanto à morfometria testicular, os animais de ambientes antrópicos apresentaram um aumento dos cistos espermatogênicos, de modo que, cada cenário exerceu pressões diferentes nas proporções dos cistos. O IME evidenciou um maior número de correlações positivas (ainda que fracas) com parâmetros reprodutivos (área locular, e cistos de espermatogônias e espermatócitos). Ainda que não tenhamos encontrados relações diretas entre os marcadores dos sistemas, os animais por apresentarem boas condições corporais aparentemente podem manter tanto uma boa resposta reprodutiva quanto uma resposta imune sistêmica, nos ambientes antrópicos. Essas respostas podem ser produto de adaptações que espécies generalistas podem apresentar, capacitando-as a se manter nesses ambientes alterados.

Palavras-chave: Anuros. Imunidade celular. Morfometria esplênica. Morfometria testicular. Poluição ambiental.

ABSTRACT

Human activity generates a variety of chemical residues (e.g. agrochemicals, agricultural fertilizers, drug metabolites, fuel combustion residues, heavy metals) that are released into the environment. Some of these compounds have great potential for endocrine disruption, interfering with the body's normal signaling. Amphibians, due to their particular characteristics, are sensitive to environmental contamination, which can have deleterious effects on their systems, especially the immune and reproductive systems. An interrelationship between immune and reproductive responses has been proposed, so that the response of one can alter the response of the other. In this context, this work aimed to evaluate how different anthropized landscapes (agricultural and urban areas) alter cellular immunity and splenic morphology, as well as testicular morphometry of *Leptodactylus fuscus*; and whether there is an interrelationship between your responses. Immunological morphometric biomarkers (differential leukocyte count, volumetric structural density and quantification of splenic mast cells) and reproductive (locular area and spermatogenic cysts area) and scaled mass index (SMI) were analyzed to estimate body condition in anurans collected in different scenarios (soybean, sugarcane cultivation, sugar and alcohol industry, urban area and conservation unit). With these markers, correlational comparative analyzes were performed, aiming to establish the relationship between the systems. Regarding immune markers, in the spleen of animals in impacted areas, there was a decrease in white pulp and an increase in red pulp, and in the frequency of mast cells and pigment cells (melanomacrophages). Leukocytes, on the other hand, showed variation in the composition of different cell types, with an increase in lymphocytes and neutrophils and a decrease in basophils, eosinophils and monocytes. As for testicular morphometry, animals from anthropic environments showed an increase in spermatogenic cysts, so that each scenario exerted different pressures on the proportions of cysts. The IME showed a greater number of positive correlations (albeit weak) with reproductive parameters (locular area, and spermatogonial and spermatocyte cysts). Although we did not find direct relationships between the markers of the systems, the animals, because they presented good body conditions, apparently can maintain both a good reproductive response and a systemic immune response, in anthropic environments. These responses may be the product of adaptations that generalist species may present, enabling them to maintain themselves in these altered environments.

Keywords: Anurans. Cellular immunity. Splenic morphometry. Testicular morphometry. Environment pollution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- (INTRODUÇÃO) Figura 1:** Morfologia do baço de *Leptodactylus fuscus*: Em **A** 6
grande aumento do órgão, sendo possível evidenciar em **B** a disposição difusa da (polpa branca) corado mais intensamente, bem como a distribuição da polpa vermelha. Em **C** ressalta-se a capsula de tecido conjuntivo, que envolve externamente o órgão (ponta de seta), e também a presença de melanomacrófagos (seta), na polpa vermelha. **Pb** – Polpa branca; **Pv**- Polpa vermelha. Coloração H-E.
- (INTRODUÇÃO) Figura 2:** Leucócitos de *Leptodactylus fuscus*. **A**- linfócito; **B**- 8
neutrófilo; **C**- basófilo; **D**- eosinófilo; **E**- Monócito. Coloração azul de toluidina com boráx.
- (INTRODUÇÃO) Figura 3:** Arquitetura testicular de *L. fuscus*. Em **A** grande 10
aumento do órgão, em **B** ressalta-se os lóculos seminíferos (circunscritos em preto), esses lóculos se apresentando formatos arredondados/ovalados. Em **C**, ampliação da unidade seminífera evidenciando os cistos germinativos em diferentes estágios de diferenciação, retidos pelas células de Sertoli (setas pretas). **Sg**- espermatogônias; **Sc**- espermátocitos; **Sm**- espermátides; **Sz**- espermatozoides. Coloração H-E
- (MATERIAL E MÉTODOS: GERAL) Figura 4:** Imagens dos pontos de coletas 15
de *Leptodactylus fuscus*: **A**- Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B**- plantação de soja (Rio Verde- GO); **C**- plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D**- plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E**- ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.
- (MATERIAL E MÉTODOS: GERAL) Figura 5:** Caracterização dos ambientes 16
amostrados: **A**- Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B**- plantação de soja (Rio Verde- GO); **C**- plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D**- plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E**- ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de 2018, 2019 e 2020. Raio de 2km
- (CAPÍTULO 1) Figura 1** – Imagens dos pontos de coletas de *Leptodactylus* 48
fuscus: **A**- Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B**- plantação de soja (Rio Verde- GO); **C**- plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D**- plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E**- ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.
- (CAPÍTULO 1) Figura 2** – Caracterização dos ambientes amostrados: **A**- 49
Unidade de conservação; **B**- SOJA_GO; **C**- CANA_GO; **D**- CANA_SP; **E**- URBANO_SP. Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de 2018, 2019 e 2020. Raio de 2km.

(CAPÍTULO 1) **Figura 3** – Morfologia do baço de *L. fuscus* na unidade de 50
conservação: Em **A** grande aumento do órgão, sendo possível em **B** evidenciar
a disposição difusa da (polpa branca) corado mais intensamente, bem como a
distribuição da polpa vermelha. Em **C** ressalta-se a capsula de tecido
conjuntivo, que envolve externamente o órgão (ponta de seta), e também a
presença de melanomacrófagos (seta) e um mastócito (**D**), na polpa vermelha.
Pb – Polpa branca; **Pv**- Polpa vermelha. Coloração H-E e azul de toluidina com
boráx.

(CAPÍTULO 1) **Figura 4** – Composição estrutural do baço de *L. fuscus*: em **A**, 50
o percentual de cada componente considerando a análise agrupada; em **B**, os
percentuais considerando os cenários amostrados de maneira individualizada.
MMc - Melanomacrófagos. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** –
Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** –
Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

(CAPÍTULO 1) **Figura 5** – Composição estrutural do baço de *L. fuscus*: em 51
A,C,E e **G**, o percentual de cada componente considerando a análise
agrupada; em **B,D,F**,e **H** os percentuais considerando os cenários amostrados
de maneira individualizada. **MMc** - Melanomacrófagos. **UC**- Unidade de
conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP;
SJ_GO – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** –
Urbano_SP.

(CAPÍTULO 1) **Figura 6** – Frequência de mastócito no baço de *L. fuscus*: em 52
A, medias considerando a análise agrupada; em **B**, a frequência para os
cenários amostrados de maneira individualizada. **UC**- Unidade de
conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP;
SJ_GO – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** –
Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade
de conservação ($p<0.05$), os dados apresentados em média $\pm$ SE.

(CAPÍTULO 1) **Figura 7** – Área de melanina no baço de *L. fuscus*: em **A**, as 52
medias considerando a análise agrupada; em **B**, os valores encontrados nos
cenários amostrados de maneira individualizada. **UC**- Unidade de
conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP;
SJ_GO – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** –
Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade
de conservação ($p<0.05$), os dados apresentados em média $\pm$ SE.

(CAPÍTULO 1) **Figura 8** – Percentual de leucócitos de *L. fuscus*: as letras **A**, 54
C, **E**, **G** e **I** representam os dados tratados de forma agrupada, já em **B**, **D**, **F**,
H e **J** os dados estão representados de maneira separada. **UC**- Unidade de
conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP;
SJ_GO – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** –
Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade
de conservação ($p<0.05$). Os dados apresentados em média $\pm$ SE.

(CAPÍTULO 2) **Figura 1**: Imagens dos pontos de coletas de *Leptodactylus* 87
fuscus: **A**- Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-
GO); **B**- plantação de soja (Rio Verde- GO); **C**- plantação de cana associada
a usina (Paraúna-GO); **D**- plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E**-
ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.

(CAPÍTULO 2) **Figura 2:** Caracterização dos ambientes amostrados: **A-** 88
Unidade de conservação; **B-** SOJA_GO; **C-** CANA_GO; **D-** CANA_SP; **E-**
URBANO_SP. Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de
2018-2020. Raio de 2km.

(CAPÍTULO 2) **Figura 3:** Arquitetura testicular de *L. fuscus*. Em **A** os lóculos 88
seminíferos circunscritos em preto, para nossa amostra, esses lóculos se
apresentaram com formas arredondadas com área média de
 $23167,8 \pm 1678,7 \mu\text{m}^2$. Em **B**, ampliação da unidade seminífera evidenciando os
cistos germinativos em diferentes estágios de diferenciação, retidos pelas
células de Sertoli (setas pretas). **Sg-** espermatogônias; **Sc-** espermátocitos;
Sm- espermátides; **Sz-** espermatozoides. Coloração H-E

(CAPÍTULO 2) **Figura 4:** Área média dos parâmetros morfométricos 89
testiculares de *L. fuscus*: as letras **A, C, E, G e I** representam os dados tratados
de forma agrupada, já em **B, D, F, H e J** os dados estão representados de
maneira separada. **UC-** Unidade de conservação; **Antrop_GO** –
Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO**
– Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP. O “*” evidencia a
diferença estatística em comparação a unidade de conservação ($p < 0.05$). Os
dados apresentados em média $\pm$ SE.

(CAPÍTULO 3) **Figura 1:** Correlograma dos marcadores imunes e 113
reprodutivos. **IME-** Índice de massa escalonar; **Gonia** – espermatogônia; **Cito**
– espermátocito; **Sptz** - espermatozoide; **Tide**– espermátide; **Mast_Test**–
mastócito testicular; **Mast_baco**- mastócito no baço; **Pig_Baco**- pigmentação
no baço; **P_Branca**– Polpa Branca; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Vasos**–
vasos sanguíneos; **Melano**– melanócitos; **Linf** – linfócito; **Neut**– neutrófilos;
Baso– Basófilos; **Eosi**– Eosinófilos; **Mono**– Monócitos.

(CAPÍTULO 3) **Figura 2** – Análise dos componentes principais com dados 114
agrupados em **A**, e separados em **B**. **Vetores:** **SMI-** Índice de massa
escalonar; **Gonia** – espermatogônia; **Cito** – espermátocito; **Tide**–
espermátide; **Sptz** - espermatozoide; **Mast_Test**– mastócito testicular;
Mast_baco- mastócito no baço; **Pig_Baco**- pigmentação no baço; **P_Branca**–
Polpa Branca; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Vasos**– vasos sanguíneos;
Melano– melanócitos; **Linf** – linfócito; **Neut**– neutrófilos; **Baso**– Basófilos;
Eosi– Eosinófilos; **Mono**– Monócitos. **Grupos:** **UC** – Unidade de conservação;
SJ_GO – Soja_GO; **CN_GO**- Cana_GO; **CN_SP**- Cana_SP; **UR_SP**-
Urbano_SP.

LISTA DE TABELAS

(CAPÍTULO 1) Tabela 1 – Proporções detalhadas dos tipos de uso de solo encontrados nos pontos amostrados num raio de 2km.	55
(CAPÍTULO 1) Tabela 2 – Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. nq – não quantificado; LQ/Faixa - limite de quantificação; UC – unidade de conservação.	56
(CAPÍTULO 1) Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de <i>L. fuscus</i> .	58
(CAPÍTULO 1) Tabela 4 – Média dos valores encontrados nos parâmetros biométricos. CRC – Comprimento rostro-cloacal; ISS – Índice esplenossomático; IME – índice de massa escalonar. Média ± SE.	59
(CAPÍTULO 1) Tabela 5 – Valores estatísticos encontrados nos parâmetros biométricos, considerando como significativo $p < 0.05$. CRC – Comprimento rostro-cloacal; ISS – Índice esplenossomático; IME – índice de massa escalonar UC - Unidade de conservação; Antrop_GO – Antropizado_GO; Antrop_SP – Antropizado_SP; SJ_GO – Soja_GO; CN_GO – Cana_GO; CN_SP – Cana_SP; UR_SP – Urbano_SP.	60
(CAPÍTULO 1) Tabela 6 - Média dos valores encontrados para os componentes estruturais do baço. Média ± SE.	61
(CAPÍTULO 1) Tabela 7 - Valores estatísticos encontrados os componentes estruturais do baço, considerando como significativo $p < 0.05$. UC - Unidade de conservação; Antrop_GO – Antropizado_GO; Antrop_SP – Antropizado_SP; SJ_GO – Soja_GO; CN_GO – Cana_GO; CN_SP – Cana_SP; UR_SP – Urbano_SP.	62
(CAPÍTULO 1) Tabela 8 - Valores estatísticos encontrados os componentes estruturais do baço, considerando como significativo $p < 0.05$. UC - Unidade de conservação; Antrop_GO – Antropizado_GO; Antrop_SP – _SP; SJ_GO – Soja_GO; CN_GO – Cana_GO; CN_SP – Cana_SP; UR_SP – Urbano_SP.	63
(CAPÍTULO 2) Tabela 1 – Parametros climáticos médios dos ambientes amostrados, referentes aos respectivos anos de coleta. UC - Unidade de conservação.	91
(CAPÍTULO 2) Tabela 2 – Proporções dos tipos de uso do solo num raio de 2km dos pontos amostrados. UC - Unidade de conservação.	91
(CAPÍTULO 2) Tabela 3 – Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. nq – não quantificado; LQ/Faixa - limite de quantificação; UC – unidade de conservação.	92

(CAPÍTULO 2) Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de <i>L. fuscus</i> .	94
(CAPÍTULO 2) Tabela 5 – Média dos valores encontrados nos parâmetros biométricos. CRC – Comprimento rostro-cloacal; IGS – Índice gonadossomático. Média $\pm$ SE.	94
(CAPÍTULO 2) Tabela 6 - Valores estatísticos encontrados nos parâmetros biométricos, considerando como significativo $p < 0.05$. CRC – Comprimento rostro-cloacal; IGS – Índice gonadossomático; UC - Unidade de conservação; Antrop_GO – Antropizado_GO; Antrop_SP – Antropizado_SP; SJ_GO – Soja_GO; CN_GO – Cana_GO; C_SP – Cana_SP; UR_SP – Urbano_SP.	95
(CAPÍTULO 2) Tabela 7 - Média da área dos parâmetros morfométricos testiculares. A.LOC – área locular; Sg - espermatogônias; Sc - espermátocitos; Sm - espermátides; Sz - espermatozoides. Média $\pm$ SE.	96
(CAPÍTULO 2) Tabela 8 - Valores estatísticos encontrados para os parâmetros morfométricos testiculares, considerando como significativo $p < 0.05$. A.LOC – área locular; Sg - espermatogônias; Sc - espermátocitos; Sm - espermátides; Sz : espermatozoides; UC - Unidade de conservação; Antrop_GO – Antropizado_GO; Antrop_SP – Antropizado_SP; SJ_GO – Soja_GO; CN_GO – Cana_GO; CN_SP – Cana_SP; UR_SP – Urbano_SP.	97
Apêndice A – Proporções detalhadas dos tipos de uso de solo encontrados nos pontos amostrados num raio de 2km.	143
Apêndice B – Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. nq – não quantificado; LQ/Faixa - limite de quantificação; UC – unidade de conservação.	144
Apêndice C – Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de <i>L. fuscus</i> .	146
Apêndice D – Valores estatísticos da correlação entres os marcadores imunes e reprodutivos realizadas no Capítulo 3. Em A valor de p , sendo considerado significativo $p \leq 0.05$; em B os valores de r. IME- Índice de massa escalonar; Gonía – espermatogônia; Cito – espermátócito; Tide– espermátide; Sptz - espermatozoide; Mast_Test– mastócito testicular; Mast_baco- mastócito no baco; Pig_Baco- pigmentação no baco; P_Branca– Polpa Branca; P_Vermelha– Polpa vermelha; Vasos– vasos sanguíneos; Melano– melanócitos; Linf – linfócito; Neut– neutrófilos; Baso– Basófilos; Eosi– Eosinófilos; Mono– Monócitos.	147
Apêndice E – Valore estáticos significativos da análise dos componentes principais realizadas no Capítulo 3. Legenda: Vetores: Area_loc: área locular; Cito – espermátócito; SMI- Índice de massa escalonar; P_Vermelha– Polpa vermelha; Gonía – espermatogônia; Tide– espermátide; Sptz - espermatozoide; Neut– neutrófilos; Vasos– vasos sanguíneos; Eosi– Eosinófilos; P_Branca– Polpa Branca; Melano – melanócitos; Pig_Baco- pigmentação no baco; Baso - basófilo.	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Antrop_GO	Antropizado – GO
Antrop_SP	Antropizado - SP
CRC	Comprimento rostro-cloacal
DEs	Desreguladores endócrinos
DEV	Densidade estrutural volumétrica
H-E	Hematoxilina-eosina
ICC	Índices de condições corporais
IGS	Índice gonadossomático
IME	Índice de massa escalonar
ISS	Índice esplenossomático
MMc	Melanomacrófago
Sc	Espermátocios
Sg	Espermatogônias
Sm	Espermátides
Sz	Espermatozoides
UC	Unidade de conservação

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetro
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
μm	Micrómetro
μm²	Micrómetros cuadrados
Km	Quilómetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Alterações ambientais não naturais: pressões antrópicas e seus impactos	1
1.2	Anuros e cenários antrópicos	2
1.3	Espécie modelo e biomarcadores	4
1.3.1	Baço	5
1.3.2	Sangue: leucócitos	6
1.3.3	Sistema reprodutor masculino: testículos	8
1.4	Poluição antrópica, sistema imune, sistema reprodutor: interações	11
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIAL E METODOS: GERAL	13
3.1	Ambientes amostrados	13
3.2	Análises de água	16
3.3	Licenças e procedimentos éticos	17
4	RESULTADOS	17
	Cápítulo 1	18
	Capítulo 2	64
	Capítulo 3	73
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
7	APÊNDICES	143

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alterações ambientais não naturais: pressões antrópicas e seus impactos

As modificações nas paisagens naturais, devido às atividades humanas, infringem forte pressão as comunidades de organismos. Atividades como a agricultura, agroindústria e a expansão urbana, causam fragmentação de habitats, demandam grandes recursos hídricos e geram inúmeros resíduos, que sem o devido tratamento, impactam diversos níveis ecológicos (Ehrenfeld, 2000; McKinney, 2002; Foley et al., 2005; Grimm et al., 2008; Nellemann et al., 2009; Schiesari e Grillitsch, 2011; Hansen et al., 2012; Newbold et al., 2015; Newbold, 2018; Beckmann et al., 2019; Cordier et al., 2021; Pongratz et al., 2021).

Cada um desses cenários antrópicos apresenta características distintas, podendo influenciar os ecossistemas, as atividades agrícolas necessitam de grandes extensões de terras, do território brasileiro até o ano de 2021 cerca de 84 mil hectares foi de área plantada, sendo soja e cana os plantios mais expressivos (CONAB, 2022a; IBGE, 2023; MapBiomas, 2023). As modificações geradas pela agricultura podem alterar propriedades do solo, aumentar a emissão de gases do efeito estufa (Pongratz et al., 2021) e, além disso, utilizam de uma gama de compostos químicos, os agroquímicos, aplicados para correções e fertilização dos solos e para o controle de pragas dos cultivos, contaminando em grande escala tanto os ambientes terrestres quanto os aquáticos (Clay, 2004; Cunha et al., 2008; Schiesari e Grillitsch, 2011).

Quando o foco são as indústrias, enfaticamente a sucroalcooleira, a quantidade de resíduos produzidos é inúmera, no Brasil a cana-de açúcar foi o maior plantio em quantidade produzida em 2021 (cerca de 716 de toneladas) (IBGE, 2023), como a maior parte é destinada à produção de biocombustível, foi gerado cerca de 26,59 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2022b). Durante a produção, há a aplicação ou formação de compostos xenobióticos, iniciando no processo de plantio, onde se aplicam diversos agroquímicos e fertilizantes orgânicos e inorgânicos (Cantarella e Rossetto, 2010; Schiesari e Grillitsch, 2011), sendo registrados 126 ingredientes ativos (MAPA, 2023) e principalmente a fertirrigação com a vinhaça, um subproduto formado durante a

produção de etanol (Rebelato et al., 2013; Fuess et al., 2018), rico em matéria orgânica, fosforo potássio e nitrogênio, cujo uso contínuo pode modificar a composição iônica do solo, e contaminar os leitos de água próximos (Filoso et al., 2015; Fuess et al., 2018; 2021; Acayaba et al., 2021). Ocorrem também outros resíduos ao longo do processo como, resíduos de graxas e lubrificantes dos maquinários, escoamento da limpeza, entre outros (Rebelato et al., 2013).

A urbanização é um dos cenários antrópicos mais complexos, estimar os resíduos por eles produzidas, se torna bastante complicado devido às inúmeras fontes de contaminação dos ambientes, principalmente aquáticos, que sofrem a influência de descargas a longo prazo de águas residuais domésticas e industriais, escoamento de águas pluviais, derrames acidentais e despejo direto de resíduos sólidos—(Mackintosh e Davis, 2013). A variedade de compostos encontrados é grande, desde farmacêuticos, hormônios, produtos cosméticos (Tijani et al., 2016; Da Silva et al., 2018; Matthiessen et al., 2018), metais pesados (Esbaugh et al., 2018; Gosset et al., 2020), subprodutos industriais como desinfetantes, resíduos de queima incompleta de combustíveis fósseis (Juhasz e Naidu, 2000; Zakaria et al., 2002; Srogi, 2007; Richardson, 2008; Bukowska et al., 2022), que mesmo após o tratamento da água ainda persistem (Rai, 2008; 2009; Wee et al., 2019; Jiang et al., 2020; Gosset et al., 2020).

Muitos desses resíduos provenientes dos diferentes tipos de poluição antrópica, podem ser considerados como potenciais desreguladores endócrinos (DEs) (Tijani et al., 2016; Da Silva et al., 2018), podendo interferir na sinalização fisiológica normal, de organismos que vivem nesses ambientes como os anfíbios (Kloas, 2002; Kolpin et al., 2002; Hayes et al., 2006; 2010a; Srogi, 2007; Richardson, 2008; Chang et al., 2009; Esbaugh et al., 2018; Da Silva et al., 2018; Matthiessen et al., 2018).

1.2. Anuros e cenários antrópicos

Os anfíbios formam um grupo bastante diverso e amplamente distribuído ao longo do mundo, sendo registradas 8524 espécies (AmphibiaWeb, 2022), só no Brasil são 1188 catalogadas, sendo 1144 da ordem Anura (Segalla et al., 2021). Entretanto, esses animais são extremamente vulneráveis a mudanças ambientais e estão constantemente expostos a algum tipo de pressão antrópica

e poluição química (Schiesari et al., 2007; Esbaugh et al. 2018; Da Silva et al., 2018; Jasrotia et al., 2021), o que contribui para o declínio mundial desses organismos (Blaustein et al., 2011; Catenazzi, 2015, Grant et al., 2020).

A susceptibilidade desses organismos se dá em função de 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, na maioria das espécies (Blaustein et al., 1994; 2011; Hamlin e Guillette Jr, 2010; Yang et al., 2021), fazendo com que estejam expostos a poluentes provenientes desses dois tipos de ambientes (Schiesari et al., 2007; Tamschick et al., 2016a, 2016b). 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). Esses animais também apresentam uma mobilidade relativamente reduzida, sendo em geral, filopátricos, de forma que os indivíduos se reproduzam nos mesmos ambientes que se desenvolveram antes da metamorfose (Reading et al., 1991; Blaustein et al., 1994; Semlitsch, 1998), tornando-os altamente vulneráveis as mudanças ambientais.

Por estarem distribuídos em diversos ambientes, os anuros estão extensivamente expostos a ambientes antrópicos e seus poluentes, os efeitos que os DEs produzem nos anuros são vastos, interferindo desde a razão sexual (Goleman et al., 2002; Bogi et al., 2003; Mackenzie et al., 2003; Pettersson et al., 2006; Pettersson e Berg, 2007), disfunções e histopatologias em diversos órgãos, principalmente nos órgãos reprodutores (Hayes et al., 2002; 2003; 2010b; Çakici, 2013; 2015; Tamschick et al., 2016a;b;c; Da Silva et al., 2018; Slaby et al., 2019; Trudeau et al., 2020), aumentando incidência de ovócitos testiculares e gônadas intersexuais, diminuindo o volume de espermatozoides em machos, aumentando o número de ovócitos atrésicos em fêmeas (Mackenzie et al., 2003; Pettersson et al., 2006; Tamschick et al., 2016a;b;c; McCoy et al., 2017; Da Silva et al., 2018; Trudeau et al., 2020), entre outras anormalidades. Há reflexos também na imunidade desses animais, havendo relatos de diminuição de capacidade fagocitária, alterações da distribuição das populações de leucócitos circulantes no sangue, configurando quadros de imunomodulação e imunossupressão, deixando esses animais

cada vez mais susceptíveis a patógenos (Christin et al., 2004; 2013; Cabagna et al., 2005; Romanova e Egorikhina, 2006; Attademo et al., 2014; Fanali et al., 2018; Davis et al., 2020; Pochini e Hoverman, 2017; McCoy e Peralta, 2018; Bosch et al., 2021).

1.3. Espécie modelo e biomarcadores

Muitas investigações sobre os efeitos dos poluentes ambientais nos anuros, tem se restringido a estudos de exposição em caráter laboratorial, e com a utilização de espécies modelos como *Xenopus laevis*, os estudos em laboratórios de forma isolada, podem não ser adequados para entender e prever as respostas das comunidades naturais de anuros (Boone e James, 2005; Schiesari et al., 2006), *in natura* os organismos estão expostos a ambientes mais complexos, com diversos agentes estressores além dos poluentes, como a predação, competição, fatores abióticos, tais fatores podem modular de forma diferente, as respostas adaptativas frente a ambientes alterados poluição (e.g., Boone and Semlitsch, 2001, 2002; Relyea and Mills, 2001; Relyea, 2003).

A espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Leptodactylidae) apresenta ampla distribuição na América do Sul, categorizada como “pouco preocupante” quanto a conservação (IUCN, 2022). Devido a sua ocorrência em varios ambientes, desde campos abertos, savanas, pastagens, áreas pantanosas, florestas degradadas e habitats urbanos (IUCN, 2022), pode ser considerada um organismo modelo nativo e em crescente uso em estudos ecotoxicológicos (Fanali et al. 2018; Freitas et al., 2019; Franco-Belussi et al. 2020; Ferrante e Fearnside, 2020; Assis et al., 2021).

Uma abordagem bastante eficiente para os estudos de contaminação ambiental, é o uso de biomarcadores, isso porque os efeitos em potencial das alterações e dos poluentes ambientais podem ser bem estimados através de quantificação de células e tecidos específicos (Livingstone, 1993; Fenoglio et al., 2005; Martin et al., 2010), como as respostas imunológicas refletidas nas células de órgãos hematopoiéticos como o baço, além das populações de células sanguíneas (leucócitos), bem como respostas reprodutivas, através das células e estruturas germinativas (Christin et al., 2004; 2013; Cabagna et al., 2005; Sanchez et al., 2014; McCoy et al., 2017; Fanali et al., 2018).

1.3.1. Baço

O baço nos anuros funciona como órgão linfóide primário - sitio de linfopoiese, e principalmente secundário - sitio de apresentação de antígenos e ativação de linfócitos (Grogan et al., 2018). Em caráter estrutural constitui-se externamente de uma cápsula de tecido conjuntivo e internamente de duas polpas: a branca, onde se encontram os linfócitos; e a vermelha, onde estão alocados vasos sanguíneos e outras células de defesa, como os mastócitos e os melanomacrófagos (Franco-Belussi e De Oliveira, 2016; Akat, 2018) (**Figura 1**).

Ainda que o órgão seja um sitio de toxicidade direta e indireta (Suttie, 2006), poucos trabalhos o utilizam como indicador dos efeitos da contaminação ambiental, entretanto, sendo relatadas alterações morfológicas em sua constituição decorrente da exposição a compostos agrícolas (Linzei et al., 2003; Çakici, 2018; Riaz et al., 2021) ou proximidade á cultivos (Christin et al, 2013) que podem causar comprometimento da integridade dos componentes estruturais (como histopatologias), gerando debilidade na sua função (Çakici, 2018), e consequentemente na resposta imunológica celular.

Os mastócitos apresentam em seu citoplasma grânulos mediadores quimiotáticos, atuantes nas respostas inflamatórias (Baccari et al., 2011). A frequência dessas células tem sido atribuída a proteção a contaminantes ambientais (Fanali et al., 2018; Franco-Belussi et al., 2021; Valverde et al., 2022), e sua presença é um indicativo de inflamação tecidual (Da Silva et a., 2011). Os melanomacrófagos, um tipo de macrófago que possui melanina em seu interior, tem por função principal a resposta imune (Franco-Belussi e Oliveira 2016), estando relacionado à proteção frente a diversos estressores como radiação UV (Franco-Belussi et al. 2016), variação térmica (Santos et al., 2014) e xenobióticos (Fanali et al., 2018; Çakici, 2018; Valverde et al., 2022). Em outros órgãos hematopoiéticos, como o fígado, a variação na distribuição dos melanomacrófagos configura uma resposta protetiva a contaminantes de diversas origens como o benzopireno e surfactantes (Fanali et al., 2018; Franco-Belussi et al., 2021; Valverde et al., 2022), encontrados em resíduos urbanos e industriais (Oliveira et al., 2010; Bukowska et al., 2022), bem como agroquímicos e ambientes com intensa atividade agrícola (Fenoglio et al., 2005; De Oliveira et al., 2017; Franco-Belussi et al., 2020; Assis et al., 2021).

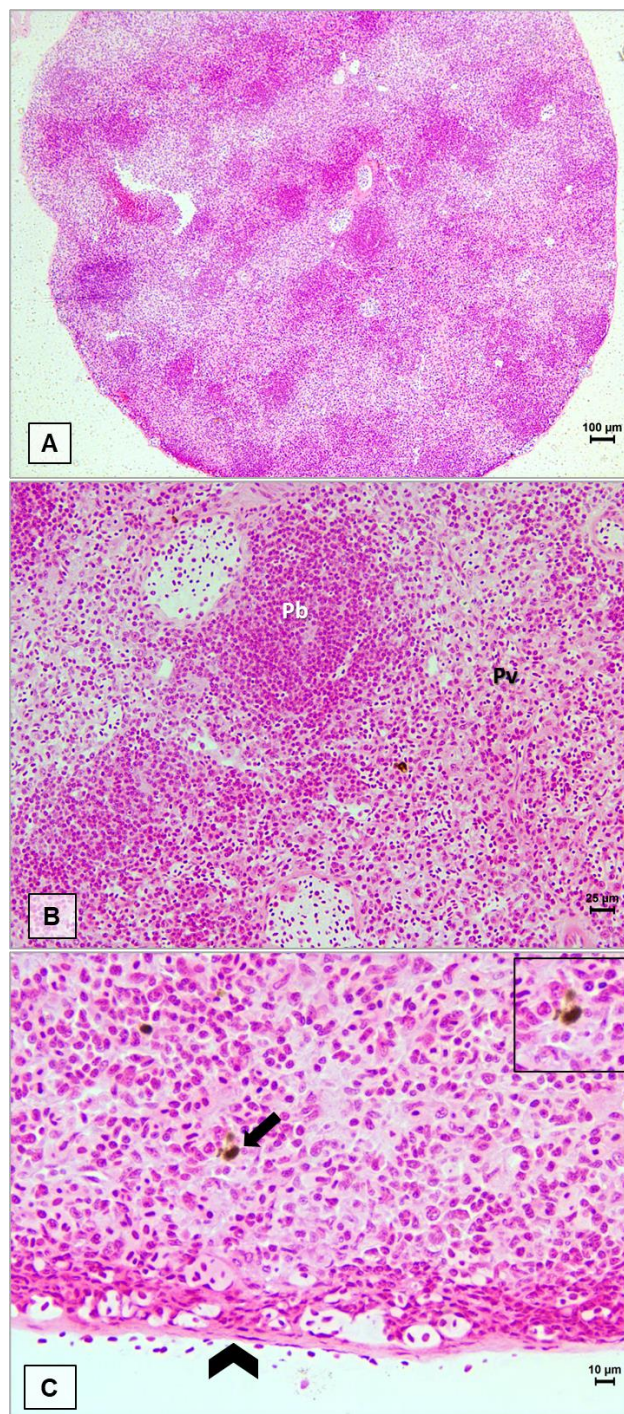


Figura 1: Morfologia do baço de *Leptodactylus fuscus*: Em **A** grande aumento do órgão, sendo possível evidenciar em **B** a disposição difusa da (polpa branca) corado mais intensamente, bem como a distribuição da polpa vermelha. Em **C** ressalta-se a capsula de tecido conjuntivo, que envolve externamente o órgão (ponta de seta), e também a presença de melanomacrófagos (seta), na polpa vermelha. **Pb** – Polpa branca; **Pv**- Polpa vermelha. Coloração H-E.

1.3.2. Sangue: leucócitos

O sangue tem sido muito utilizado como biomarcador, uma vez que contaminantes químicos quando atingem a corrente sanguínea, são carregados para diversos órgãos nos organismos (WHO, 1995; Barni et al., 2007), e

parâmetros sanguíneos como distribuição das populações de leucócitos são de amplo uso nos estudos ecotoxicológicos de anuros (Barni et al., 2007; Zhelev e Popgeotgiev, 2021).

A maioria dos vertebrados apresenta 5 tipos de leucócitos: linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (Davis et al., 2008) (**Figura 2**). Os linfócitos e seus subtipos (natural-killer, T e B) representam o investimento na resposta imune adaptativa, atuando na resposta rápida, mas mais pronunciadamente na adaptativa (Fournier et al., 2005; Shutler et al., 2009). Os neutrófilos são granulócitos com ação fagocítica, que atuam na resposta imunológica (inata) e inflamatória (Davis et al., 2008; Shutler et al., 2009). Os basófilos agem na resposta inflamatória, modulando a defesa contra parasitos e alérgenos (Falcone et al., 2006; Davis et al., 2008); eosinófilos atuam, de modo geral, contra infecções de parasitas metazoários (Davis et al., 2008; Campbell, 2012); enquanto os monócitos atuam frente a bactérias e helmintos (Davis et al., 2008; Marcogliese et al., 2009). A morfologia dessas células é bastante conservada entre os táxons (Davis, et al., 2008), de modo geral para os anuros os tipos celulares mais expressivos são neutrófilos e linfócitos (Franco-Belussi et al., 2021).

A variação no perfil leucocitário pode ser usado para inferir diretamente o estresse ao qual esses animais estão sujeitos (Davis et al., 2008; Assis et al., 2019; Santana et al., 2021), ambientes com condições estressantes como aqueles altamente modificados pela ação humana, podem estimular a liberação de hormônios glicocorticoides como a corticosterona, este hormônio é responsável por interagir com o sistema imunológico para modular a resposta inflamatória e redirecionar o recrutamento de leucócitos (Davis e Maers, 2010; Janin et al., 2011; Rollins-Smith, 2017; Davis et al., 2020), essa mobilização é facilmente detectável pela análise de contagem diferencial de leucócitos.

Sabe-se também, que poluentes ambientais podem alterar a distribuição e frequência dos leucócitos, a exemplo agroquímicos como clorpirifós, atrazina, malation e esfenvalerato atuam de forma imunossupressora, diminuindo os tipos de leucócitos deixando os anuros mais susceptíveis a infecções parasitária (Kiesecker, 2002; Silva et al., 2020,). E também, ambiente com diferentes intensidades de modificações, seja por urbanização (Priyadarshani et al., 2015; Garcia Neto et al., 2020), atividade agrícolas (Zhelev et al., 2018;

Marcogliese et al., 2009), e industrialização (Santana et al., 2021), podem gerar alterações das populações leucocitárias em anuros. Assim, as alterações de parâmetros hematológicos podem informar sobre o grau de desafio imunológico frente a fatores ambientais complexos os quais esses animais estão submetidos (Romanova e Egorikhina, 2006),

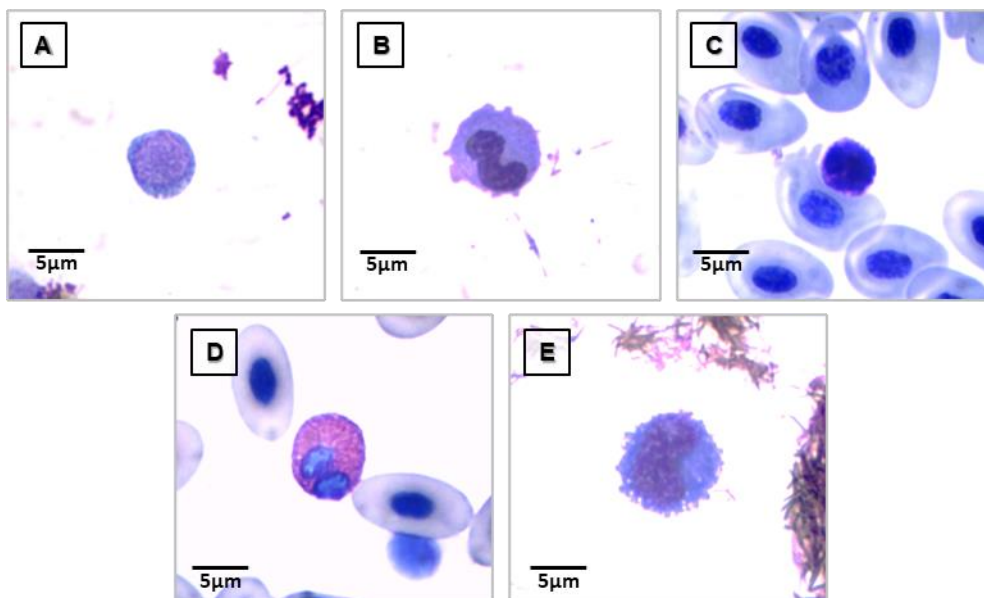


Figura 2: Leucócitos de *Leptodactylus fuscus*. **A-** linfócito; **B-** neutrófilo; **C-** basófilo; **D-** eosinófilo; **E-** Monócito. Coloração azul de toluidina com boráx.

1.3.3. Sistema reprodutor masculino: testículos

Para garantir a eficiência reprodutiva os anuros apresentam uma grande diversidade de modos reprodutivos (Haddad e Prado, 2005). Uma parte fundamental deste processo se ampara nas estruturas que compõem o sistema reprodutor, enfaticamente o masculino, que é composto de um par de testículos posicionados na parte ventral dos rins (Ogielska, e Bartmańska, 2009). De modo geral são órgãos arredondados/ovalados, recobertos pela túnica albugínea (De Oliveira e Vicentini, 1998), de coloração branco leitosa a intensamente escura (em espécies dotadas de pigmentação devido a presença de melanócitos no tecido) (Franco-Belussi et al., 2009). Histologicamente é composto por unidades arredondadas, os lóculos seminíferos, onde estão dispostas as células germinativas (Rastogi et al., 1988; De Oliveira e Vicentini, 1998; De Oliveira et al., 2002; 2003). Estes lóculos são sustentados por um tecido conjuntivo constituído por células somáticas e defesa (mastócitos), fibras colágenas e reticulares, em algumas espécies, melanócitos (De Oliveira e

Vicentini, 1998; Franco-Belussi et al., 2009; 2012; 2014; De Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Leite et al., 2015).

As células germinativas apresentam um arranjo em cistos produzidos pelas células de Sertoli (Rastogi et al., 1988; De Oliveira e Vicentini, 1998; De Oliveira et al., 2002; 2003), sendo comum observar os cistos das células iniciais (espermátogônias e espermátócitos) 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 em feixes de espermátides alongadas ou espermatozoides livres (Santos e Oliveira, 2008; Santos et al., 2011) (**Figura 3**).

Por se tratar de um processo altamente sincronizado, a espermatogênese é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitário-gonadal e seus mediadores hormonais como as gonadotrofinas hipofisárias e andrógenos produzidos pelas células de Leydig no interstício testicular (Rastogi et al., 2011). Quando poluentes ambientais (DEs) entram nessas rotas regulatórias, interferindo em sua normalidade, podem gerar inúmeras falhas reprodutivas (Hayes et al., 2010a; Trudeau et al., 2020; Jasrotia et al., 2021). A exemplo, em resíduos de escoamento urbano e industriais muitos composto estrogênicos como 17 β -estradiol e nonilfenol (Bokóny et al., 2018; Da Silva et al., 2018) causam alterações na diferenciação gonadal, com indução a feminização completa ou uma condição intersexual, e alterações da morfologia dos túbulos testiculares (Mackenzie et al., 2003; Mosconi et al., 2002; Slaby et al., 2019).

Em alguns casos, anuros que habitam áreas agrícolas, ou próximas a cidades e sítios industriais, também apresentam alterações nas áreas dos cistos germinativos iniciais, baixas contagem de espermatozoides culminando na diminuição da fertilidade desses animais (Guo et al., 2018; Orton et al., 2018; Curi et al., 2021; Rezende et al., 2021; Sluchyk et al., 2021). Assim as variações das disposições e distribuições das células germinativas, incidência de anomalias e malformações congênitas, podem atuar como estimadores do efeito de xenobióticos e ambientes humanamente alterados em parametros reprodutivo de anuros (Montezol et al., 2018; Rezende et al., 2021; Sluchyk et al., 2021).

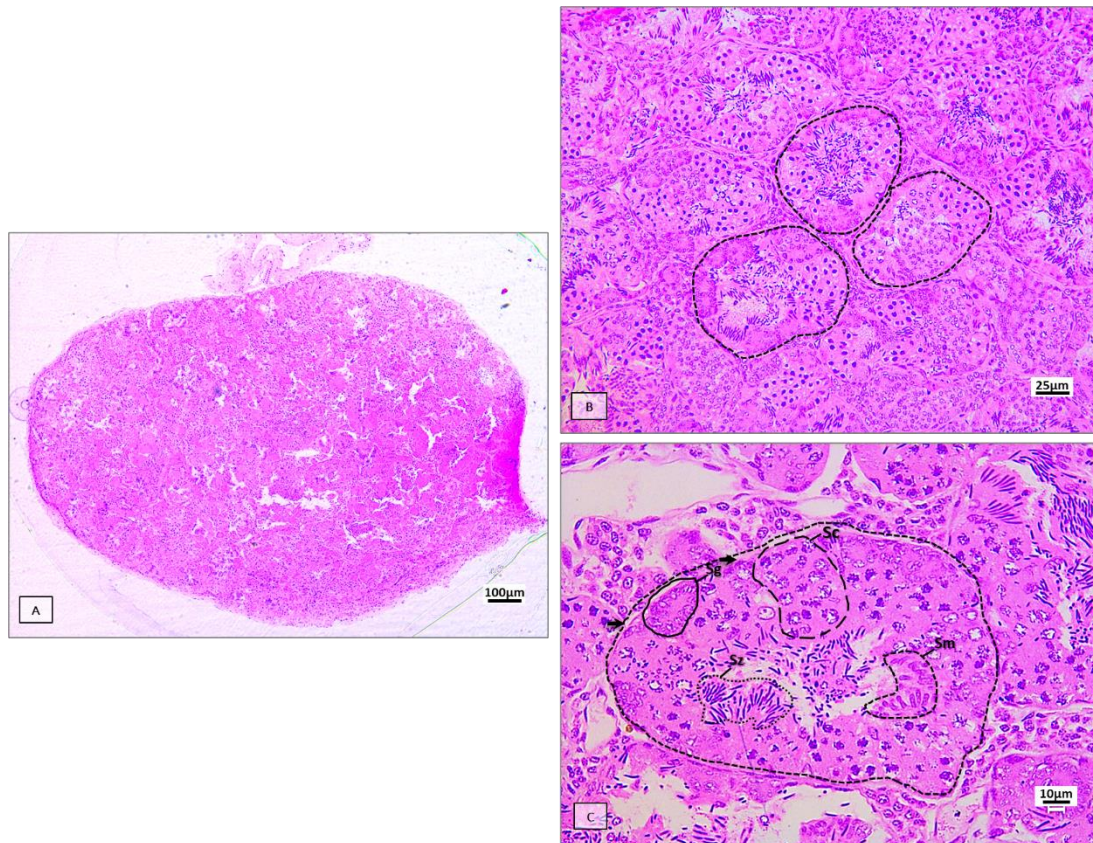


Figura 3: Arquitetura testicular de *L. fuscus*. Em **A** grande aumento do órgão, em **B** resalta-se os lóculos seminíferos (circunscritos em preto), esses lóculos se apresentando formatos arredondados/ovalados. Em **C**, ampliação da unidade seminífera evidenciando os cistos germinativos em diferentes estágios de diferenciação, retidos pelas células de Sertoli (setas pretas). **Sg**- espermatogônias; **Sc**- espermatócitos; **Sm**- espermátides; **Sz**- espermatozoides. Coloração H-E

1.4. Poluição antrópica, sistema imune, sistema reprodutor: interações

Alguns dos contaminantes ambientais encontrados nos cenários antrópicos podem atuar em dois sistemas bem distintos, como o imunológico e o reprodutor. O sistema imune dos anuros é bem similar à de outros vertebrados, apresentando componentes humorais (anticorpos) e componentes celulares (fagócitos, leucócitos granulares e agranulares e linfócitos) esse sistema, tem por função proteger os organismos de antígenos estranhos como peptídeos, microrganismos, xenobióticos, entre outros (Du Pasquier et al., 1989; 2000; Hansen e Zapata, 1998; Rollins-Smith, 1998; Dautremepuits et al., 2005).

A homeostase estabelecida pelo sistema imune prove condições para o funcionamento adequado dos outros sistemas, inclusive o reprodutor, entretanto, tem sido proposta uma inter-relação entre a reprodução e a imunidade, de forma que um pode influenciar no desempenho do outro (Van-Tienhoven, 1983; Norris e Jones, 1987; Nordling et al., 1998; Norris e Evans, 2000; Lutton e Callard, 2006; McCallum e Trauth, 2007; Brannelly et al., 2016). Esta relação se baseia na disponibilidade energética limitada que os organismos apresentam, de forma que o investimento em uma função aloca a energia disponível para tal, drenando recursos de outras atividades fisiológicas (Gadgil e Bossert, 1970; Zera e Harshman, 2001). Baseado nisso, alguns estudos têm trabalhado a premissa de uma competição por recursos energéticos entre a imunidade e reprodução (Norris e Evans, 2000), onde respostas imunes poderiam até reduzir caracteres reprodutivos, como espessura do epitélio seminífero, quantidade de espermatozoides, entre outros (Van-Tienhoven, 1983; Norris e Jones, 1987, McCallum e Trauth, 2007). Em contrapartida, há trabalhos evidenciando que hormônios sexuais ligados à reprodução como a testosterona e outros estrógenos apresentam atividade imunomoduladora, podendo suprimir ou estimular respostas defensivas (Okasha et al., 2001; Oppliger et al., 2004; Lutton e Callard, 2006; Desprat et al., 2015; Madelaire et al., 2017; Titon et al., 2018; Gomes et al., 2022; Cassettari et al., 2022).

Neste contexto, quando se pondera sobre a desregulação endócrina promovida pelos contaminantes ambientais, é plausível supor que tais compostos podem potencializar a relação imunidade-reprodução,

principalmente aqueles com propriedades estrógenas (Mackenzie et al., 2003; Christin et al., 2003; 2013; Brodtkin et al., 2007; Shutler e Marcogliese, 2011; Slaby et al., 2019; Trudeau et al., 2020; Yang et al., 2021). Químicos como a atrazina, um herbicida muito utilizado na agricultura, possuem potencial feminizador aos anuros, interferindo na testosterona plasmática, aumentando a incidência de anomalias reprodutivas como ovócitos testiculares, má formação das unidades seminíferas testiculares, e até mesmo indução completa de feminilização (Hayes et al., 2003; 2010b; Murphy et al., 2006; McDaniel et al., 2008; Trachantong et al., 2013; Sai et al., 2015). Este mesmo composto apresenta atuação no sistema imune, causando quadros de diminuição da resposta imunológica, debilidade na fagocitose, configurando uma imunossupressão (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)

2. OBJETIVOS

Nosso trabalho teve por objetivo, avaliar como ambientes com diferentes tipos de paisagens antropizadas (pela atividade agrícola e urbanização) podem alterar os aspectos celulares e morfológicos do sistema imune e reprodutor da espécie nativa *Leptodactylus fuscus*. Também iremos traçar uma inter-relação entre as respostas desses sistemas e se pode haver influência dos ambientes antropizados. Especificamente iremos:

- Gerar um perfil imunológico da espécie nessas diferentes condições ambientais antrópicas, e compará-lo com o perfil dos animais que habitam área preservada (controle), utilizando da quantificação de leucócitos e morfometria esplênica, bem como a condição corporal e de reserva energética, através do índice de massa escalonar (**Capítulo1**);
- Avaliar os efeitos de ambientes alterados na morfometria testicular (arquitetura e proporções dos cistos germinativos) desses anuros, visando investigar os efeitos em potencial que as alterações e poluentes ambientais podem exercer na reprodução desses animais; (**Capítulo 2**);
- Considerando a premissa de uma inter-relação entre imunidade e reprodução e o potencial desregulatório dos poluentes ambientais, correlacionaremos os biomarcadores imunológicos com os parâmetros

testiculares, para inferir se a resposta de um sistema exerce influência no outro (**Capítulo 3**).

3. MATERIAL E METODOS: GERAL

3.1. Ambientes amostrados

Foram coletados machos adultos de *L. fuscus* (**n = 49**) em plena atividade de vocalização durante a estação chuvosa, em 5 ambientes com paisagens distintas quanto ao uso do solo, sendo elas: Unidade de Conservação (UC) (**n=10**), plantação de soja (SOJA_GO) (**n=15**), plantação de cana associado a usina (CANA_GO) (**n=7**), plantação de cana (CANA_SP) (**n=10**), e ambiente urbano (URBANO_SP) (**n=7**) (**Figura 4**). Estes ambientes estão localizados no Brasil nos estados de São Paulo e Goiás, que são expressivos quanto à produção agrícola nacional, especificamente plantio de soja e cana-de-açúcar para a produção de biocombustível (IBGE, 2023; CONAB, 2022a; 2022b; IMB, 2022), além disso, o estado de São Paulo é o maior em extensão de áreas urbanizadas do país (IBGE, 2023).

No ambiente de soja (Rio Verde – GO; 17° 47.742' S, 051° 06.089' W) os animais foram amostrados no mês de dezembro de 2018. As coletas foram realizadas em poças semi permanentes localizadas na área de plantio, os dados climáticos obtidos do site da NASA Prediction of Worldwide Energy Resources (NASA POWER) (<https://power.larc.nasa.gov/#dataaccess>) para o ano de 2018 foram de: médias de temperatura máxima 31,9°C, mínima 14,2°C, com precipitação média de 3,4 mm/dia e irradiação de 4,8 kW/h/m²/dia.

Representando outro tipo de ambiente agrícola, foram amostrados dois pontos com predominância de cana-de-açúcar: um com áreas plantadas associadas à usina sucroalcooleira (CANA_GO) (Paraúna – GO, 17°16'38.3"S 50°29'58.2"W) e outro um plantio de cana usual – i.e. sem proximidade com usinas (CANA_SP) (São José do Rio Preto -SP, 20°31'57.3"S 49°14'24.1"W). Os animais foram coletados nos anos de 2019 e 2020 respectivamente, em poças temporárias, imersas na área de plantação e em poças margeando a área de plantio. Com média de temperatura máxima de 34,3°C e mínima de 16,4°C, precipitação de 3,5 mm/ dia e irradiação de 4,8 kW/m²/dia, para CANA_GO em 2019; em CANA_SP a temperatura máxima foi de 36°C, mínima

de 14,8°C, precipitação média de 2,6 mm/dia e irradiação de 5,7 kW/m²/dia, em 2020.

O ponto de amostragem característico de uma área urbanizada se localiza no município de São José do Rio Preto (URBANO_SP). Os animais foram coletados no mês de janeiro do ano de 2020, em poças temporárias associadas a canteiros de obras e valas de contenção fluvial, a média de temperatura máxima foi de 36°C, a mínima de 14,4°C, com precipitação de 2,6 mm/dia e irradiação 5,7kW/m²/dia.

O ambiente com a menor perturbação ambiental foi representado por uma unidade de conservação (UC), o Parque Nacional das Emas (Mineiros - GO, 18°06'59.4"S 52°55'01.4"W). Com uma área 132.000 hectares, com predominância do bioma Cerrado, sendo diferentes fitofisionomias, mata ciliar, vereda, campo rupestre, campo úmido, cerradão, campo cerrado, campo sujo e campo limpo (ICMbio, 2023). A média de temperatura máxima encontrada em 2018 na área foi de 31,8°C, a mínima de 14,3°C, com precipitação de 3,3 mm/dia e irradiação de 4,8 kW/m²/dia.

Destes pontos, foram estimadas as porcentagens das matrizes de uso do solo em um raio de 2 km (**Figura 5**), utilizando o software QGIS (3.10). A UC apresenta composição majoritariamente de campo de vegetação nativa típico do cerrado (99,3%); em Soja_GO há a dominância da matriz de soja (90,9%); Cana_GO e Cana_SP com maior predominância de plantio de cana (40,8 %); e Urbano_SP com maior porcentagem de infraestrutura urbana (51,5%). As porcentagens com maior detalhamento estão sumarizadas na **Apendice A**.



Figura 4: Imagens dos pontos de coletas de *Leptodactylus fuscus*: **A-** Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B-** plantação de soja (Rio Verde- GO); **C-** plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D-** plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E-** ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.

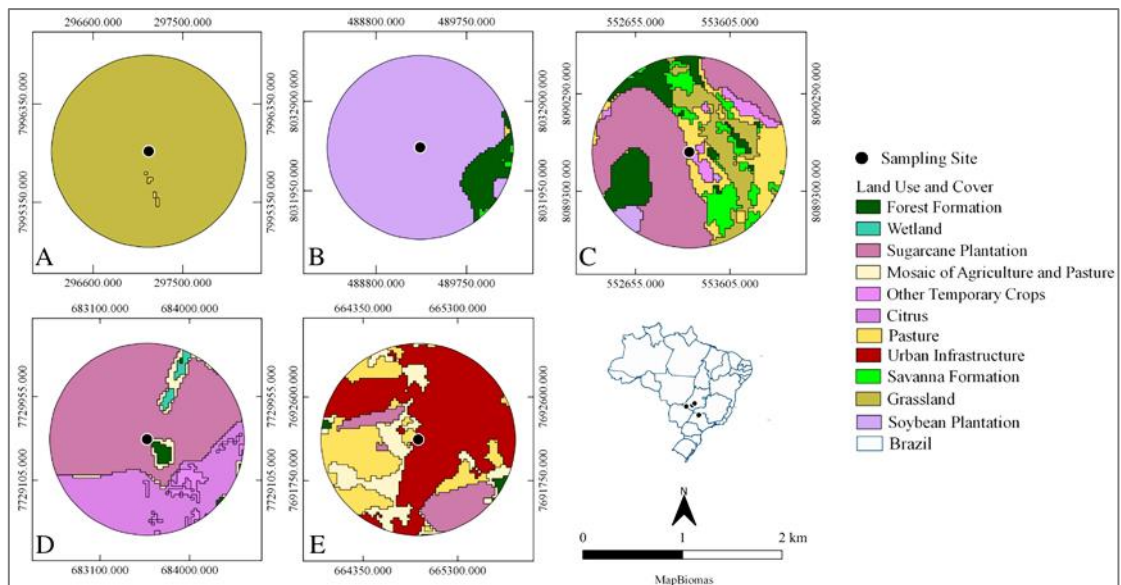


Figura 5: Caracterização dos ambientes amostrados: **A-** Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B-** plantação de soja (Rio Verde- GO); **C-** plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D-** plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E-** ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de 2018, 2019 e 2020. Raio de 2km.

3.2. Análises de água

Em cada um dos cinco ambientes, foram coletadas uma amostra de água das proximidades onde os animais foram coletados, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e plásticos, de acordo com as instruções fornecidas pelos laboratórios particulares em Rio Verde-GO e São José do Rio Preto, as quais as foram encaminhadas.

Para a os ambientes agrícolas (SOJA_GO, CANA_GO e CANA_SP) foi quantificado pesticidas dos tipos carbamatos, organoclorados e organofosforados.

Dada a complexidade de ambientes urbanos e diferentes fontes de poluentes químicos, além de pesticidas carbamato, organoclorados e organofosforados, foi acrescido a análise outros compostos como metais pesados, bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), surfactantes (como LAS), EDTAs, bisfenol-A, devido sua ocorrência em resíduos de escoamentos urbanos no Brasil (Peña-Guzmán et al., 2019; Chaves et al., 2021), e por apresentarem efeitos desregulatórios descritos na literatura para os anuros. (Tijani et al., 2013; Da Silva et al., 2018)

As análises foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos nos *Standard Methods for the examination of the water and waste water - AWWA*, 23rd, 2017. Os parâmetros foram avaliados com base nos padrões definidos pela resolução CONAMA nº 357/2005 Classe II e portaria 1.745/1979. Todos os compostos e os valores encontrados para cada ambiente, estão em maior detalhe na **Apêndice B.**

Foi também mensurado os parâmetros físico-químicos, utilizando aparelho multiparâmetro portátil Bante 900p e Akaso Ak88, sendo mensurado a temperatura da água, pH, condutividade, salinidade e O₂ dissolvido, estando listados no **Apêndice C.**

3.3. Licenças e procedimentos éticos

As licenças foram obtidas junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob protocolo 62687-1 e 18573-2; e Comitê de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP- S. J. Rio Preto sob o protocolo nº 191/2018.

4.RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão descritos separadamente em capítulos. Os capítulos estão adequados as normas da revista *Environmental Pollution*, visando a submissão a mesma (Qualis A1),

CAPÍTULO 1

Capítulo 1

Áreas antropizadas desencadeiam alterações morfofuncionais em células e tecidos imunes em *L. fuscus*

RESUMO

As alterações ambientais provenientes das atividades humanas carregam consigo uma infinidade de poluentes químicos e agentes estressores, que possuem potencial de desregulação de sistemas importantes, como o imunológico. Esse sistema é responsável pela proteção do organismo contra patógenos, sendo que sua desregulação leva a uma maior susceptibilidade a parasitos, fungos e vírus o que impacta negativamente espécies nativas, como os anuros. Este trabalho visou investigar os efeitos de cenários antropizados (áreas agrícolas e urbanizada) na imunidade celular e morfometria esplênica de *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) quando comparados a habitat natural. Foram coletados indivíduos machos adultos (n = 49) em ambientes com paisagens distintas quanto a alteração antrópica sendo eles: plantação de soja, cana, ambiente urbano, e como controle uma unidade de conservação. Destes indivíduos, foram analisados a densidade estrutural volumetria do baço (polpa branca, polpa vermelha, melanomacrófagos e vasos sanguíneos); quantificação de mastócitos e melanina esplênica; contagem diferencial de leucócitos. Com relação ao baço, os animais em áreas impactadas com atividade agrícola e urbanização, apresentaram alterações nas proporções de seus componentes quando comparados aos da unidade de conservação, havendo diminuição da polpa branca e aumento da polpa vermelha, além de aumento na frequência de mastócitos e alterações na pigmentação melânica do órgão. Já os leucócitos apresentaram variação na composição dos diferentes tipos celulares, havendo um aumento de linfócitos e neutrófilos e diminuição de basófilos, eosinófilos e monócitos. Esses resultados evidenciam que ambientes antropizados provocam alterações em diferentes componentes imunes de *L. fuscus* causando uma reação sistêmica, sendo observado uma imunomodulação (leucócitos), aumento de processos inflamatórios (mastócitos), além de um possível comprometimento da produção e capacitação de leucócitos (polpa branca).

1. INTRODUÇÃO

A existência humana demanda de grandes modificações do uso da terra e constante consumo de recursos naturais, seja para a produção alimentar e de combustíveis, constante expansão urbana, manipulação dos recursos hídricos (Foley et al. 2005; Nellemann et al., 2009), o que provoca intensa degradação ambiental e mudanças climáticas (Foley et al. 2005; Pongratz et al., 2021); sendo evidente que essas alterações exercem efeitos negativos na biodiversidade global (Hansen et al., 2012; Newbold et al., 2015; Newbold, 2018; Beckmann et al., 2019; Cordier et al., 2021).

Espécies habitam ambientes modificados, como os anuros, estão sujeitas a um conjunto de agentes estressores não naturais, o que tem levado a um intenso fenômeno de declínio mundial (Wake e Vredenburg, 2008; Hussain e Pandit, 2012; Li et al., 2013; Catenazzi, 2015), devido a ação conjunta das atividades antrópicas como a redução e modificação de seus habitats (Cordier et al., 2021), acúmulo de compostos tóxicos provenientes da poluição (Navas e Otani, 2007; Brühl et al., 2011; Hussain e Pandit, 2012), estresse causado por ruídos e luminosidade artificial (Wise, 2007; Tennessen et al., 2014; 2016; Simmons e Narins, 2018; Secondi et al., 2021), introdução de espécies exóticas (Nunes et al., 2019), surgimento de doenças infecciosas emergentes (Kolby, 2018), entre outros. Somado a isso estão os obstáculos naturais já impostos como a predação (Narayan et al., 2013), competição (Glennemeier e Denver, 2002), o que os deixam constantemente pressionados.

A exposição dos anfíbios a agentes estressores presentes em ambientes antropizados é potencializada, pois, estes animais são bastante sensíveis devido a um conjunto de características próprias tais como, pele altamente permeável (Verrell, 2000; Dohm et al., 2008; Quaranta et al., 2009), ciclo de vida complexo com estágios aquáticos e terrestres, ovos desprovidos de casca (Blaustein et al., 1994; 2011), hábitos alimentares generalistas (Santos et al., 2004) e baixa mobilidade sendo, no geral, filopátricos (Blaustein et al., 1994; Semlitsch, 1998).

Dada essa vulnerabilidade, para manter a homeostase dos anuros o sistema imunológico é de suma importância protegendo-os contra patógenos em potencial (Fournier et al., 2005), contudo, as alterações ambientais e os vários compostos poluentes neles presentes podem atuar de maneiras bem

distintas neste sistema. De forma direta, compostos desreguladores geram uma imunomodulação (supressão ou potencialização) (e.g. Romanova e Egorikhina, 2006; Christin et al., 2013; Priyadarshani et al., 2015; Santana et al., 2021), deixando esses organismos ainda mais sujeitos a outros patógenos como parasitos (Pochini e Hoverman, 2017), fungos (McCoy e Peralta, 2018; Bosch et al., 2021), vírus (Robert et al., 2019). De maneira indireta, o estresse causado por cenários antropizados geram um aumento da concentração de hormônios glicorticoides (como a corticosterona e cortisol) (Janin et al., 2011; Rollins-Smith, 2017; Davis et al., 2020), que inibem o número e atividade dos linfócitos, comprometendo a resposta de defesa nos anuros (Rollins-Smith et al., 2011; Rollins-Smith, 2017).

Um recurso para estimar os efeitos de contaminantes e estresse ambiental é através de biomarcadores, como alguns tipos de células e tecidos específicos, como os leucócitos, onde a variação das diferentes populações celulares configura quadro de resposta imune (Priyadarshani et al., 2015; Zhelev et al., 2018; Garcia Neto et al., 2020; Santana et al., 2021). As alterações também podem ser percebidas em órgãos do sistema imune como o baço, podendo alterar a massa (Priyadarshani et al., 2015; Santana et al., 2021), gerar histopatologias (Çakici, 2018) e até diminuir o número de esplenócitos (Priyadarshani et al., 2015). Outras células participantes da imunidade, como os mastócitos, podem atuar mediando respostas inflamatórias (Franco-Belussi et al., 2021); já os melanomacrófagos presentes em algumas famílias de anuros (Franco-Belussi et al., 2011; 2012; Provete et al., 2012), agem na proteção contra agentes estressores incluindo compostos xenobióticos (De Oliveira et al., 2017; Fanali et al., 2018; Franco-Belussi et al., 2021; Valverde et al., 2022).

A espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Leptodactylidae) apresenta ampla distribuição na América do Sul, categorizada como “pouco preocupante” quanto à conservação (IUCN, 2022). Devido a sua ocorrência em varios ambientes, desde campos abertos, savanas, pastagens, áreas pantanosas, florestas degradadas e habitats urbanos (IUCN, 2022), pode ser considerada um organismo modelo nativo e em crescente uso em estudos ecotoxicológicos (Fanali et al. 2018; Freitas et al., 2019; Franco-Belussi et al. 2020; Ferrante e Fearnside, 2020; Assis et al., 2021).

Assim, esse estudo teve por objetivo investigar como ambientes alterados de diferentes tipos (plantação de soja, cana, plantação de cana associada a indústria sucroalcooleira e urbano) interferem na composição do tecido esplênico, nas populações de leucócitos sanguíneos e células atuantes na resposta imune (melanomacrófagos e mastócitos), desse anuro.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ambientes amostrados

Foram coletados machos adultos de *L. fuscus* (**n = 49**) em plena atividade de vocalização durante a estação chuvosa, em 5 ambientes com paisagens distintas quanto ao uso do solo, sendo elas: Unidade de Conservação (UC) (**n=10**), plantação de soja (SOJA_GO) (**n=15**), plantação de cana associado a usina (CANA_GO) (**n=7**), plantação de cana (CANA_SP) (**n=10**), e ambiente urbano (URBANO_SP) (**n=7**). Estes ambientes estão localizados no Brasil nos estados de São Paulo e Goiás (**Figura 1**), que são expressivos quanto à produção agrícola nacional, especificamente plantio de soja e cana-de-açúcar para a produção de biocombustível (IBGE, 2023; CONAB, 2022; IMB, 2022), além disso, o estado de São Paulo é o maior em extensão de áreas urbanizadas do país (IBGE, 2023).

No ambiente de soja (Rio Verde – GO; 17° 47.742' S, 051° 06.089' W) os animais foram amostrados no mês de dezembro de 2018. As coletas foram realizadas em poças semi permanentes localizadas na área de plantio, os dados climáticos obtidos do site da NASA Prediction of Worldwide Energy Resources (NASA POWER) (<https://power.larc.nasa.gov/#dataaccess>) para o ano de 2018 foram de: médias de temperatura máxima 31,9°C, mínima 14,2°C, com precipitação média de 3,4 mm/dia e irradiação de 4,8 kW/h/m²/dia.

Representando outro tipo de ambiente agrícola, foram amostrados dois pontos com predominância de cana-de-açúcar: um com áreas plantadas associadas à usina sucroalcooleira (CANA_GO) (Paraúna – GO, 17°16'38.3"S 50°29'58.2"W) e outro um plantio de cana usual – i.e. sem proximidade com usinas (CANA_SP) (São José do Rio Preto -SP, 20°31'57.3"S 49°14'24.1"W). Os animais foram coletados nos anos de 2019 e 2020 respectivamente, em poças temporárias, imersas na área de plantação e em poças margeando a

área de plantio. Com média de temperatura máxima de 34,3°C e mínima de 16,4°C, precipitação de 3,5 mm/ dia e irradiação de 4,8 kW/m²/dia, para CANA_GO em 2019; em CANA_SP a temperatura máxima foi de 36°C, mínima de 14,8°C, precipitação média de 2,6 mm/dia e irradiação de 5,7 kW/m²/dia, em 2020.

O ponto de amostragem característico de uma área urbanizada se localiza no município de São José do Rio Preto (URBANO_SP). Os animais foram coletados no mês de janeiro do ano de 2020, em poças temporárias associadas a canteiros de obras e valas de contenção fluvial, a média de temperatura máxima foi de 36°C, a mínima de 14,4°C, com precipitação de 2,6 mm/dia e irradiação 5,7kW/m²/dia.

O ambiente com a menor perturbação ambiental foi representado por uma unidade de conservação (UC), o Parque Nacional das Emas (Mineiros -GO, 18°06'59.4"S 52°55'01.4"W). Com uma área 132.000 hectares, com predominância do bioma Cerrado, sendo diferentes fitofisionomias, mata ciliar, vereda, campo rupestre, campo úmido, cerradão, campo cerrado, campo sujo e campo limpo (ICMbio, 2022). A média de temperatura máxima encontrada em 2018 na área foi de 31,8°C, a mínima de 14,3°C, com precipitação de 3,3 mm/dia e irradiação de 4,8 kW/m²/dia.

Destes pontos, foram estimadas as porcentagens das matrizes de uso do solo em um raio de 2 km (**Figura 2**), utilizando o software QGIS (3.10). A UC apresenta composição majoritariamente de campo de vegetação nativa típico do cerrado (99,3%); em Soja_GO há a dominância da matriz de soja (90,9%); Cana_GO e Cana_SP com maior predominância de plantio de cana (40,8 %); e Urbano_SP com maior porcentagem de infraestrutura urbana (51,5%). As porcentagens com maior detalhamento estão sumarizadas na **Tabela 1**.

2.2. Análises de água

Em cada um dos cinco ambientes, foram coletadas uma amostra de água das proximidades onde os animais foram coletados, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e plásticos, de acordo com as instruções fornecidas pelos laboratórios particulares em Rio Verde-GO e São José do Rio Preto, as quais as foram encaminhadas.

Para a os ambientes agrícolas (SOJA_GO, CANA_GO e CANA_SP) foi quantificado pesticidas dos tipos carbamatos, organoclorados e organofosforados.

Dada a complexidade de ambientes urbanos e diferentes fontes de poluentes químicos, além de pesticidas carbamato, organoclorados e organofosforados, foi acrescido a análise outros compostos como metais pesados, bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), surfactantes (como LAS), EDTAs, bisfenol-A, devido sua ocorrência em resíduos de escoamentos urbanos no Brasil (Peña-Guzmán et al., 2019; Chaves et al., 2021), e por apresentarem efeitos desregulatórios descritos na literatura para os anuros. (Tijani et al., 2016; Da Silva et al., 2018)

As análises foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos nos *Standard Methods for the examination of the water and waste water - AWWA*, 23rd, 2017. Os parâmetros foram avaliados com base nos padrões definidos pela resolução CONAMA nº 357/2005 Classe II e portaria 1.745/1979. Todos os compostos e os valores encontrados para cada ambientes, estão em maior detalhe na **Tabela 2**.

Foi também mensurado os parametros físico-químicos da água nas proximidades dos ambientes amostrados, utilizando aparelho multiparâmetro portátil Bante 900p e Akaso Ak88, sendo mensurado a temperatura da água, pH, condutividade, salinidade e O₂ dissolvido (**Tabela 3**).

2.3. Licenças e procedimentos éticos

As licenças foram obtidas junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob protocolo 62687-1 e 18573-2; e Comitê de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP- S. J. Rio Preto sob o protocolo nº 191/2018.

2.4 Parâmetros biométricos

Os animais foram transportados para o Laboratório de Biologia Animal no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde-GO e Laboratório de Anatomia Comparada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto-SP), onde foram obtidas as medidas biométricas, como o peso total (g), utilizando de balança analítica (precisão

0,0001g); e aferido o comprimento rostro-cloacal (mm) com paquímetro digital (precisão de 0,01mm).

Foi realizado também o Índice de massa escalonar (IME), esse índice é calculado pela formula:

$$\text{IME} = M_i (L_0/L_i)^{b_{\text{SMA}}}$$

Onde M_i é a massa corporal individual, L_i é o comprimento rostro-cloacal (CRC) individual, L_0 é a média do CRC da população amostrada, b é a inclinação da reta da regressão do eixo principal (*Major axis regression*) (Peig e Green, 2009). Esse índice tem sido frequentemente utilizado como um indicador de condição corporal para anuros, sendo uma importante ferramenta para estudos de conservação e avaliação de qualidade ambiental (Brodeur et al., 2020).

Em seguida, os animais foram eutanasiados em Benzocaína 5g/L, e tiveram a cavidade abdominal exposta, através de incisão ventral, seguido da extração do baço, que foi pesado para o posterior cálculo do índice esplenossomático, através da formula geral:

$$\text{ISS} = (\text{massa do órgão (g)} \div \text{massa do indivíduo (g)}) \times 100$$

Posteriormente, o órgão foi fixado em solução de Metacarn (60% álcool metílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, sendo então, encaminhado para serie de desidratação alcoólica crescente e inclusão em historesina metacrilato glicol (Historesin Leica®).

2.5 Densidade estrutural volumétrica esplênica

Para cada animal, foram feitas secções de 2µm do baço, dispostos em lâminas, onde 20 cortes espaçados foram submetidos a coloração de hematoxilina/eosina.

Foram aleatorizados 10 campos, e fotomicrografados em magnitude 40x, no microscópio de luz (Leica® Modelo DM4-B), em seguidas as imagens foram analisadas utilizando o Software ImageJ® (versão 1.48), foi aplicada uma gradícula delimitando 300 intersecções (adaptado de Freere e Weibel, 1967; Reid, 1980; Rocha et al., 1997).

Foram definidas quatro categorias de estruturas: polpa branca; polpa vermelha; vasos sanguíneos (arteriais, venosos e capilares) e melanomacrófagos (MMc); a densidade final de cada estrutura foi calculada usando a formula:

$$\text{DEV (\%)} = ([\text{It} \times 100] / \text{Tot})$$

Onde **It** é o número de intersecções quantificadas para cada categoria de estrutura, e **Tot** é o número total de intersecções na imagem.

2.6 Quantificação de mastócitos e melanina esplênica

Para a detecção de mastócitos, 20 cortes histológicos de 2µm para cada animal, foram montados em lâminas e então submetidas a coloração em solução de azul de toluidina com bórax, por 30s, em seguida lavadas rapidamente em água corrente, as lâminas então foram montadas com balsamo do canada e analisadas em microscópio de luz (Leica® Modelo DM4-B). Dos 20 cortes, 10 foram aleatoriamente analisados em sua totalidade, a área total foi quantificada utilizando o *Software ImagePro-plus* (6.0).

Para a quantificação da melanina presente nos melanomacrófagos esplênicos, as secções foram coradas em hematoxilina-eosina, e a pigmentação foi obtida pela diferença de intensidade de coloração (adaptado de Santos et al., 2014), utilizando o *Software ImagePro-plus* (6.0), sendo que para cada animal foram analisados 25 campos histológicos aleatorizados em 20 secções de 2µm.

2.7 Perfil leucocitário (contagem diferencial de leucócitos)

Amostras de sangue foram retiradas, utilizando seringas heparinizadas, e dispostas em lâmina (esfregaço), sendo fixadas em metanol a 4 °C por 20 min, e em seguida, coradas em solução de Giemsa 7,5% por 15 minutos, para a diferenciação das populações leucocitária. Para cada animal, foram quantificadas as proporções de cada tipo celular (linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos) em 100 leucócitos (de acordo com Franco-Belussi et al., 2018), utilizando de microscópio de luz (Leica® Modelo DM4-B).

2.8 Análises estatísticas

Para estimar o efeito de diferentes cenários antropizados nos parâmetros imunes e biométricos (densidade estrutural volumétrica esplênica; porcentagem

dos diferentes leucócitos; densidade dos mastócitos e área de melanina; peso; CRC; ISS e IME), os dados foram processados da seguinte maneira: inicialmente foram determinados três agrupamentos principais, onde se agregou os animais dos cenários no estado de Goiás (Soja_GO; Cana_GO), **Antropizado_GO**; os pertencentes aos ambientes no estado de São Paulo (Cana_SP; Urbano_SP), **Antropizado_SP**; e a **Unidade de conservação**, considera como o ambiente de referência, com menor interferência antrópica. Essa definição de agrupamentos foi determinada devido a distância geográfica entre os pontos amostrados, e as possíveis interferências que essas condições poderiam impor sobre os dados.

Foi então usado um Modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial para comparação do efeito dos ambientes antropizados (variável preditora categórica) na densidade estrutural do baço (polpa branca, polpa vermelha, vasos sanguíneos e melanomacrófagos), leucócitos (linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos), e frequência de mastócitos (variáveis respostas frequências).

Quanto aos dados biométricos (peso, CRC, ISS IME), foi utilizado um modelo linear *lm* e os pressupostos do modelo foram testados usando *plots* diagnósticos do pacote *sjplot*. A melanina esplênica também foi submetida ao mesmo modelo, porém com a transformação dos dados em *log* para garantir os pressupostos do teste. Os resíduos tiveram homogeneidade de variância e distribuição normal.

Houve também a comparação em pares, com os cenários tratados separadamente (UC; Soja_GO; Cana_GO; Cana_SP; Urbano_SP), visando caracterizar o efeito dos ambientes em cada parâmetro. Sendo então aplicados os mesmos modelos (modelo linear *lm* para os parâmetros biométricos e melanina esplênica, e GLM para os dados de frequência).

Todos os testes foram realizados utilizando o Software R (Team Core, versão 4.2.1).

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros biométricos

Os indivíduos de *L. fuscus* apresentaram peso médio de $9,01 \pm 0,21$ g com CRC de $45,40 \pm 0,65$ mm.

Em caráter comparativo, os animais de ambientes alterados obtiveram maiores médias de IME em comparação aos da UC (UC= $7,782 \pm 0,441$ Antrop_GO= $9,232 \pm 0,257$; Antrop_SP= $9,606 \pm 0,186$); além disso os espécimes de Cana_GO apresentaram um maior índice esplenossomático.

Com Relação ao CRC, os animais em áreas antrópicas foram menores que os presentes na UC (**Tabelas 4 e 5**), sendo que em comparação individual os animais de Cana_GO apresentaram menor peso do que na UC ($p = 0.001$).

3.2 Densidade estrutural volumétrica esplênica

Morfologicamente, o baço de *L. fuscus* é um órgão arredondado, de coloração escura. Externamente é revestido por uma capsula de tecido conjuntivo, o parênquima se constitui de formações difusas de aglomerados de células linfóides, geralmente circundado um vaso principal, caracterizando a polpa branca. A polpa vermelha apresenta formações sinusoidais, onde costuma-se visualizar células sanguíneas, é nessa porção também onde se encontram alocados os melanomacrófagos (**Figura 3**).

Com relação à sua composição, 61% do órgão é formado pela polpa vermelha; 35% de polpa branca; 3% vasos sanguíneos e 1% de MMc. Esse padrão se mostra relativamente conservado, quando se considera os agrupamentos dos cenários (**Figura 4-A**) e nos ambientes de forma individualizada (**Figura 4-B**).

Na análise comparativa dos componentes estruturais entre os tipos de cenários, houve diferença significativa na proporção da polpa vermelha de forma que os animais amostrados em ambientes alterados apresentaram maiores valores quando comparados a UC (UC: $163,3 \pm 19,5$; Antrop_GO: $178,32 \pm 11,3$; Antrop_SP: $196,4 \pm 10,3$) (**Tabelas 6 e 7**), de forma individualizada, Cana_SP apresentou a maior média para essa estrutura (**Tabela 6, Figura 5-C e D**).

Para a polpa branca houve uma resposta inversa ao da vermelha, sendo que os animais de ambientes antrópicos apresentaram menores proporções em comparação aos da UC (UC: $119,5 \pm 19,3$; Antrop_GO: $112,5 \pm 11,3$;

Antrop_SP: $92,3 \pm 10,4$), além disso, dos ambientes amostrados, CANA_SP exibiu as menores médias (**Tabela 6; Figura 5-A e B**).

Quanto aos vasos sanguíneos, animais em áreas antropizadas mostraram menores proporções significativamente desse parâmetro, onde o ambiente de Soja_GO deteve as menores proporções (**Tabelas 6 e 7; Figura 5-E e F**).

Por fim, houve diferença significativa entre a UC e o agrupamento Antrop_GO (UC: $1,9 \pm 0,84$; Antrop_GO: $1,3 \pm 0,45$; $p = 0.0003$) quanto aos melanomacrófagos, sendo os menores valores encontrados no ambiente antropizado (**Tabelas 6 e 7; Figura 5-G**). Separadamente, o cenário Urbano_SP apresentou a maior porcentagem dessa estrutura, em comparação ao controle (**Tabela 6; Figura 5-H**).

3.3 Quantificação de mastócitos e melanina esplênica

Houve uma maior frequência de mastócitos no baço dos indivíduos em ambientes antrópicos quando comparados aos da unidade de conservação (UC: $0,09 \pm 0,05$; Antrop_GO: $0,53 \pm 0,12$; Antrop_SP: $0,57 \pm 0,20$; $p < 0.0001$), sendo que as maiores médias foram encontradas nos ambientes Cana_GO e Urbano_SP (**Figura 6**).

A área de melanina presente nos melanomacrófagos também se mostrou diferente na comparação entre os cenários, sendo significativa entre a unidade de conservação e Antrop_SP (UC: $85,57 \pm 39,67$; Antrop_GO: $50,45 \pm 14,17$; Antrop_SP: $170,93 \pm 96,64$; $p = 0.02$), onde o ambiente Urbano_SP apresentou a maior média (**Figura 7**).

3.4 Perfil leucocitário

Para a amostra total, os linfócitos foram o tipo celular de maior ocorrência (48%), seguidos pelos neutrófilos (15%), monócitos (14%), eosinófilos (12%) e basófilos (10%).

A análise da contagem diferencial evidenciou considerável efeito dos ambientes antropizados nas diferentes populações celulares, quando em comparação ao controle: houve um aumento significativo para os linfócitos e neutrófilos (**Tabela 8; Figura 8-A, B, C e D**); porém, os basófilos, eosinófilos e monócitos, mostraram uma diminuição da frequência (**Tabela 8, Figura 8-E, F, G, H, I e J**).

4 DISCUSSÃO

Aqui fornecemos informações do efeito das pressões antrópicas na resposta imune de anuros em diferentes biomarcadores morfométricos e celulares associados ao sistema imunológico. Evidenciamos que animais que habitam ambientes alterados apresentaram maiores médias de índices de condições corporais (IME), mesmo com menores CRC.

A constituição do baço evidenciam alterações, de forma sintética, houve um efeito desses ambientes nos marcadores esplênicos (aumento da polpa vermelha e diminuição da branca e melanomacrófagos). Bem como uma possível resposta inflamatória evidenciada no aumento da frequência de mastócitos esplênicos, havendo também um aumento da área de melanina.

Quanto a contagem diferencial de leucócitos, houve um quadro de imunomoduação de forma que linfócitos e neutrófilos aumentaram, enquanto que os basófilos, eosinófilos e monócitos tenderam a diminuir nos animais de habitats antropizados.

4.1 Dados biométricos e índice de condição corporal

Os índices biométricos fornecem informações sobre a condição corporal que os animais exibem, podendo refletir sobre sua saúde e prever o efeito das pressões antrópicas. Indicadores de condição corporal, como o índice de massa escalonar (IME), têm sido utilizados como uma ferramenta pouco invasiva para estimar a saúde, reservas energéticas e o fitness de animais (Stevenson e Woods Jr, 2006; Peig e Green, 2010; MacCracken e Stebbings, 2012; Brodeur et al., 2020).

De maneira geral, espera-se que ambientes antropizados exerçam uma pressão negativa (i.e diminuição) nos indicadores corporais como, por exemplo, *Leptodactylus latinasuse Rinnela Fernadezae* coletadas em plantação de soja, tiveram menores índices de condições corporais (Brodeur et al., 2011); *Dendropsophus ebraccatus* encontradas em ambientes com grandes modificações exibiram menores valores para IME (Matías-Ferrer e Escalante, 2015). Entretanto, algumas espécies tendem a se beneficiar de ambientes alterados. Iglesias-Carrasco et al. (2017) evidenciaram que anfíbios que vivem

em ambientes urbanos apresentaram aumento nesses índices, em hipótese, isso seria possível, pois organismos, como os de centros urbanos, podem se adaptar a fontes alimentares não convencionais como novas comunidades exóticas de invertebrados (Iglesias-Carrasco et al., 2017). Sendo *L. fuscus* uma espécie generalista quanto aos hábitos alimentares (Santana et al., 2019), é plausível supor que as maiores médias do IME encontradas em nosso trabalho estejam relacionadas a uma maior reserva energética, gerada por uma provável adaptação alimentar.

Em contraponto, respostas imunes geram consumo energético (Demas, 2004), aumentando as taxas metabólicas (Sherman e Stephens 1998; Gardner et al., 2020), o que justificaria esses animais que vivem em ambientes alterados a terem maiores reservas energéticas (expressas pelo IME), para conseguir suprir as demandas imunológicas exercidas pela pressão antrópica.

4.2 Efeitos dos ambientes antrópicos nos marcadores esplênicos

Ainda que o baço seja um órgão de grande importância para a atividade das respostas imunes, os estudos têm se focado na constituição e caracterização dos seus componentes. Aqui propomos o uso deste órgão como um bioindicador do efeito de ambientes alterados na imunidade de anfíbios.

O baço nos anuros funciona como órgão linfóide primário (sítio de linfopoiese) e principalmente secundário (sítio de apresentação de antígenos, ativação e expansão de linfócitos T e B) (Grogan et al., 2018), em caráter estrutural, sua arquitetura é bastante conservada, constituindo-se basicamente da polpa branca (tecidos linfóides) e da polpa vermelha (parênquima esplênico hematopoiético) (Du Pasquier et al., 1989; Akat, 2018), sendo a morfologia encontrada em *L. fuscus* similar ao de outro Leptodactílideo (*Physalaemus nattereri*) descrito por Franco-Belussi e De Oliveira (2016). Considerando que este órgão é sítio de toxicidade direta e indireta (Suttie, 2006), o efeito das diferentes pressões antrópicas pode interferir em sua morfologia de diferentes maneiras. Pesticidas como o carbaril geram efeitos degenerativos na estrutura esplênica (Çakici, 2018), misturas de agrotóxicos tem a capacidade de diminuir o número de esplenócitos (Christin et al., 2004) e também, animais que

habitam próximos a áreas agrícolas apresentam diminuição da viabilidade dessas células (Christin et al., 2013).

Um de seus constituintes, a polpa branca, é formada de um agregado de tecido linfóide de atividade linfopoiética (Du Pasquier et al., 1989; Mebius e Kraal, 2005), em nossos resultados foi evidenciado que os anuros em áreas antropizadas, apresentaram menores proporções dessa polpa. Linzey et al. (2003) também evidenciaram diminuição desse tecido em *Bufo marinus* coletados em ambientes com diferentes tipos de poluentes ambientais, desde agroquímicos (p-p'DDE) a metais pesados (cádmio, cromo, cobre e zinco), já Riaz et al. (2021) demonstraram que rãs expostas ao inseticida Alpha-Cipermetrina, exibiram uma maior abundância de polpa branca. Poluentes ambientais podem atuar tanto suprimindo ou estimulando a resposta imune (imunomodulação) quanto gerando respostas anormais como autoimunidade (Fournier et al., 2005), o que pode refletir na morfologia de certos órgãos, como o baço, prejudicando suas funções (Çakici, 2018) e deixando os anuros ainda mais susceptíveis a doenças.

Outra função importante do baço é a hemocaterese - eliminação de eritrócitos antigos e/ou danificados - realizada na polpa vermelha (Suttie, 2006; Ross e Pawlina, 2018), sendo que seu aumento nos ambientes antrópicos, evidenciado em nosso trabalho, pode ser um reflexo do aumento dessa atividade, pois, anuros que habitam ambientes perturbados tendem a apresentar maiores taxas de anormalidades nucleares nos eritrócitos (e.g. Şişman et al., 2015; Borges et al., 2019; Assis et al., 2021; Zhelev et al., 2022).

Essa ação de renovação e reabsorção eritrocitária também são atribuídas aos melanomacrófagos residentes na polpa vermelha (Agius e Roberts, 2003; Franco-Belussi e De Oliveira, 2016), cuja atividade fagocítica remove as células sanguíneas, e reciclam o ferro através da degradação da hemoglobina (Agius e Agbede, 1984). Essas células apresentam melanina interna, atuando também na resposta imune frente a contaminantes ambientais (De Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Franco-Belussi e De Oliveira, 2016; De Oliveira et al., 2017).

A menor porcentagem de melanomacrófagos nos ambientes antropizados (Antrop_GO) encontrados em nosso trabalho, pode ser devido a uma resposta da melanina interna a exposição a longo prazo, onde altos níveis de compostos químicos se acumulam nesse pigmento, a ponto de levar a degeneração das

células (Larsson, 1993), compostos como o benzopireno – abundante em ambientes urbanos (Bukowska et al., 2022) – e herbicidas e fertilizantes agrícolas - como a atrazina e fosfato - causam a diminuição da área de melanomacrófagos no fígado de anuros (Rohr et al., 2008; Fanali et al., 2018; Valverde et al., 2022), efeito esse também relatado para animais encontrados em plantação de soja (Assis et al., 2021). Em contrapartida, o aumento da área pigmentar encontrado (em Antrop_SP) pode estar relacionado a atividade protetora da melanina em resposta a contaminantes ambientais. De Oliveira et al. (2017) também relataram esse aumento da pigmentação em anuros de ambientes agrícolas (plantação de soja e milho), assim como em anuros expostos a surfactantes (LAS) (Franco-Belussi et al., 2021), um composto proveniente de resíduos urbanos e industriais (Oliveira et al., 2010).

Existe uma relação anatômica próxima entre os melanomacrófagos e os mastócitos em anuros (Chieffi-Baccari et al., 1998), que também se encontram alojados na polpa vermelha (Franco-Belussi e De Oliveira, 2016). Os mastócitos estão envolvidos no processo de inflamação (Chieffi-Baccari et al., 2011), sendo que seu aumento foi relatado para espécies expostas ao benzopireno (Fanali et al., 2018; Valverde et al., 2022) e a surfactantes (Franco-Belussi et al., 2021). Em nossos resultados também evidenciamos uma maior frequência de mastócitos em animais de áreas antrópicas, sendo um indicativo de inflamação no tecido (Da Silva et al., 2011) em uma possível resposta ao estresse exercido pelo ambiente e pelos compostos ali presentes.

4.3 Alterações no perfil leucocitário

Alterações nos parâmetros hematológicos refletem a resposta adaptativa do organismo frente à influência de um complexo conjunto de fatores ambientais, além de estimar o efeito das pressões antrópicas e de seus poluentes (Romanova e Egorikhina, 2006). Dentre esses parâmetros, o perfil leucocitário é uma ferramenta bastante útil para estimar os efeitos de agentes estressores em anuros (Zhelev e Popgeotgiev, 2021) e o grau de desafio imunológico que esses animais estão submetidos (Romanova e Egorikhina, 2006).

Os linfócitos e neutrófilos são os mais abundantes e mais relevantes para caracterizar o leucograma de anuros (Franco-Belussi et al., 2022). Os

neutrófilos são granulócitos com ação fagocítica, que atuam na resposta imunológica (inata) e inflamatória (Davis et al., 2008; Shutler et al., 2009). Já os linfócitos e seus subtipos (natural-killer, T e B) representam o investimento na resposta imune adaptativa, atuando na resposta rápida (N-K), mas mais pronunciadamente na adaptativa (T e B) (Fournier et al., 2005; Shutler et al., 2009). As alterações desses dois tipos celulares são consideradas um indicador sensível e direto do efeito de estresse causado pela ação antrópica (Romanova et al., 2019; Garcia Neto et al., 2020).

O quadro mais representativo do efeito de ambientes modificados e poluentes químicos é representado por um aumento no número de neutrófilos (neutrofilia) e diminuição do número de leucócitos (leucopenia) (Davis et al., 2008; Assis et al., 2017; Romanova et al., 2019). Contudo, em nosso trabalho evidenciamos o aumento desses dois tipos celulares em áreas antropizadas. Espécimes de ambientes alterados apresentam altos níveis de hormônios glicocorticóides (Janin et al., 2011; Rollins-Smith, 2017; Davis et al., 2020), responsáveis por causar um aumento e ativação de neutrófilos (Falso et al., 2015; Assis et al., 2017). Leucócitos granulócitos, como os neutrófilos, liberam fatores pró-inflamatórios (Fournier et al., 2005; Davis, et al. 2008; Romanova et al., 2019), e as condições exercidas pela poluição ambiental podem fazer com que anuros produzam mais mediadores inflamatórios (representada pela atividade dos neutrófilos), o que, por consequência, leva ao aumento e migração dos linfócitos (Romanova et al., 2019).

Também constituintes das células imunes estão os basófilos, eosinófilos e monócitos. Os basófilos agem na resposta inflamatória, modulando a defesa contra parasitos e alérgenos (Falcone et al., 2006; Davis et al., 2008); eosinófilos atuam, de modo geral, contra infecções de parasitas metazoários (Davis et al., 2008; Campbell, 2012); enquanto os monócitos atuam frente a bactérias e helmintos (Davis et al., 2008; Marcogliese et al., 2009). Ainda que essas células ocorram em menor proporção, é a atividade conjunta delas que modulam uma eficiente resposta imune.

Alguns agroquímicos, como inseticidas clorpirifós, causam a diminuição dos basófilos em *Odontophrynus carvalhoi* (Silva et al., 2020), enquanto a exposição à atrazina, malation e esfenvalerato suprimiram os eosinófilos circulantes em *Rana sylvatica* (Anura: Ranidae), levando ao aumento de

infecções por trematódeos (Kiesecker, 2002). Em alguns casos, anuros em ambientes agrícolas apresentam uma maior abundância e intensidade de infecção helmíntica (Portela et al., 2020), o que pode estar associado a uma diminuição dos eosinófilos e basófilos, que deixam esses animais mais suscetíveis a parasitos. Estudos também relataram a diminuição dos monócitos em ambientes com alta atividade agrícola ou com maiores níveis de alteração antrópica (Marcogliese et al., 2009; Garcia Neto et al., 2020). Essas células quando migram para sítios de inflamação, se diferenciam em macrófagos (Grogan et al., 2018), em hipótese, a redução desse tipo celular pode refletir na resposta fagocítica desses animais.

Mesmo que *L. fuscus* seja de hábitos generalistas e amplamente distribuídas em ambientes modificados pela ação humana (IUCN, 2022), é visível que o perfil leucocitário se encontra alterado em algum nível, indicando que mesmo espécies em ambientes modificados podem experimentar efeitos prejudiciais associados a alteração de habitat (Garcia Neto et al., 2020). As alterações em parâmetros hematológicos evidenciam uma resposta adaptativa ao efeito de fatores ambientais complexos (Romanova e Egorikhina, 2006), pois esses animais se encontram em constantes condições estressantes.

Existe uma relação próxima entre o baço e sistema circulatório (Abdul-Majeed, 2008; Akat, 2018), dada as funções deste órgão de retenção de células sanguíneas, hematopoiese, e atuação na imunidade (Mebius e Kraus 2005; Abdul-Majeed, 2008; Çakici, 2018), e como as respostas imunes são sistêmicas e inter-relacionadas (Romanova e Egorikhina, 2006), é plausível supor que as alterações na constituição esplênica (enfaticamente na polpa branca), podem afetar as populações de leucócitos, assim, os resultados encontrados configuram um quadro de alteração generalizada da resposta imune em animais de ambientes com ação antrópica.

5 CONCLUSÕES

Ao utilizar diferentes marcadores imunes, é possível dizer que mesmo uma espécie generalista, se encontra em um grande desafio imunológico habitando ambientes antropizados, apresentando um quadro de resposta imune sistêmica, com alterações na composição estrutural esplênica com um

possível reflexo na atividade de hemocaterese, produção e capacitação de leucócitos realizados nesse órgão. O aumento dos mastócitos pode indicar uma atividade inflamatória, além do aumento da área pigmentar presente nos melanomacrófagos evidenciando uma atividade protetiva da melanina. Os resultados encontrados para linfócitos e neutrófilos merecem uma atenção, visto que alterações nesses tipos celulares evidenciam uma condição de estresse imunológico, aos quais os animais que vivem em ambientes antropizados são acometidos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul-Majeed, H. (2008). Studies on haemopoiesis and histological aspects of *Rana ridibunda* spleen. *KUFA MEDICAL JOURNAL*, 11(2).

Agius, C., Agbede, S. A. (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of fish biology*, 24(4), 471-488.DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>

Agius, C., Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499-509.DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

Akat, E. (2018). Histological characteristics of the pancreas and spleen of *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Biharean Biologist*, 12(2).

Assis, R. A., Rezende, W. R., Dos Santos, C. G. A., Benvindo-Souza, M., Amorim, N. P. L., Borges, R. E., Franco-Belussi, L., DeOliveira, C. Santos, L. R. S. (2021). Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 60741-60752.DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14974-4>

Assis, V. R., Monteiro Titon, S. C., Teixeira Queiroz-Hazarbassanov, N. G., de Oliveira Massoco, C., Ribeiro Gomes, F. (2017). Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 327(4), 200-213.DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.2093>

Beckmann, M., Gerstner, K., Akin-Fajiye, M., Ceaușu, S., Kambach, S., Kinlock, N. L., Phillips, H.R.P., Verhagen, W., Gurevitch, J., Klotz, S., Newbold, T., Verbarg, P.H., Winter, M., Seppelt, R. (2019). Conventional land-use intensification

reduces species richness and increases production: a global meta-analysis. *Global Change Biology*, 25(6), 1941-1956. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.14606>

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. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08010060.x>

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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x>

Borges, R. E., Santos, L. R. D. S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R. S., Assis, R. A., De Oliveira, C. (2019). Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(1), 22-28. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>

Bosch, J., Elvira, S., Sausor, C., Bielby, J., Gonzalez-Fernandez, I., Alonso, R., Bermejo-Bermejo, V. (2021). Increased tropospheric ozone levels enhance pathogen infection levels of amphibians. *Science of the Total Environment*, 759, 143461. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143461>

Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., Zaccagnini, M. E. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1370-1380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>

Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Candioti, J. V., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., Bahl, M. F. (2020). Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. *Ecological Indicators*, 112, 106098. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106098>

Brühl, C.A., Pieper, S., Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 2465-2472. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.650>

Bukowska, B., Mokra, K., Michałowicz, J. (2022). Benzo [a] pyrene—Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6348. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116348>

Campbell, T.W. (2012). Hematology of Amphibians. In: Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., Campbell, T. W. (Eds.). (2012). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons.

Çakıcı, Ö. (2018). Histopathological analysis of carbaryl-induced toxicity in the spleen of Levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 24917-24922. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2538-5>

Catenazzi, A. (2015). State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*, 40(1), 91-119. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

Chaves, M. D. J. S., Barbosa, S. C., & Primel, E. G. (2021). Emerging contaminants in Brazilian aquatic environment: identifying targets of potential concern based on occurrence and ecological risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 67528-67543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15245-y>

Chieffi-Baccari, G., de Paulis, A., Di Matteo, L., Gentile, M., Marone, G., Minucci, S. (1998). In situ characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta*. *Cell and tissue research*, 292(1), 151-162. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004410051045>

Chieffi-Baccari, G., Pinelli, C., Santillo, A., Minucci, S., Rastogi, R. K. (2011). Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. *International review of cell and molecular biology*, 290, 1-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386037-8.00006-5>

Christin, M. S., Menard, 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*, 67(1), 33-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007>

Christin, M.S., Ménard, L., Giroux, I. et al. (2013). Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. *Environ Sci Pollut Res* 20, 601–611 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1160-1>

Cordier, J. M., Aguilar, R., Lescano, J. N., Leynaud, G. C., Bonino, A., Miloch, D., Loyola, R., Nori, J. (2021). A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. *Biological conservation*, 253, 108863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108863>.

Da Silva, P. S., Girol, A. P., Oliani, S. M. (2011). Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Molecular vision*, 17, 1310.

Da Silva, A. P. A., de Oliveira, C. D. L., Quirino, A. M. S., da Silva, F. D. M., de Aquino Saraiva, R., & Silva-Cavalcanti, J. S. (2018). Endocrine disruptors in aquatic environment: effects and consequences on the biodiversity of fish and amphibian species. *Aquatic Science and Technology*, 6(1), 35-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.5296/ast.v6i1.12565>

Davis, A. K., Maney, D. L., Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional ecology*, 22(5), 760-772.DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>.

Davis, D.R., Ferguson, K.J., Schwarz, M.S. et al. (2020). Effects of Agricultural Pollutants on Stress Hormones and Viral Infection in Larval Salamanders. *Wetlands* 40, 577–586.DOI: <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01207-1>

De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Ma, X. P.,Sun, X. X. (2012). Melanic pigmentation in ectothermic vertebrates: occurrence and function. *Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects*. Hauppauge: Nova Science Publisher, 213-225.

De 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. *Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models*, 32(125), 2.

Demas, G. E. (2004). The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Hormones and behavior (Print)*, 45(3), 173-180.DOI:<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.11.002>

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: An International Journal*, 27(5), 1209-1216.DOI: <https://doi.org/10.1897/07-388.1>

Du Pasquier, L., Schwager, J.,Flajnik, M. F. (1989). The immune system of *Xenopus*. *Annual review of immunology*, 7, 251-275. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001343>

Falcone, F. H., Zillikens, D., Gibbs, B. F. (2006). The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Experimental dermatology*, 15(11), 855-864.DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00477.x>

Falso, P. G., Noble, C. A., Diaz, J. M.,Hayes, T. B. (2015). The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. *General and comparative endocrinology*, 212, 73-83.DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.003>

Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., De Oliveira, C. (2018). Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237, 93-102. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>

Ferrante, L., & Fearnside, P. M. (2020). Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs. *Acta Amazonica*, 50, 363-366.DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000562>

Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., Coe, M. T., Daily, G. C., Gibbs, H. K., Helkowski, J. H., Holloway, T., Howard, E. A., Kucharik, C. J., Monfreda, C., Patz, J. A., Prentice, I. C., Ramankutty, N., Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-574. DOI: [10.1126/science.111177](https://doi.org/10.1126/science.111177)

Fournier, M., Robert, J., Salo, H. M., Dautremepuits, C., Brousseau, P. (2005). Immunotoxicology of amphibians. *Applied herpetology*, 2(3), 297-309. DOI: <https://doi.org/10.1163/1570754054507451>

Franco-Belussi, L.; Santos, L. R. S.; Zieri, R.; DE Oliveira, C. (2011). Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): Occurrence and comparison. *Zoologischer Anzeiger*. v.250.p. 102-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2010.12.001>

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. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.21524>

Franco-Belussi, L., De Oliveira, C. (2016). The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. *Italian Journal of Zoology*, 83(3), 298-305. DOI: <https://doi.org/10.1080/11250003.2016.1194488>

Franco-Belussi, L., Fanali, L. Z., De Oliveira, C. (2018). UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 109-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>

Franco-Belussi L, Provete DB, Borges RE, Oliveira C, Santos LRS (2020) Idiosyncratic liver alterations of five frog species to land use changes in the Brazilian Cerrado. *PeerJ* 8:e9751. <https://doi.org/10.1101/837534>

Franco-Belussi, L., Jones-Costa, M., Salla, R. F., Souza, B. F. S., Pinto-Vidal, F. A., Oliveira, C. R., Silva-Zacarin, E. C. M., Abdalla, F. C., Duarte, I. C. S., De Oliveira, C. (2021). Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 266, 129014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129014>

Franco-Belussi, L., Provete, D. B., Leão, T. R., Siqueira, M. S., Valverde, B. S., Martins, B. O., De Oliveira, C., Fernandes, C. F. (2022). Hematological parameters of a Neotropical wild frog population, with a phylogenetic perspective on blood cell composition in Anura. *Current Zoology*, 68(3), 361-369. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zoab059>

- Freere, R. H., Weibel, E. R. (1967). Stereologic techniques in microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 87(1), 25-34.DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1967.tb04489.x>
- Freitas, J. S., Giroto, L., Goulart, B. V., Alho, L. D. O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., ... & Espíndola, E. L. G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>
- Garcia Neto, P. G., Nowakowski, A. J., da Silva, A. F. C., Oliveira, O. C. C., Guerra, R. N. M., Andrade, G. V. (2020). Leukocyte profiles of two Neotropical anuran species affected by anthropogenic habitat alteration. *Animal Conservation*, 23(5), 524-532.DOI: <https://doi.org/10.1111/acv.12564>
- Gardner, S. T., Assis, V. R., Smith, K. M., Appel, A. G., Mendonça, M. T. (2020). Innate immunity of Florida cane toads: how dispersal has affected physiological responses to LPS. *Journal of Comparative Physiology B*, 190(3), 317-327.DOI:<https://doi.org/10.1007/s00360-020-01272-7>
- Glennemeier, K. A., Denver, R. J. (2002). Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, 292(1), 32-40.DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1140>
- Grogan, L. F., Robert, J., Berger, L., Skerratt, L. F., Scheele, B. C., Castley, J. G., Newell, D.A., McCallum, H. I. (2018). Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Frontiers in immunology*, 9, 2536.DOI:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02536>
- Hansen, A.J., DeFries, R.S., Turner, W. (2012). Land Use Change and Biodiversity. In:*Land Change Science*. Remote Sensing and Digital Image Processing, vol 6. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2562-4_16
- Hussain, Q.A., Pandit, A.K. (2012). Global amphibian declines: a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(10), 348-357.DOI:<https://doi.org/10.5897/IJBC12.008>
- Iglesias-Carrasco, M., Martín, J., Cabido, C. (2017). Urban habitats can affect body size and body condition but not immune response in amphibians. *Urban Ecosystems*, 20(6), 1331-1338. DOI:<https://doi.org/10.1007/s11252-017-0685-y>
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). (2022) Parque Nacional das Emas. Disponível em: < <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado/lista-de-ucs/parna-das-emas> >. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acessado em: 15 de julho de 2022.

IMB – Instituto Mauro Borges de estatísticas e estudos socioeconômicos. Goiás em dados 2022. Disponível em: <<https://www.imb.go.gov.br>>. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

Janin, A., Léna, J. P., Joly, P. (2011). Beyond occurrence: body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. *Biological conservation*, 144(3), 1008-1016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.12.009>

Kiesecker, J. M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9900-9904. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.152098899>

Kolby, J. E. (2018). Amphibia: global amphibian declines caused by an emerging infectious disease and inadequate immune responses. In *Advances in comparative immunology* (pp. 981-990). Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_29

Larsson, B. S. (1993). Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Research*, 6(3), 127-133. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x>

Li, Y., Cohen, J.M., Rohr, J.R. (2013), Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*, 8: 145-161. DOI: <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12001>

Linzey, D., Burroughs, J., Hudson, L., Marini, M., Robertson, J., Bacon, J., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. (2003). Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *International journal of environmental health research*, 13(2), 125-148. DOI: <https://doi.org/10.1080/0960312031000098053>

MacCracken, J. G., Stebbings, J. L. (2012). Test of a body condition index with amphibians. *Journal of Herpetology*, 46(3), 346-350. DOI: <https://doi.org/10.1670/10-292>

Matías-Ferrer, N., Escalante, P. (2015). Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico. *The Herpetological Journal*, 25(3), 169-176.

Marcogliese, D. J., King, K. C., Salo, H. M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 126-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.10.001>

- McCoy, K. A., Peralta, A. L. (2018). Pesticides could alter amphibian skin microbiomes and the effects of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in microbiology*, 9, 748. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00748>
- Mebius, R. E., Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews immunology*, 5(8), 606-616. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Narayan, E. J., Cockrem, J. F., Hero, J. M. (2013). Sight of a predator induces a corticosterone stress response and generates fear in an amphibian. *PLoSone*, 8(8), e73564. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073564>
- Navas, C. A., Otani, L. (2007). Physiology, environmental change, and anuran conservation. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 6(2), 83-103. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v6i2p83-103>
- Nellemann, C., MacDevette, M., Manders, T., Eickhout, B., Svihus, B., Prins, A. G., Kaltenborn, B. P. (Eds). (2009). *The environmental food crisis – The environment's role in averting future food crises. A UNEP rapid response assessment*. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal, Disponível em: <<https://www.grida.no/publications/154>>. Acessado em: 25 de Agosto de 2022.
- Newbold, T., Hudson, L. N., Hill, S. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R. A., ... & Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520(7545), 45-50. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14324>.
- Newbold, T. (2018). Future effects of climate and land-use change on terrestrial vertebrate community diversity under different scenarios. *Proceedings of the Royal Society B*, 285 (1881), 20180792. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0792>
- Nunes, A. L., Fill, J. M., Davies, S. J., Louw, M., Rebelo, A. D., Thorp, C. J., ... & Measey, J. (2019). A global meta-analysis of the ecological impacts of alien species on native amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1897), 20182528. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2528>
- Oliveira, L. L., Costa, R. B., Duarte, I. C. S., Luiz Silva, E., & Varesche, M. B. A. (2010). Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate in fluidized bed reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27, 539-543. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322010000400005>.
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of environmental management*, 237, 408-423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Peig, J., Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>

- Peig, J., Green, A. J. (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24(6), 1323-1332. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x>
- Pochini, K., & Hoverman, J. (2017). Immediate and lag effects of pesticide exposure on parasite resistance in larval amphibians. *Parasitology*, 144(6), 817-822. DOI:10.1017/S0031182016002560
- Pongratz, J., Schwingshackl, C., Bultan, S., Obermeier, W., Havermann, F., & Guo, S. (2021). Land use effects on climate: current state, recent Progress, and emerging topics. *Current Climate Change Reports*, 1-22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40641-021-00178-y>
- Portela, A. A. B., dos Santos, T. G., & dos Anjos, L. A. (2020). Changes in land use affect anuran helminths in the South Brazilian grasslands. *Journal of Helminthology*, 94. DOI:10.1017/S0022149X20000905
- Priyadarshani, S., Madhushani, W. A. N., Jayawardena, U. A., Wickramasinghe, D. D., & Udagama, P. V. (2015). Heavy metal mediated immunomodulation of the Indian green frog, *Euphlyctis hexadactylus* (Anura: Ranidae) in urban wetlands. *Ecotoxicology and environmental safety*, 116, 40-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.037>
- Provete, D. B, Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L. R., Zieri, R., Moresco, R. M., Martins, I. A., de Almeida, S. C., & de Oliveira, C. (2012). Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. — *Zoologica Scripta*, 41, 547-556. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2012.00559.x>
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., & Lippe, C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One*, 4(11), e7699. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>
- Reid, I. M. (1980). Morphometric methods in veterinary pathology: a review. *Veterinary Pathology*, 17(5), 522-543. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098588001700502>
- Riaz, A., Majeed, M., Riaz, M. A., Iqbal, A., & Ashfaq, U. A. (2021). 18. Histopathological alteration in organs of adult male frog after exposure to alpha-cypermethrin. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 11(1), 175-180. DOI: <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2022.110019>
- Robert, J., McGuire, C. C., Nagel, S., Lawrence, B. P., Andino, F. D. J. (2019). Developmental exposure to chemicals associated with unconventional oil and gas extraction alters immune homeostasis and viral immunity of the amphibian *Xenopus*. *Science of the Total Environment*, 671, 644-654. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.395>

Rocha, E., Monteiro, R. A., & Pereira, C. A. (1997). Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 317-328. DOI:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199703\)247:3<317::AID-AR3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<317::AID-AR3>3.0.CO;2-R)

Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., ... & Beasley, V. R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235-1239. DOI:<https://doi.org/10.1038/nature07281>

Rollins-Smith, L. A., Ramsey, J. P., Pask, J. D., Reinert, L. K., Woodhams, D. C. (2011). Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and comparative biology*, 51(4), 552-562. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icr095>

Rollins-Smith, L. A. (2017). Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 111-119. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.002>

Romanova, E. B., Egorikhina, M. N. (2006). Changes in hematological parameters of *Rana* frogs in a transformed urban environment. *Russian Journal of Ecology*, 37(3), 188-192. DOI:<https://doi.org/10.1134/S1067413606030076>

Romanova, E. B., Shapovalova, K. V., Ryabinina, E. S., Gelashvili, D. B. (2019). Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)(Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions. *Biology Bulletin*, 46(10), 1230-1238. DOI:<https://doi.org/10.1134/S1062359019100273>

Ross, M. H., Pawlina, W. (2018). Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Lippincott Williams & Wilkins.

Santana, D. J., Ferreira, V. G., Crestani, G. N., & Neves, M. O. (2019). Diet of the Rufous Frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) from two contrasting environments. *Herpetozoa*, 32, 1. DOI: <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.32.e35623>

Santana, E., Schiesari, L., Gomes, F., & Martins, M. (2021). Morphophysiological traits of an amphibian exposed to historical industrial pollution in a Brazilian biodiversity hotspot. *Amphibia-Reptilia*, 42(3), 283-295. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10050>

Santos, E. M., Almeida, A. V., Vasconcelos, S. D. (2004). Feeding habits of six anuran (Amphibia: Anura) species in a rainforest fragment in Northeastern Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 94, 433-438. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0073-47212004000400014>.

Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R. E., De Oliveira, C. (2014). Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anatomical Record*, 297(5), 864-875. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.22884>

Secondi, J., Mondy, N., Gippet, J. M. W., Touzot, M., Gardette, V., Guillard, L., & Lengagne, T. (2021). Artificial light at night alters activity, body mass, and corticosterone level in a tropical anuran. *Behavioral Ecology*, 32(5), 932-940. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arab044>

Semlitsch, R.D. (1998). Biological delineation of terrestrial buffer zones for pond-breeding salamanders. *Conservation Biology*.v. 12.p.1113-1119. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.97274.x>

Sherman, E., & Stephens, A. (1998). Fever and metabolic rate in the toad *Bufo marinus*. *Journal of Thermal Biology*, 23(1), 49-52. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00045-4)

Shutler, D., Smith, T. G., & Robinson, S. R. (2009). Relationships between leukocytes and Hepatozoon spp. in green frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 67-72. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.67>

Silva, M. B. D., Fraga, R. E., Nishiyama, P. B., Silva, I. S. S. D., Costa, N. L. B., de Oliveira, L. A. A., ... & Juncá, F. A. (2020). Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(7), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04726-4>

Simmons, A. M., & Narins, P. M. (2018). Effects of anthropogenic noise on amphibians and reptiles. In *Effects of anthropogenic noise on animals* (pp. 179-208). Springer, New York, NY. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8574-6_7

Şişman, T., Aşkin, H., Türkez, H., Özkan, H., İncekara, Ü., & Çolak, S. (2015). Determination of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of the frog *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) sampled from Karasu River Basin (Turkey) for pollution impacts. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 1(2), 75-81. DOI: <https://doi.org/10.17216/LimnoFish-5000115825>

Stevenson, R. D., Woods Jr, W. A. (2006). Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and comparative biology*, 46(6), 1169-1190. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icl052>

Suttie, A. W. (2006). Histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 34(5), 466-503. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230600867750>

- Tennessen, J.B., Parks, S.E., Langkilde, T. (2014). Traffic noise causes physiological stress and impairs breeding migration behaviour in frogs. *Conservation Physiology*, 2(1). DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cou032>
- Tennessen, J. B., Parks, S. E., &Langkilde, T. L. (2016). Anthropogenic noise and physiological stress in wildlife. *The effects of noise on aquatic life II*, 1145-1148.DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2981-8_142
- Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Babajide, O. O., & Petrik, L. F. (2016). Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental chemistry letters*, 14(1), 27-49. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>
- Valverde, B.S.L., Usunomiya, H.S.M., Carvalho, C.S., Franco-Belussi, L., De Oliveira, C. (2022).Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes.*Ecotoxicology* 31, 516–523 .DOI:<https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>
- Verrell, P. (2000). Methoxychlor increases susceptibility to predation in the salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* .64:85–92.DOI: <https://doi.org/10.1007/s001289910014>
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T. (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS*. v.105. p.p 11466-11473.DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Wise, S. (2007). Studying the ecological impacts of light pollution on wildlife: amphibians as models. *Starlight: A Common Heritage*; Cipriano, M., Jafar, J., Eds, 209-218.
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K. et al. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environ Sci Pollut Res* 25, 7884–7895.DOI:<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1109-5>
- Zhelev, Z. M., Popgeorgiev, G. S. (2021). Use of Haematological Indicators in Anurans for Assessing Their Health Status When Inhabiting Conditions of Anthropogenic Stress. *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as an Example: A Review and Appraisal. *EcologiaBalkanica*, 13(2).
- Zhelev, Z., Arnaudova, D., &Tsonev, S. (2022). Genotoxicity and Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)(Anura: Ranidae) in an Industrial Area in Southern Bulgaria: Evaluation as Biomarkers for Ecological Stress Assessment. *ACTA ZOOLOGICA BULGARICA*, 74(1), 59-67.DOI:<http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/2022/002549>

PRANCHA DE FIGURAS

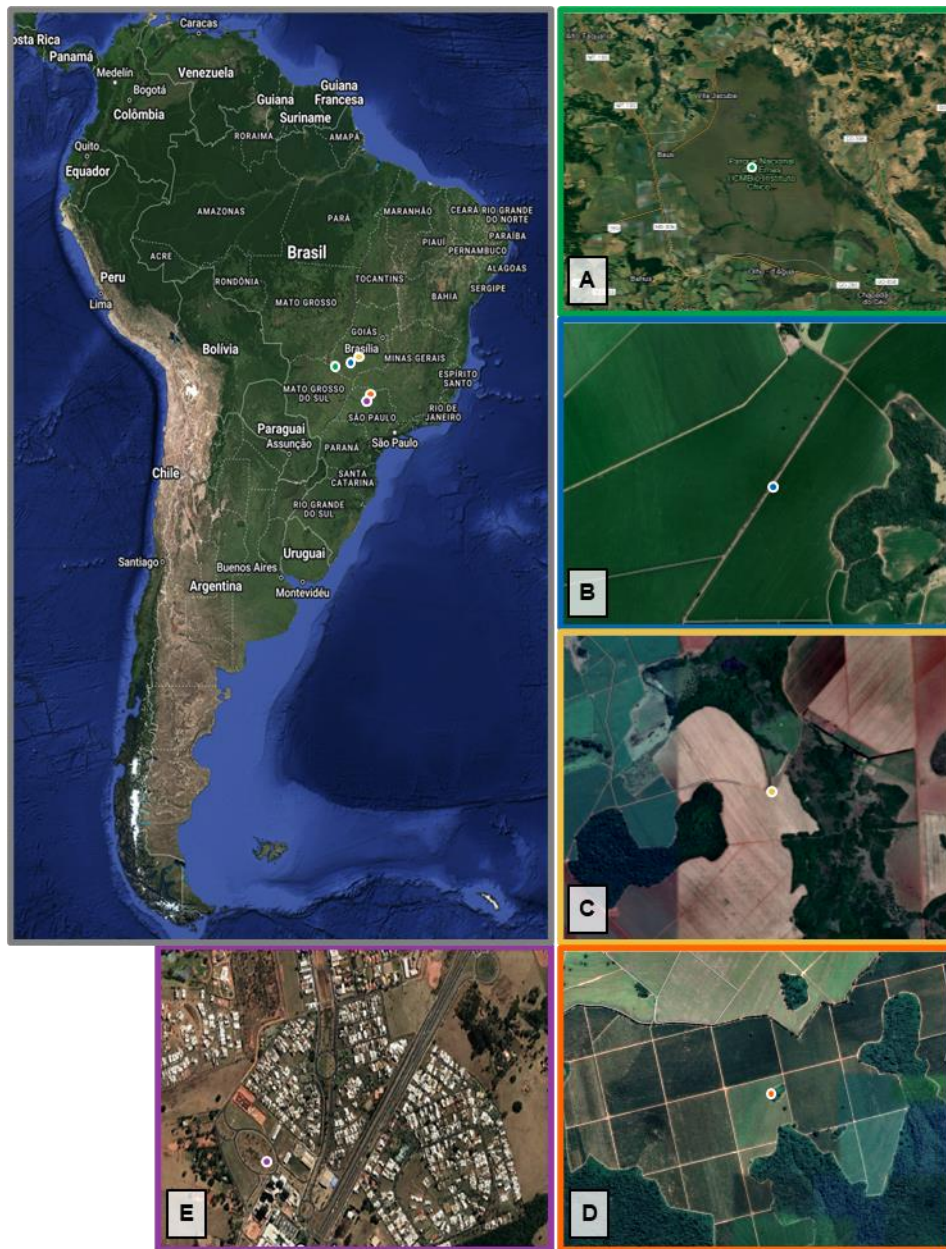


Figura 1: Imagens dos pontos de coletas de *Leptodactylus fuscus*: **A-** Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B-** plantação de soja (Rio Verde- GO); **C-** plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D-** plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E-** ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.

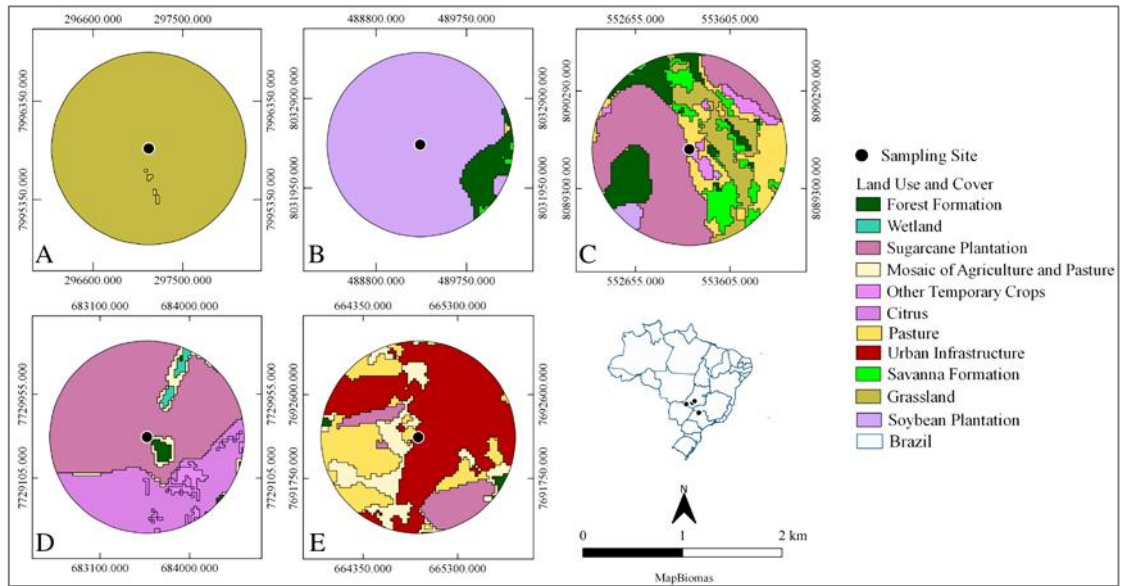


Figura 2: Caracterização dos ambientes amostrados: **A-** Unidade de conservação; **B-** SOJA_GO; **C-** CANA_GO; **D-** CANA_SP; **E-** URBANO_SP. Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de 2018, 2019 e 2020. Raio de 2km.

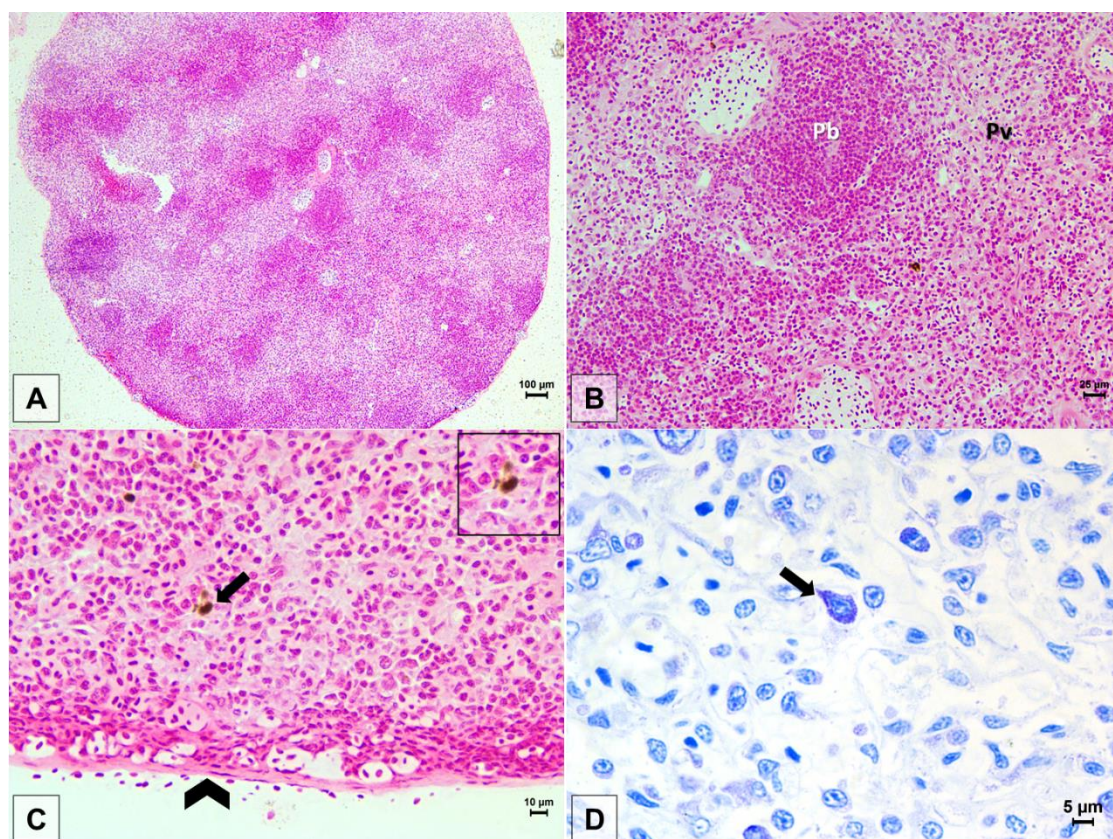


Figura 3: Morfologia do baço de *L. fuscus* na unidade de conservação: Em **A** grande aumento do órgão, sendo possível em **B** evidenciar a disposição difusa da (polpa branca) corado mais intensamente, bem como a distribuição da polpa vermelha. Em **C** resalta-se a capsula de tecido conjuntivo, que envolve externamente o órgão (ponta de seta), e também a presença de melanomacrófagos (seta) e um mastócito (**D**), na polpa vermelha. **Pb** – Polpa branca; **Pv**- Polpa vermelha. Coloração H-E e azul de toluidina com boráx.

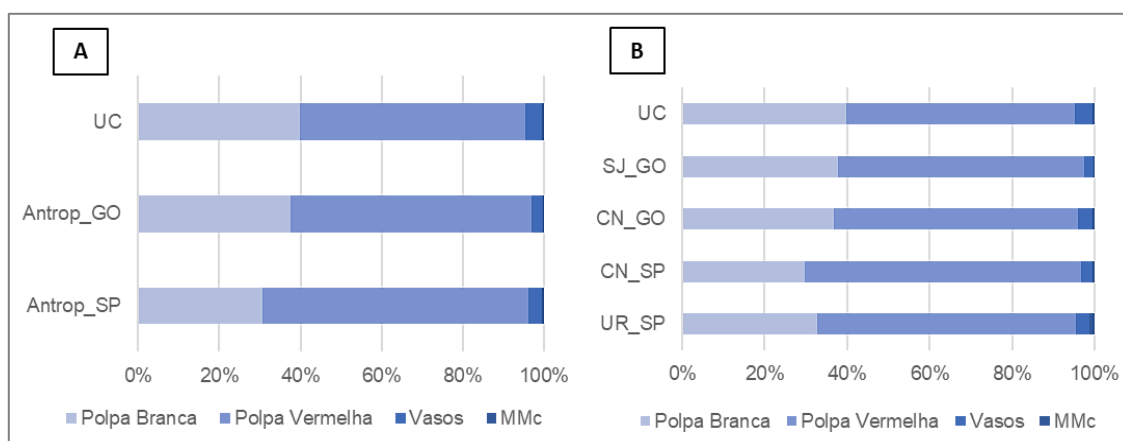


Figura 4: Composição estrutural do baço de *L. fuscus*: em **A**, o percentual de cada componente considerando a análise agrupada; em **B**, os percentuais considerando os cenários amostrados de maneira individualizada. **MMc** - Melanomacrófagos. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

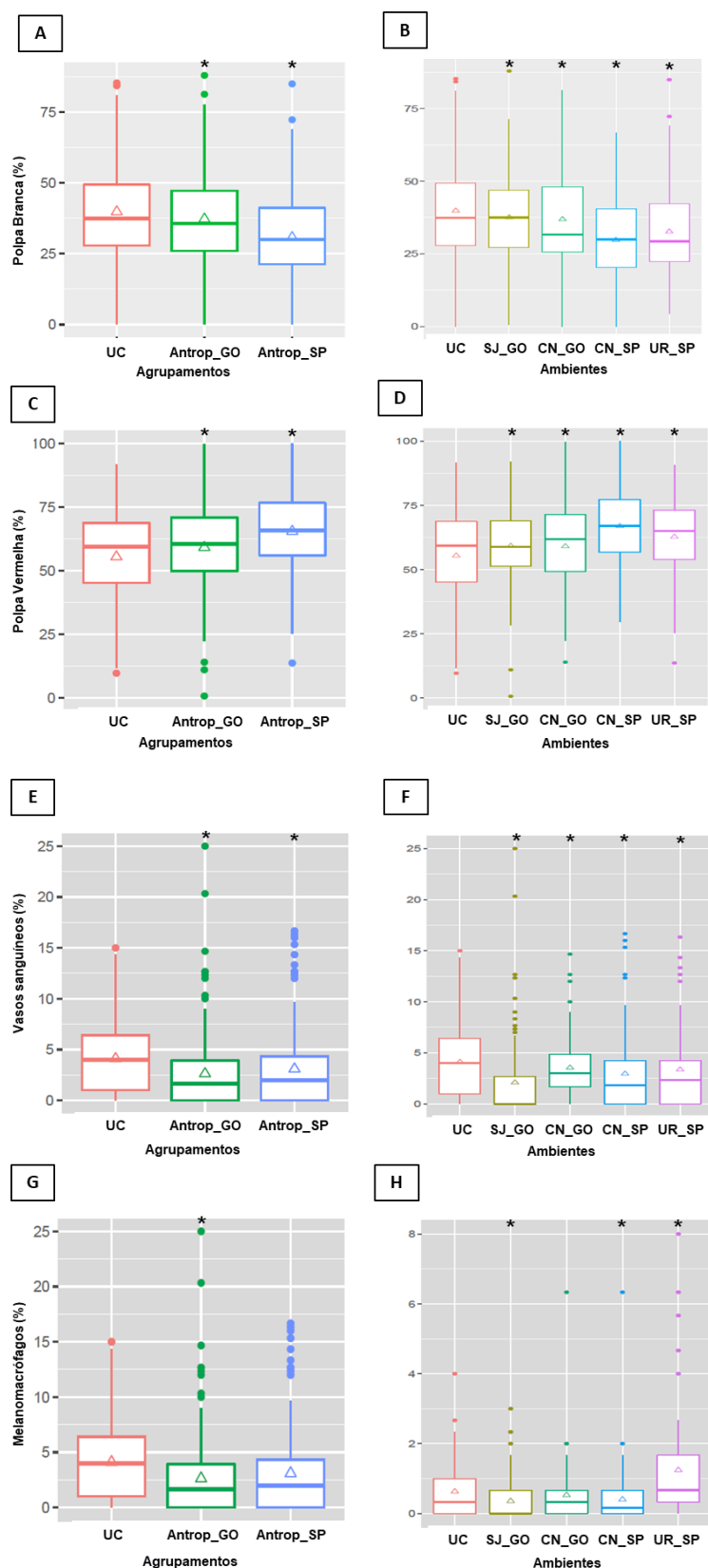


Figura 5: Composição estrutural do baço de *L. fuscus*: em **A,C,E** e **G**, o percentual de cada componente considerando a análise agrupada; em **B,D,F**,e **H** os percentuais considerando os cenários amostrados de maneira individualizada. **MMc** - Melanomacrófagos. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

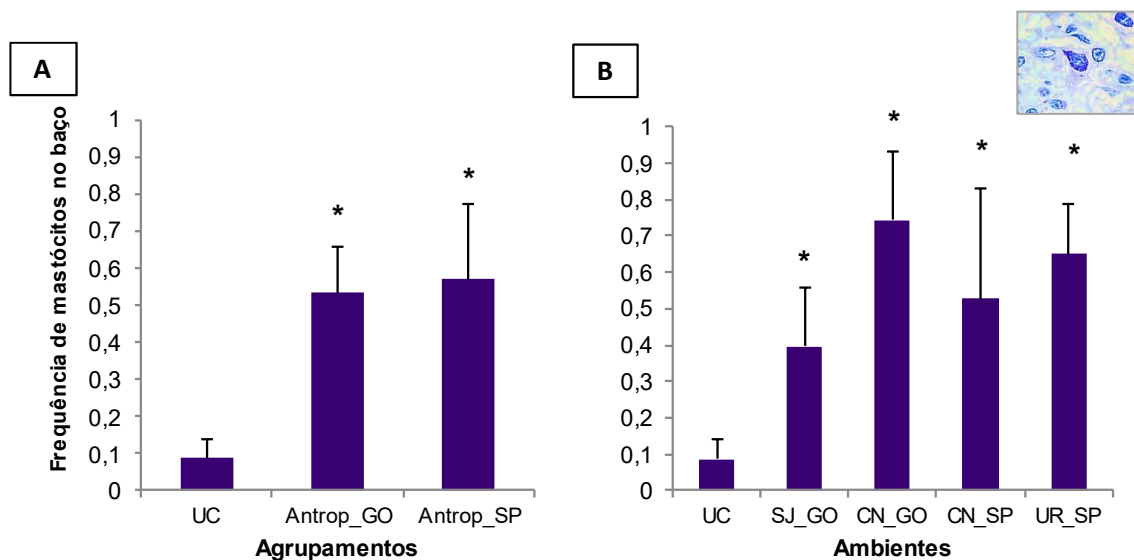


Figura 6: Frequência de mastócito no baço de *L. fuscus*: em **A**, médias considerando a análise agrupada; em **B**, a frequência para os cenários amostrados de maneira individualizada. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade de conservação ($p < 0.05$), os dados apresentados em média $\pm$ SE.

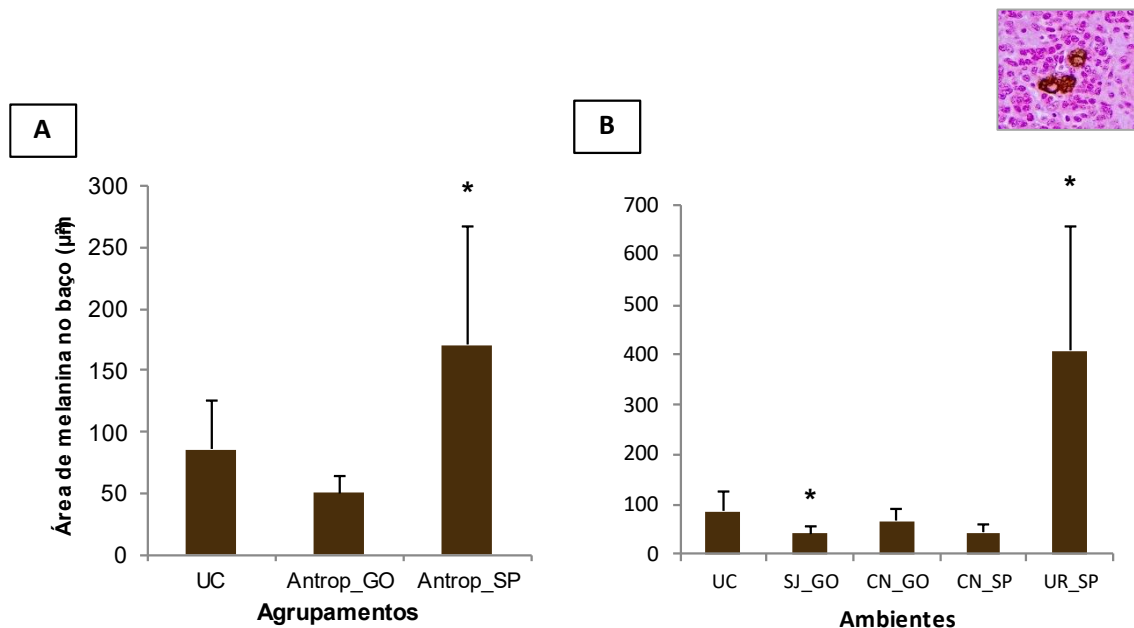
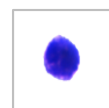
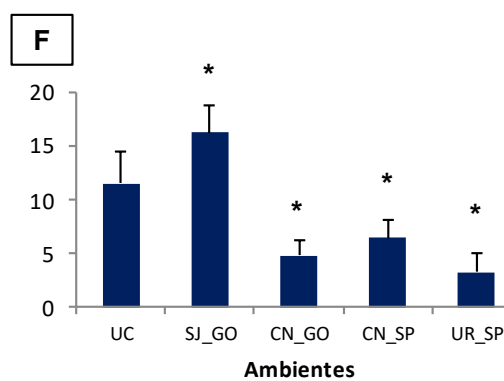
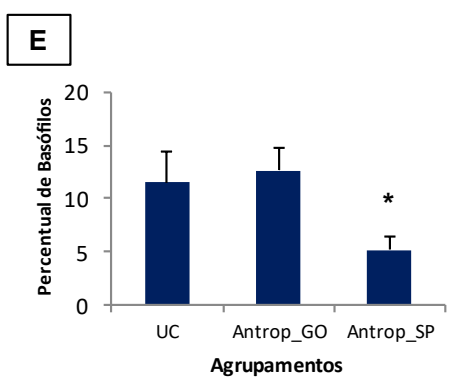
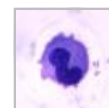
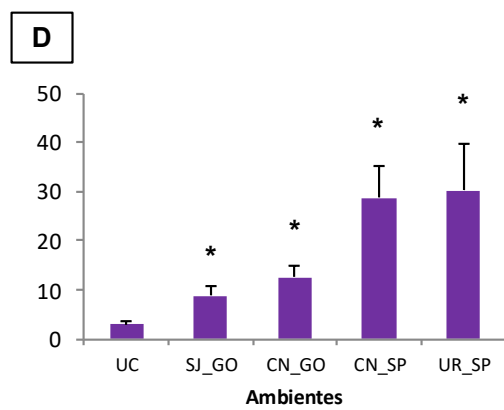
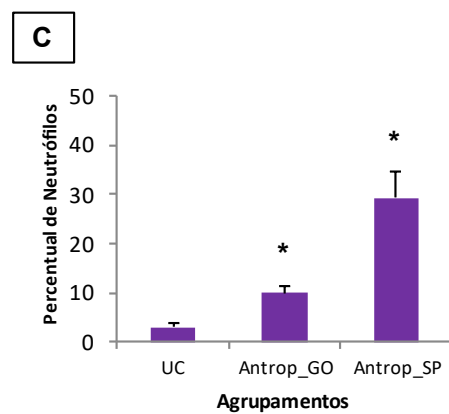
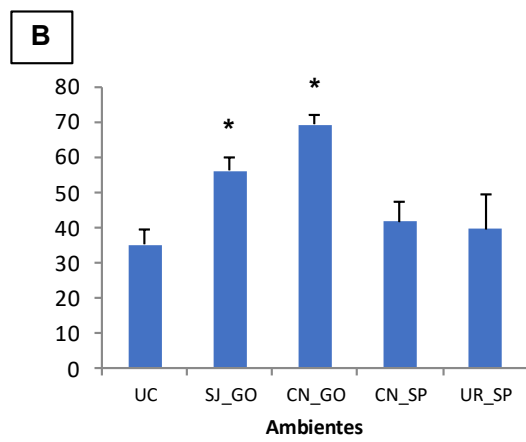
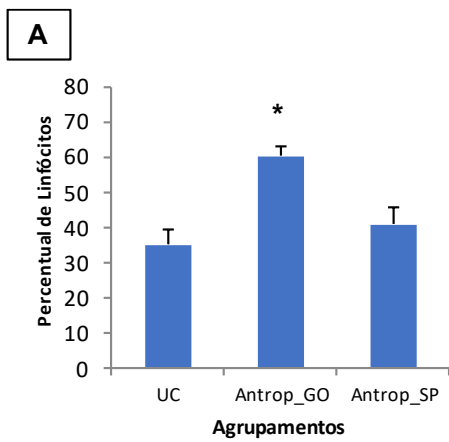


Figura 7: Área de melanina no baço de *L. fuscus*: em **A**, as médias considerando a análise agrupada; em **B**, os valores encontrados nos cenários amostrados de maneira individualizada. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade de conservação ($p < 0.05$), os dados apresentados em média $\pm$ SE.



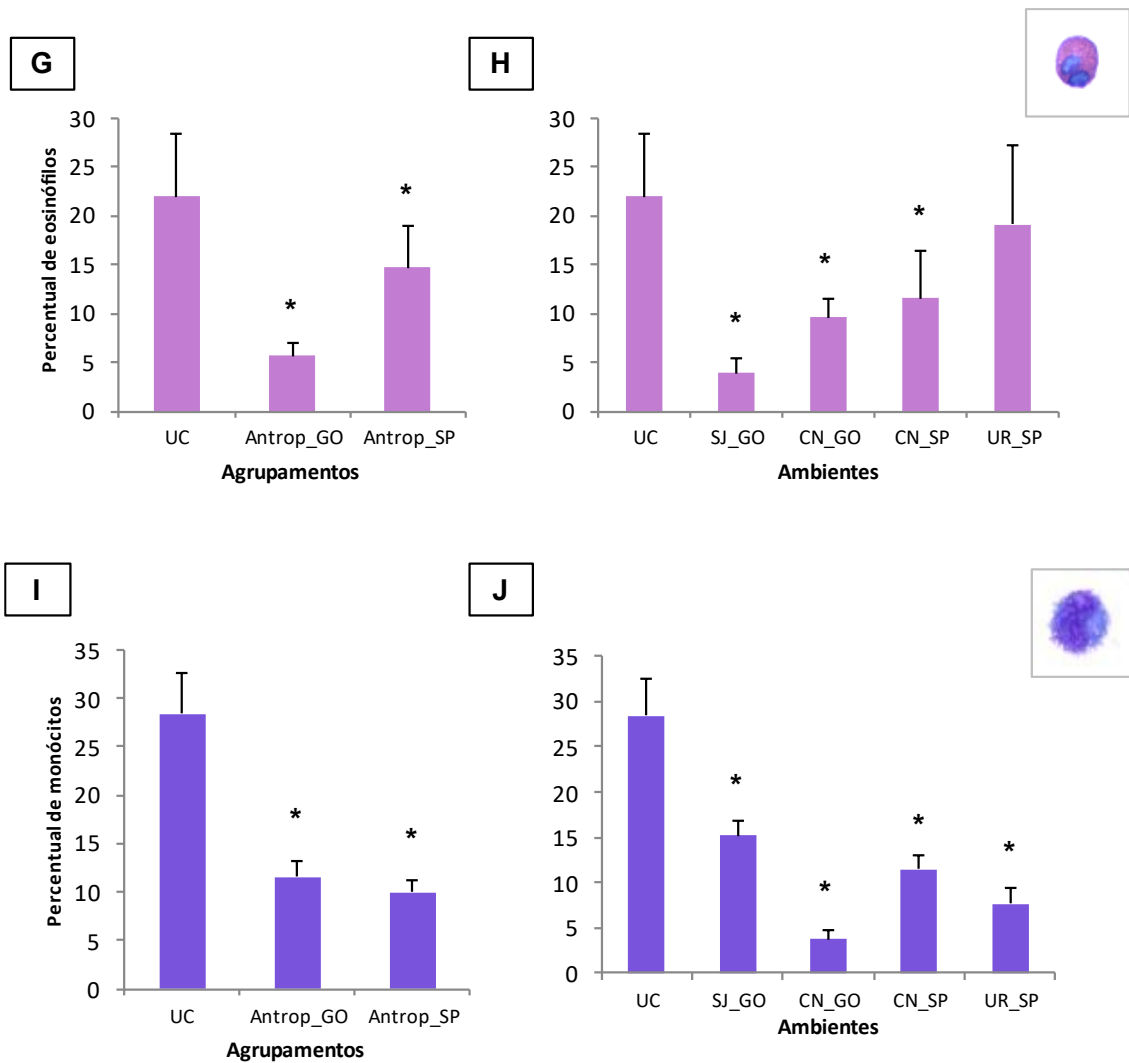


Figura 8: Percentual de leucócitos de *L. fuscus*: as letras **A**, **C**, **E**, **G** e **I** representam os dados tratados de forma agrupada, já em **B**, **D**, **F**, **H** e **J** os dados estão representados de maneira separada. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade de conservação ($p < 0.05$). Os dados apresentados em média $\pm$ SE.

TABELAS

Tabela 1: Proporções detalhadas dos tipos de uso de solo encontrados nos pontos amostrados num raio de 2km.

Ambientes	Tipos de matriz	%
UC	Pastagem natural	0,3
	Campo	99,7
SOJA_GO	Formação de Floresta	8,5
	Formação de savana	0,4
	Pastagem	0,2
	Plantação de soja	90,9
CANA_GO	Formação de Floresta	14,2
	Formação de savana	9,8
	Campo	13,1
	Pastagem	16,3
	Plantação de cana-de-açúcar	40,8
	Plantação de soja	1,8
	Outras plantações temporárias	4,0
CANA_SP	Formação de Floresta	1,2
	Zona úmida	1,3
	Plantação de cana-de-açúcar	61,6
	Mosaico de agricultura e pastagem	3,6
	Outras plantações temporárias	3,6
	Citrus	28,8
URBANO_SP	Formação de floresta	0,7
	pastagem	22,2
	Plantação de cana-de-açúcar	10,5
	Mosaico de agricultura e pastagem	15,1
	Infraestrutura Urbana	51,5

Tabela 2: Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. **nq** – não quantificado; **LQ/Faixa** - limite de quantificação; **UC** – unidade de conservação.

Parâmetros	Unidade	LQ/Faixa	CONAMA 357	Resultados				
				UC	Cana - GO	Soja - GO	Cana - SP	Urbano - SP
1 Coliformes Totais	NMP/100mL	10	--	nq	nq	nq	nq	> 24200
2 Coliformes Termotolerantes	NMP/100mL	10	1000	nq	nq	nq	nq	1722
3 Alumínio Dissolvido	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0986
4 Antimônio	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
5 Arsênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
6 Bário	mg/L	0,001	0,7	nq	nq	nq	nq	0,0113
7 Berílio	mg/L	0,001	0,04	nq	nq	nq	nq	< 0,001
8 Boro	mg/L	0,001	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
9 Cádmio	mg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0,001
10 Chumbo	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
11 Cianeto Livre	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
12 Cloreto	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	1,83
13 Cloro Residual Total	mg/L	0,01	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,01
14 Cobalto	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,001
15 Cobre Dissolvido	mg/L	0,001	0,009	nq	nq	nq	nq	0,0031
16 Cromo	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	0,0014
17 Ferro Dissolvido	mg/L	0,001	0,3	nq	nq	nq	nq	0,103
18 Fluoreto	mg/L	0,05	1,4	nq	nq	nq	nq	0,12
19 Fósforo Total	mg/L	0,01	Obs (2)	nq	nq	nq	nq	0,0585
20 Lítio	mg/L	0,001	2,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
21 Manganês	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0055
22 Mercúrio	mg/L	0,0001	0,0002	nq	nq	nq	nq	< 0,0001
23 Níquel	mg/L	0,001	0,025	nq	nq	nq	nq	< 0,001
24 Nitrato	mg/L	0,5	10	nq	nq	nq	nq	< 0,5
25 Nitrito	mg/L	0,02	1	nq	nq	nq	nq	< 0,02
26 Nitrogênio Amoniacal	mg/L	0,1	Obs (1)	nq	nq	nq	nq	< 0,1
27 Prata	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
28 Selênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
29 Sulfato	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	2,95
30 Sulfetos	mg/L	0,002	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0,002
31 Urânio	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0,001
32 Vanádio	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0021
33 Zinco	mg/L	0,001	0,18	nq	nq	nq	nq	0,0049
34 Acrilamida	µg/L	0,1	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,1
35 Alaclor	µg/L	0,005	20	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,005	< 0,005
36 Aldrin + Dieldrin	µg/L	0,002	0,005	< 0,02	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
37 Atrazina	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	0,0092	< 0,005
38 Benzeno	mg/L	0,0005	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,0005
39 Benzo(a)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
40 Benzo(a)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
41 Benzo(b)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
42 Benzo(k)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
43 Acenofileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
44 Fluoreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
45 Antraceno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
46 Benzo(g,h,i)perileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
47 Fenantreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
48 Pireno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
49 Acenafeno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
50 Carbaril	µg/L	0,005	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,005	< 0,005
51 Clordano (cis e trans)	µg/L	0,002	0,04	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,002	< 0,002
52 2-Clorofenol	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
53 Criseno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
54 2,4-D	µg/L	0,005	4	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,005	< 0,005
55 Dibenzo(a,h)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
56 2,4-Diclorofenol	µg/L	0,005	0,3	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
57 Dodecacloropentaciclodecano	µg/L	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
58 Endrin	µg/L	0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
59 Gution	µg/L	0,004	0,005	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
60 Indeno(1,2,3,cd)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,005
61 Lindano (g-HCH)	µg/L	0,001	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	nq	< 0,001
62 Malation	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
63 Metolacoloro	µg/L	0,005	10	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,17	< 0,005

64	Metoxicloro	µg/L	0,001	0,03	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
65	Paration	µg/L	0,005	0,04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.005	< 0.005
66	Pentaclorofenol	mg/L	0,000005	0,009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.000005	< 0.000005
67	Simazina	µg/L	0,005	2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.005	< 0.005
68	2,4,5-T	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
69	2,4,5-TP	µg/L	0,005	10	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
70	2,4,6-Triclorofenol	mg/L	0,000003	0,01	nq	nq	nq	< 0.000003	< 0.000003
71	Trifluralina	µg/L	0,005	0,2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.005	< 0.005
72	Demeton (-O e -S)	µg/L	0,01	0,1	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.01	< 0.01
73	Heptacloro e Heptacloro Epóxido	µg/L	0,002	0,01	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.002	< 0.002
74	o,p'-DDT	µg/L	0,001	0,002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	nq	nq
75	o,p'-DDT + o,p'-DDD + o,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	< 0.003	< 0.003	< 0.003	nq	nq
76	p,p'-DDT + p,p'-DDD + p,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.003
77	Endossulfan (a, b e sulfato)	µg/L	0,003	0,056	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.003	< 0.003
78	PCB's	µg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0.001
79	PCB 8	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
80	PCB 28	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
81	PCB 37	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
82	PCB 44	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
83	PCB 49	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
84	PCB 52	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
85	PCB 60	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
86	PCB 66	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
87	PCB 70	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
88	PCB 74	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
89	PCB 77	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
90	PCB 82	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
91	PCB 87	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
92	PCB 99	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
93	PCB 101	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
94	PCB 105	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
95	PCB 114	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
96	PCB 118	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
97	PCB 126 + 166	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
98	PCB 128 + 167	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
99	PCB 138 + 158	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
100	PCB 153	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
101	PCB 156	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
102	PCB 169	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
103	PCB 170	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
104	PCB 179	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
105	PCB 180	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
106	PCB 183	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
107	Hexaclorobenzeno	µg/L	0,005	0,0065	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005
108	Tributilestanho	µg/L	0,005	0,063	nq	nq	nq	< 0.005	< 0.005
109	Benzidina	µg/L	0,0001	0,001	nq	nq	nq	< 0.0001	< 0.0001
110	1,2-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00045	< 0.00045	< 0.00045	< 0.001	< 0.001
111	1,1-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001
112	Diclorometano	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
113	Estireno	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
114	Etilbenzeno	µg/L	1	90	nq	nq	nq	nq	< 1
115	Índice de Fenóis	mg/L	0,001	0,003	nq	nq	nq	nq	0,001
116	Glifosato	µg/L	5	65	< 55	< 55	< 55	nq	< 5
117	Surfactantes (como o LAS)	mg/L	0,2	0,5	nq	nq	nq	nq	0,21
118	Tetracloroeto de Carbono	mg/L	0,0005	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0.0005
119	Tetracloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00031	< 0.00031	< 0.00031	nq	< 0.001
120	Tolueno	µg/L	1	2	nq	nq	nq	nq	< 1
121	Toxafeno	µg/L	0,01	0,01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	nq	< 0.01
122	Triclorobenzenos	mg/L	0,003	0,02	< 0.00043	< 0.00043	< 0.00043	nq	< 0.003
123	Tricloroetano	mg/L	0,0005	0,03	< 0.002	< 0.002	< 0.002	nq	< 0.0005
124	Xilenos	µg/L	3	300	nq	nq	nq	nq	< 3
125	pH (a 25°C)	---	2 - 13	6 - 9	nq	nq	nq	nq	6,79
126	Sólidos Dissolvidos Totais	mg/L	5	500	nq	nq	nq	nq	20

Obs (1): VMP em função do pH: 3,7mg/L para pH ≤ 7,5; 2,0mg/L para 7,5 < pH < 8,0; 1,0mg/L para 8,0 < pH < 8,5; 0,5mg/L para pH > 8,5.

Obs (2): VMP Ambiente Léntico: 0,030 mg/L. / VMP Ambiente Intermediário: 0,050 mg/L. / VMP Ambiente Lótico: 0,100 mg/L

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de *L. fuscus*.

Ambientes	Data (M/A)	Temperatura (°C)	pH	O ² Dissolvido (%)	Condutividade (µS)	Resistividade	Salinidade (psu)	Sólidos totais dissolvidos (ppm)
UC	dez/18	23,20	7,41	101,90	2,56	3,20	0,01	1,40
SOJA_GO	nov/18	35,70	5,38	76,10	3,70	24,80	1,31	20,00
CANA_GO	fev/19	28,90	7,74	90,50	52,60	19,20	0,03	26,00
CANA_SP	fev/20	27,00	8,84	60,00	47,60	—	0,02	—
URBANO_SP	jan/20	30,80	9,37	62,00	49,20	—	0,03	—

Tabela 4: Média dos valores encontrados nos parâmetros biométricos. **CRC** – Comprimento rostro-cloacal; **ISS** – Índice esplenossomático; **IME** – índice de massa escalonar. Média $\pm$ SE.

Agrupamentos	Parâmetros biométricos				
	Peso Total (g)	CRC (mm)	IME	Peso Baço (g)	ISS (%)
	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE
Unidade de Conservação	9,3 $\pm$ 0,3	50,4 $\pm$ 2,0	7,8 $\pm$ 0,4	0,003 $\pm$ 0,001	0,028 $\pm$ 0,008
Antropizado_GO	8,6 $\pm$ 0,4	43,5 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 0,3	0,004 $\pm$ 0,001	0,053 $\pm$ 0,010
Antropizado_SP	9,4 $\pm$ 0,4	44,7 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,2	0,004 $\pm$ 0,000	0,046 $\pm$ 0,003
Ambientes					
Unidade de Conservação	9,4 $\pm$ 0,3	50,4 $\pm$ 2,0	7,8 $\pm$ 0,4	0,003 $\pm$ 0,001	0,028 $\pm$ 0,008
Soja_GO	9,6 $\pm$ 0,3	45,0 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 0,2	0,003 $\pm$ 0,000	0,028 $\pm$ 0,003
Cana_GO	6,7 $\pm$ 0,3	41,0 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 0,3	0,007 $\pm$ 0,001	0,094 $\pm$ 0,020
Cana_SP	9,4 $\pm$ 0,5	44,4 $\pm$ 0,7	9,7 $\pm$ 0,3	0,004 $\pm$ 0,001	0,045 $\pm$ 0,005
Urbano_SP	9,5 $\pm$ 0,4	45,2 $\pm$ 0,6	9,5 $\pm$ 0,2	0,005 $\pm$ 0,001	0,047 $\pm$ 0,005

Tabela 5: Valores estatísticos encontrados nos parâmetros biométricos, considerando como significativo p<0.05. **CRC** – Comprimento rostro-cloacal; **ISS** – Índice esplenossomático; **IME** – índice de massa escalonar **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

Parâmetros biométricos												
Agrupamentos	Peso				CRC				ISS			
	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	UR_SP	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	UR_SP	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	UR_SP
Unidade de Conservação	=0.2		=0.2		<0.0001		<0.0006		=0.1		=0.1	=0.0003
Antrop_GO X Antrop_SP			= 0.2				=0.5		=0.1			=0.5
Ambientes	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP
UC	=0.9	=0.001	=1.0	=0.9	=0.006	<0.0001	=0.001	=0.003	=1.0	<0.0001	=0.9	=0.009
SJ_GO		= 0.0001	=0.9	=0.9		=0.1	=0.9	=0.9		<0.0001	=0.9	=0.9
CN_GO			=0.0005	=0.002			=0.2	=0.1		<0.0001	<0.0001	=0.1
CN_SP			=0.9					=0.9			=1.0	=0.9

Tabela 6: Média dos valores encontrados para os componentes estruturais do baço. Média $\pm$ SE.

Agrupamentos	Densidade estrutural volumétrica esplenica			
	Polpa branca	Polpa vermelha	Vasos sanguíneos	Melanomacrófagos
	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE
Unidade de Conservação	119,5 $\pm$ 19,3	166,3 $\pm$ 19,5	12,3 $\pm$ 3,7	1,9 $\pm$ 0,8
Antropizado_GO	112,5 $\pm$ 11,3	178,3 $\pm$ 11,3	7,9 $\pm$ 2,5	1,3 $\pm$ 0,5
Antropizado_SP	92,3 $\pm$ 10,4	196,4 $\pm$ 10,3	9,3 $\pm$ 2,5	2,1 $\pm$ 0,8
Ambientes				
Unidade de Conservação	119,5 $\pm$ 19,3	166,3 $\pm$ 19,5	12,3 $\pm$ 3,7	1,9 $\pm$ 0,8
Soja_GO	113,6 $\pm$ 13,0	177,0 $\pm$ 13,0	6,3 $\pm$ 3,3	1,7 $\pm$ 0,5
Cana_GO	110,6 $\pm$ 21,2	177,8 $\pm$ 21,1	10,6 $\pm$ 3,6	1,6 $\pm$ 1,0
Cana_SP	89,2 $\pm$ 12,6	200,8 $\pm$ 12,7	8,9 $\pm$ 3,0	1,2 $\pm$ 0,6
Urbano_SP	97,9 $\pm$ 18,2	188,3 $\pm$ 17,4	10,1 $\pm$ 4,4	3,7 $\pm$ 1,7

Tabela 7: Valores estatísticos encontrados os componentes estruturais do baço, considerando como significativo p<0.05. **UC-** Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

Agrupamentos	Densidade estrutural volumétrica esplenica											
	Polpa Branca			Polpa Vermelha			Vasos Sanguíneos			Melanomacrófagos		
	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP	Antrop_GO	CN_GO	Antrop_SP
Unidade de Conservação	<0.0001		<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001		<0.0001	=0.003		=0.54
Antrop_GO X Antrop_SP	< 0.0001			<0.0001			<0.0001			<0.0001		
Ambientes	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP
UC	<0.0001	=0.0002	<0.0001	<0.0001	=0.0005	<0.0001	<0.0001	=0.02	<0.0001	<0.0001	=0.6	<0.0001
SJ_GO		<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001
CN_GO			<0.0001			=0.001			=0.001		=0.1	<0.0001
CN_SP						=0.06			=0.06			<0.0001

Tabela 8: Valores estatísticos encontrados os componentes estruturais do baço, considerando como significativo $p < 0.05$. **UC-** Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

Perfil leucocitário														
Agrupamentos	Linfócitos			Neutrófilos			Basófilos			Eosinófilos			Monócitos	
	Antrop_GO	Antrop_SP		Antrop_GO	Antrop_SP		Antrop_GO	Antrop_SP		Antrop_GO	Antrop_SP		Antrop_GO	Antrop_SP
Unidade de Conservação	< 0.0001	= 0.11		< 0.0001	< 0.0001		= 0.7	< 0.0001		< 0.0001	= 0.0002		< 0.0001	< 0.0001
Antrop_GO X Antrop_SP	< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001			= 0.1	
Ambientes	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	SJ_GO	UR_SP
UC	< 0.0001	< 0.0001	= 0.7	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0002	= 0.0001	= 0.0002	< 0.0001	< 0.0001	< 0.7	< 0.0001	< 0.0001
SJ_GO	= 0.02	= 0.0005	= 0.0003		= 0.08		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0002
CN_GO		< 0.0001	< 0.0001			< 0.0001		= 0.6	= 0.6		= 0.7	= 0.0001	< 0.0001	= 0.02
CN_SP			= 0.9						= 0.04			= 0.002		= 0.1

CAPÍTULO 2

Capítulo 2

Morfometria testicular como atributo fenotípico para avaliação de antropização ambiental

RESUMO

As alterações exercidas nos ambientes naturais pela agropecuária e urbanização exercem uma forte pressão nas comunidades de anuros, não só pela fragmentação e alterações das paisagens, mas também devido a inúmeros resíduos químicos produzidos, que apresentam potencial de desregular e interferir em processos importantes, como a reprodução. Nesse contexto, nosso trabalho teve como objetivo investigar os efeitos de cenários antrópicos (áreas agrícolas e urbanizada) em caracteres morfométricos do testículo de *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae), quando comparados a habitat natural. Foram coletados indivíduos machos adultos (n = 49) em ambientes com paisagens distintas quanto a alteração antrópica sendo eles: plantação de soja, cana, ambiente urbano, e como controle uma unidade de conservação. Desses animais, foram quantificados os parâmetros testiculares: área locular e dos cistos espermátogênicos (espermátogônias, espermátócitos, espermátides e espermatozoides). De maneira agrupada, os animais nativos de ambientes antrópicos apresentaram uma tendência de aumento dos cistos germinativos, já de modo individual, cada ambiente exerceu pressões diferentes, alterando as proporções dos cistos de maneiras distintas. O aumento evidenciado de modo geral, pode ser associado a uma resposta compensatória de espécies generalistas, garantindo a reprodução mesmo em condições desfavoráveis, e também evidencia que antropização atua de modo diferente, gerando respostas adaptativas a cada cenário.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os anuros têm vivenciado um fenômeno de declínio mundial, fato que vem sendo percebido em diferentes escalas e em grande parte, associada às pressões antrópicas (Wake e Rodenburg, 2008; Hayes et al., 2010a; Catenazzi, 2015; Campbell Grant et al., 2020). As constantes mudanças ambientais produzidas pelo homem, em sua crescente expansão populacional, demanda de muitos recursos para suprir suas necessidades, seja na produção alimentar ou processos de urbanização e industrializações (DeFries et al., 2004; Grimm et al., 2008; Foley et al., 2005). Como consequência, as comunidades animais sofrem com intensas reduções de habitats, aumento de radiação UV, mudanças climáticas e inúmeros poluentes químicos (Hayes et al., 2010a; Hussain e Pandit, 2012; Li et al., 2013; Catenazzi, 2015; Cordier et al., 2021), onde os prejuízos ecológicos destes compostos persistem por muito tempo após sua liberação no meio ambiente (Karlsson et al., 2021).

Há alguns outros fatores estressantes em ambientes alterados a serem considerados, por exemplo, a exposição à luz artificial noturna, como as provenientes dos grandes centros urbanos, pode gerar interrupções em comportamentos reprodutivos de anuros (Wise, 2003; Touzot, et al., 2020; Smit et al, 2022) reduzindo a fertilidade desses animais (Touzot et al., 2020), de forma que a exposição a luz continua causa até mesmo a supressão da espermatogênese (Biswas et al., 1978). Há também os efeitos da poluição sonora, podendo interferir na atividade de vocalização utilizada por esses animais para a reprodução (Tennesen et al., 2014; Simmons e Narins, 2018; Smit et al., 2022). Quando se atenta para as atividades agrícolas, a aplicação de agrotóxicos costuma acontecer juntamente a estação reprodutiva de muitos anuros (Orton et al., 2018; Trudeau et al., 2020), e muitos desses compostos atuam como desreguladores endócrinos (Eds), principalmente com efeitos antiandrogênicos, interferindo nas vias hormonais estrogênicas, que coordenam a reprodução (Kloas e Lutz, 2006; Mann et al., 2009; Orton e Tyler, 2015; Trudeau et al., 2020).

O ciclo de vida dos anuros apresenta vários pontos susceptíveis a exposição a contaminações ambientais. Para a maioria dos anfíbios a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorrem em meio aquático e sem

proteção externa (Hamlin e Guillette Jr, 2010; Yang et al., 2021). Após a eclosão, a pele altamente permeável, pode facilitar a entrada de químicos prejudicando o desenvolvimento somático e gonadal por interferência em vias hormonais reguladoras (Tamschick et al., 2016a). Outro período crítico do desenvolvimento é a metamorfose, processo dependente de hormônios tireoidianos, cujos receptores são frequentemente alterados por poluentes (Trudeau et al., 2020).

O efeito das atividades antrópicas e os poluentes ambientais na biologia reprodutiva de anuros é bastante complexa, dado as inúmeras interações de diversas variáveis, já sendo documentado efeitos em diferentes pontos do processo reprodutivo, desde efeitos no comportamento (interferência nas vocalizações e nos amplexos) (e.g. Hoffmann e Kloas, 2010; 2016; Schwendiman e Propper, 2012; Huang et al., 2015); caracteres sexuais secundários (alterações no calo nupcial, tamanho da laringe) (e.g. McCoy et al., 2008; Orton et al., 2018; Zlotnik et al., 2019); alterações nos órgãos reprodutivos, enfaticamente nos testículos (má formações, histopatologias, alterações nas estruturas seminíferas, no tecido germinativo, alta incidência de ovócitos testiculares) (e.g. McDaniel et al., 2008; McCoy et al. 2008; Çakıcı, 2013, 2015; Moresco et al., 2014; Rojas-Hucks et al., 2019; Rezende et al., 2021; Sluchyk et al., 2021); níveis hormonais alterados (e.g. Poulsen et al., 2015; Campbell et al., 2018; Rojas-Hucks et al., 2019); e até mesmo efeitos na expressão de genes reguladores de processos reprodutivos (e.g. Poulsen et al., 2015; Campbell et al. 2018). Sabe-se também que a exposição a EDs durante esses períodos críticos, podem interromper a diferenciação produzindo reversão sexual e gônadas intersexuais (Mackenzie et al., 2003; Hayes et al., 2010b; Tamschick et al., 2016b; Trudeau et al., 2020).

Desta maneira, os poluentes ambientais, podem gerar falhas reprodutivas em certas doses, sem apresentar aparentes prejuízos à saúde dos animais (Hayes et al., 2010a). Considerando que com o passar do tempo há mais compostos xenobióticos com potencial tóxico para a reprodução, uma maneira de se monitorar esses efeitos deletérios seriam através de biomarcadores representativos (Sluchyk et al., 2021), assim, a quantificação da capacidade reprodutiva garante uma maior precisão das influências desses fatores ambientais (Montezol et al., 2018). Tendo isso em vista, esse estudo

investigou os efeitos de diferentes cenários de antropização (áreas agrícolas, área urbanizada e unidade de conservação) na morfometria testicular de *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécie estudada

A espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Leptodactylidae) apresenta ampla distribuição na América do Sul, categorizada como “pouco preocupante” quanto a conservação (IUCN, 2022). Devido a sua ocorrência em varios ambientes, desde campos abertos, savanas, pastagens, áreas pantanosas, florestas degradadas e habitats urbanos (IUCN, 2022), pode ser considerado um organismo modelo nativo e em crescente uso em estudos ecotoxicológicos (Fanali et al. 2018; Freitas et al., 2019; Franco-Belussi et al. 2020; Ferrante e Fearnside, 2020; Assis et al., 2021).

2.2. Ambientes amostrados

Foram coletados machos adultos de *L. fuscus* (**n = 49**) em plena atividade de vocalização durante a estação chuvosa, em 5 ambientes com paisagens distintas quanto ao uso do solo, sendo elas: Unidade de Conservação (UC) (**n=10**), plantação de soja (SOJA_GO) (**n=15**), plantação de cana associado a usina (CANA_GO) (**n=7**), plantação de cana (CANA_SP) (**n=10**), e ambiente urbano (URBANO_SP) (**n=7**). Estes ambientes estão localizados no Brasil nos estados de São Paulo e Goiás (**Figura 1**), que são expressivos quanto à produção agrícola nacional, especificamente plantio de soja e cana-de-açúcar para a produção de biocombustível (IBGE, 2023; CONAB, 2022; IMB, 2022), além disso, o estado de São Paulo é o maior em extensão de áreas urbanizadas do país (IBGE, 2023).

No ambiente de soja (Rio Verde – GO; 17° 47.742' S, 051° 06.089' W) os animais foram amostrados no mês de dezembro de 2018 (**n=15**). As coletas foram realizadas em poças semi permanentes localizadas na área de plantio.

Representando outro tipo de ambiente agrícola, foram amostrados dois pontos com predominância de cana-de-açúcar: um com áreas plantadas associadas à usina sucroalcooleira (CANA_GO) (Paraúna – GO, 17°16'38.3"S

50°29'58.2"W) (**n=7**) e outro um plantio de cana usual – i.e. sem proximidade com usinas (CANA_SP) (São José do Rio Preto -SP, 20°31'57.3"S 49°14'24.1"W) (**n=10**). Os animais foram coletados nos anos de 2019 e 2020 respectivamente, em poças temporárias, imersas na área de plantação e em poças margeando a área de plantio.

O ponto de amostragem característico de uma área urbanizada se localiza no município de São José do Rio Preto (URBANO_SP). Os animais foram coletados no mês de janeiro do ano de 2020 (**n=7**), em poças temporárias associadas a canteiros de obras e valas de contenção fluvial.

O ambiente com a menor perturbação ambiental foi representado por uma unidade de conservação (UC), o Parque Nacional das Emas (Mineiros - GO, 18°06'59.4"S 52°55'01.4"W) (**n=10**). Com uma área 132.000 hectares, com predominância do bioma Cerrado, sendo diferentes fitofisionomias, mata ciliar, vereda, campo rupestre, campo úmido, cerradão, campo cerrado, campo sujo e campo limpo (ICMbio, 2023).

Destes pontos, foram obtidos os parâmetros climáticos médios (temperaturas máxima e mínima, precipitação e irradiação solar), obtidos do site da NASA Prediction of Worldwide Energy Resources (NASA POWER) (<https://power.larc.nasa.gov/#dataaccess>), e sumarizados na **Tabela 1**. Foram estimadas as porcentagens das matrizes de uso do solo em um raio de 2 km (**Figura 2**), utilizando o software QGIS (3.10). A UC apresenta composição majoritariamente de campo de vegetação nativa típico do cerrado (99,3%); em Soja_GO há a dominância da matriz de soja (90,9%); Cana_GO e Cana_SP com maior predominância de plantio de cana (40,8 %); e Urbano_SP com maior porcentagem de infraestrutura urbana (51,5%). As porcentagens com maior detalhamento estão sumarizadas na **Tabela 2**.

2.3. Análises de água

Em cada um dos cinco ambientes, foram coletadas uma amostra de água das proximidades onde os animais foram coletados, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e plásticos, de acordo com as instruções fornecidas pelos laboratórios particulares em Rio Verde-GO e São José do Rio Preto, as quais as foram encaminhadas.

Para a os ambientes agrícolas (SOJA_GO, CANA_GO e CANA_SP) foi quantificado pesticidas dos tipos carbamatos, organoclorados e organofosforados.

Dada a complexidade de ambientes urbanos e diferentes fontes de poluentes químicos, além de pesticidas carbamato, organoclorados e organofosforados, foi acrescido a análise outros compostos como metais pesados, bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), surfactantes (como LAS), EDTAs, bisfenol-A, devido sua ocorrência em resíduos de escoamentos urbanos no Brasil (Peña-Guzmán et al., 2019; Chaves et al., 2021), e por apresentarem efeitos desregulatórios descritos na literatura para os anuros. (Tijani et al., 2016; Da Silva et al., 2018)

As análises foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos nos *Standard Methods for the examination of the water and waste water - AWWA*, 23rd, 2017. Os parâmetros foram avaliados com base nos padrões definidos pela resolução CONAMA nº 357/2005 Classe II e portaria 1.745/1979. Todos os compostos e os valores encontrados para cada ambientes, estão em maior detalhe na **Tabela 3**.

Foi também mensurado os parametros físico-químicos, utilizando aparelho multiparâmetro portátil Bante 900p e Akaso Ak88, sendo mensurado a temperatura da água, pH, condutividade, salinidade e O₂ dissolvido (**Tabela 4**).

2.4. Licenças e procedimentos éticos

As licenças foram obtidas junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob protocolo 62687-1 e 18573-2; e Comitê de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP- S. J. Rio Preto sob o protocolo nº 191/2018.

2.5 Parâmetros biométricos

Os animais foram transportados para o Laboratório de Biologia Animal no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO e Laboratório de Anatomia Comparada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto – SP), onde foram obtidas as medidas biométricas, como o peso total (g), utilizando de balança analítica (precisão 0,0001g); e aferido o comprimento rostro-cloacal (mm) com paquímetro digital (precisão de 0,01mm).

Em seguida, os animais foram eutanasiados em anestésico (Benzocaína 5g/L) e tiveram a cavidade abdominal exposta, através de incisão ventral, seguido da extração dos testículos, que foram pesados para o posterior cálculo do índice gonadossomático, através da formula geral:

$$\text{IGS} = (\text{massa do órgão (g)} \div \text{massa do indivíduo (g)}) \times 100$$

Posteriormente, o órgão foi fixado em solução de Metacarn (60% álcool metílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, sendo então, encaminhado para desidratação alcoólica gradual e inclusão em historesina metacrilato glicol (Historesin Leica®).

2.6 Morfometria testicular

Para as análises dos caracteres germinativos, foram retiradas de cada animal 20 secções histológicas transversais de 2µm de um dos testículos, com aproximadamente 10 µm de distanciamentos entre os cortes. Em seguida, foram corados em H-E, e fotomicrografados em microscópio de luz (Leica® Modelo DM4-B), e então aleatorizados 25 campos histológicos, e para cada indivíduo foram analisados 100 lóculos seminíferos inteiros. Destes lóculos, foram considerados os parâmetros: área locular e área dos cistos espermatogênicos. As medidas foram obtidas pelo contorno destes, sendo categorizados de acordo com Santos e Oliveira (2008) em: espermatogônias (primárias e secundárias); espermatócitos (primários e secundários); espermátides (redondas e alongadas) e espermatozoides (feixes e livres no lúmen). Essas medidas foram obtidas através da circunscrição das unidades seminíferas e cistos germinativos, utilizando a ferramenta de criação de polígono, no software Image Pró-Plus (Media-Cybernetics Inc, versão 6.0).

2.7 Análises estatísticas

Para estimar o efeito de diferentes cenários antropizados nos parâmetros reprodutivos testiculares e biométricos (área locular e área dos cistos espermatogênicos; peso; CRC e IGS), os dados foram processados da seguinte maneira: inicialmente foi determinados três agrupamentos principais, onde se agregou os animais dos cenários no estado de Goiás (Soja_GO; Cana_GO), **Antropizado_GO**; os pertencentes aos ambientes no estado de

São Paulo (Cana_SP; Urbano_SP), **Antropizado_SP**; e a **Unidade de conservação**, considerado como o ambiente de referência com menor interferência antrópica. Essa definição de agrupamentos foi determinada devido à distância geográfica entre os pontos amostrados, e as possíveis interferências que essas condições poderiam impor sobre os dados.

Foi então usado um Modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial para comparação do efeito dos ambientes antropizados (variável preditora categórica) nos parâmetros morfométricos testiculares (área locular e cistos espermátogênicos) (variáveis respostas contínuas).

Quanto aos dados biométricos (peso total, CRC, IGS), foi utilizado um modelo linear *lm* e os pressupostos do modelo foram testados usando *plots* diagnósticos do pacote *sjplot*. Os resíduos tiveram homogeneidade de variância e distribuição normal.

Houve também a comparação em pares, com os cenários tratados separadamente (UC; Soja_GO; Cana_GO; Cana_SP; Urbano_SP), visando caracterizar o efeito dos ambientes em cada parâmetro. Sendo então aplicados os mesmos modelos (modelo linear *lm* para os parâmetros biométricos, e GLM para os parâmetros morfométricos testiculares).

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros biométricos

Os indivíduos de *L. fuscus* totais amostrados apresentaram em média o peso total de $9,05 \pm 0,21$ g, com CRC de $45,40 \pm 0,62$ mm. Quanto aos testículos, estes são constituídos por órgãos pares, de cor branco-leitosa, com um peso médio de $0,03 \pm 0,01$ g.

Em caráter comparativo, houve diferença significativa apenas para o peso CRC entre os agrupamentos antrópicos e a UC, de forma que os animais de ambientes alterados exibiram menores médias (**Tabela 5 e 6**). Na comparação dos ambientes individualizados, apenas Cana_RV apresentou diferença para o peso e IGS, já para o CRC todos os ambientes diferiram da UC (**Tabela 6**).

3.2 Morfometria testicular

Morfologicamente os testículos de *L. fuscus*, apresentam uma arquitetura comum aos anuros, onde há unidades seminíferas arredondadas, os lóculos, e neles se alocam o tecido germinativo, dispostos em cistos, onde cada tipo celular se encontra retido por projeções das células de Sertoli (**Figura 3**).

Na amostra total dos indivíduos, os lóculos seminíferos apresentaram uma área média de $23167,8 \pm 1678,7\mu\text{m}^2$, e foi encontrado todos os tipos celulares da linhagem espermatogênica, com maior abundância para os cistos de espermatogônias (20%) e espermatócitos (57%), e menores proporções para espermatídes (5%) e espermatozoides (18%).

Na comparação morfométrica dos parâmetros testiculares, houve diferença significativa para a área locular entre os agrupamentos e o ambiente controle (**Tabela 5 e Figura 4-A**), de maneira que os animais viventes em ambientes antropizados mostraram maiores médias (**Tabela 7**). Na comparação individualizada entre os diferentes ambientes, Soja_GO e Cana_SP, exibiram maiores valores (**Tabela 4 e 5 e Figura 4-B**).

Com relação aos cistos espermatogênicos, espermatogônias (Sg) e espermatócitos (Sc) foram os tipos mais expressivos, independentemente de ambientes, porém as maiores médias foram encontradas nos ambientes com pressão antrópica (Sg em Antrop_GO e Sc em Antrop_SP) (**Tabela 7 e 8 e Figura 4- C, E**). As espermatídes e espermatozoides, também tiveram valores médios maiores nos agrupamentos antrópicos, em comparação a unidade de conservação.

Dos tipos de cenários amostrados, o ambiente Cana_GO, destoia dos padrões encontrados nos outros, em suma, os animais apresentaram menores médias da área locular e dos cistos em estágio inicial da espermatogênese (Sg e Sc) e um aumento relativo das células em estágio final (Sm e Sz) (**Figura 4**).

Já o ambiente de Soja_GO também exibe um padrão peculiar, onde a área locular e dos cistos iniciais se mostram maiores, já os cistos em estágio final evidência certa baixa.

No ambiente Urbano_SP e Cana_SP houve uma tendência geral de aumento nos parâmetros analisados.

4. DISCUSSÃO

4.1 Dados biométricos

Em anuros, o dimorfismo em relação ao tamanho corpóreo é uma característica bem estabelecida, podendo ser até um indicador de fertilidade nesses animais (Fan et al., 2013; Ding et al., 2019), e para os anuros a maioria das espécies (cerca de 90%) as fêmeas apresentam maior tamanho que os machos (Ding, et al., 2019). Tendo isso em vista, a diminuição do CRC nos animais provenientes de áreas antrópicas, já foi associada a ambientes alterados e poluentes ambientais por outros autores, mostrando que a exposição a herbicidas e a associação a ambientes com perturbação antrópica gera uma diminuição do tamanho desses animais (Delgado-Acevedo e Restrepo, 2008; Karlsson et al., 2021). Contudo, ainda que haja essa relação entre o tamanho corpóreo e a fertilidade, esse atributo é mais representativo para as fêmeas, de forma que o tamanho corporal do macho não apresenta interferência direta na taxa de fecundidade para algumas espécies (Fan et al., 2013; Ding et al., 2019), dessa maneira, mesmo que os machos apresentem menores CRC, isso não influenciaria diretamente em seu sucesso reprodutivo.

As dimensões dos testículos em anuros são marcadores bastante efetivos do status reprodutivo, de forma que até o tempo de reprodução e o desenvolvimento podem ser previstos a partir de índices, como o gonadossomático (IGS) (Othman et al., 2011). Além disso, alguns padrões de comportamentos reprodutivos são estritamente ligados a caracteres morfométricos deste órgão. Por exemplo, anuros com comportamentos poliândricos tendem a ter testículos maiores, em função da ocorrência de competição espermática (Emerson, 1997; Prado e Haddad, 2003; Liao et al., 2011) e até mesmo modos reprodutivos diferentes, dentro da mesma família (Leptodactylidae), exercem influência no tamanho testicular (Prado e Haddad, 2003; Leite et al., 2015). Ainda que em não tenhamos detectado alterações no índice gonadossomático, existem outras formas para a produção espermatogênica independentemente do tamanho testicular, como alterações nas proporções do epitélio germinativo e morfologias diversas (Ramm e Schärer, 2014; Leite et al., 2015; Rezende et al., 2021).

4.2 Efeitos da antropização na morfometria testicular de *L.fuscus*

A morfologia testicular evidenciada para a espécie é similar ao já descrito para outros anuros, incluindo algumas do mesmo gênero (De Oliveira

et al., 2002; Pucci Alcaide et al., 2020; Bordin et al., 2022), sendo a arquitetura constituída por unidades seminíferas arredondadas, os lóculos, onde os tipos celulares se encontram retidos pelas células de Sertoli, formando cistos contendo um mesmo estágio de maturação (Rastogi et al., 1988; De Oliveira et al., 2002; 2003). A disposição destes cistos é composta pelas células em estágios iniciais (espermatogônias e espermátocitos) mais próximas as paredes dos lóculos, e conforme o processo de maturação gamético progride, as células em estágios mais avançados (espermátides e espermatozoides) tendem a se direcionar ao lúmen (Santos e De oliveira, 2008; Santos et al., 2011). Assim como o encontrado por Pucci Alcaide et al., (2020) a espécie tende a apresentar uma maior abundância de cistos de espermatogônias e espermátocitos, indicando que a maior parte das células germinativas estão no estágio inicial.

Sabe-se que o processo de espermatogênese é regulado por hormônios andrógenos (Rastogi et al., 2011) e muitos poluentes químicos são desreguladores endócrinos com atividades androgênicas ou antiandrogênicas (Kloas e Lutz, 2006), interferindo no eixo hipotálamo-pituitário-gonadal, em pontos cruciais da síntese de testosterona, podendo atuar de maneira masculinizante (Kloas e Lutz, 2006; Li et al., 2017). Por exemplo, compostos como o herbicida linuron, podem causar o aumento no número de espermatogônias e aumento dos lóculos seminíferos em anuros (Orton et al., 2018). Em alguns casos, de maneira similar ao nosso trabalho, anuros viventes em áreas de cultivos agrícolas, como arroz e soja, também exibiram maiores áreas de cistos germinativos iniciais e de espermatozoides, em comparação a ambientes preservados (Curi et al., 2021; Rezende et al., 2021).

A espécie *L. fuscus* é dotada de uma série de características que garantem sua existência em ambientes antropizados, desde seus hábitos alimentares diversificados (Santana et al., 2019); boa capacidade de dispersão em áreas abertas (Wynn e Heyer, 2001); seu modo reprodutivo caracterizado pela oviposição e estágios larvais em ninhos subterrâneos, para evitar a dessecação (Haddad e Prado, 2005); ter uma alta plasticidade reprodutiva, com reprodução prolongada (Lucas et al., 2008; Maragno e Cechin, 2009), e aqui vemos uma tendência de aumento dos cistos espermatogênicos, o que pode estar associado a uma resposta adaptativa da espécie.

Ainda que alterações de habitats possam causar grandes perdas e extinções de espécies consideradas especialistas, aquelas consideradas generalistas acabam se beneficiando dessas modificações drásticas (Catenazzi, 2015; Pyron, 2018). Ambientes antrópicos como áreas agrícolas podem gerar um maior investimento reprodutivo em resposta a uma diminuição da longevidade, como uma forma de compensação (Zamora-Camacho e Comas, 2017), pois o sucesso reprodutivo individual e a viabilidade populacional podem ser altos se a exposição aguda a poluentes durante o período reprodutivo não comprometer a reprodução de modo geral (Bókony et al., 2018). Desta maneira, apesar dos efeitos inicialmente prejudiciais dos poluentes - como pesticidas - em organismos não-alvo, as populações podem evoluir em resposta a esses estressores, em alguns casos, adquirindo até resistência a compostos, como agroquímicos (Hua et al., 2015).

Mesmo que à primeira vista esses aumentos dos parâmetros reprodutivos dos animais de ambientes modificados pareçam favoráveis, não necessariamente são. Nossos resultados fornecem apenas dados quantitativos sobre o epitélio germinativo, porém, vários autores relatam o efeito negativo de compostos desreguladores e ambientes alterados na fertilidade e viabilidade gamética. Baixa contagem e parâmetros de esperma alterados são maiores em ambientes antrópicos, de forma que os animais viventes próximos a cidades, sítios industriais ou áreas com contaminação de metais pesados apresentam diminuição da motilidade e aumento de espermatozoides com deformidades ou mortos (Guo et al., 2018; Sluchyk et al., 2021). Em alguns casos, a exposição a agroquímicos, diminui a fertilidade de anuros (Orton et al., 2018), e mesmo em fêmeas com altas taxas de fecundidade, associadas a áreas de cultivo apresentam diminuição da fertilidade dos ovos (Adams et al., 2021).

5.CONCLUSÃO

Diante dos resultados evidenciados, deve-se considerar duas tendências interpretativas: na primeira os resultados exibem um aumento dos parâmetros reprodutivos nos animais de ambientes antrópicos de modo geral, pois espécies generalistas podem vir a se beneficiar desses novos ambientes gerados pela atividade humana, podendo apresentar uma resposta

compensatória adaptativa; já na segunda, nossos dados mostram que o efeito gerado não é de todo uniforme, de forma que cada tipo de cenário atua diferentemente nas proporções das células germinativas.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, E., Leeb, C., & Brühl, C. A. (2021). Pesticide exposure affects reproductive capacity of common toads (*Bufo bufo*) in a viticultural landscape. *Ecotoxicology*, 30(2), 213-223. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02335-9>

Assis, R. A., Rezende, W. R., Dos Santos, C. G. A., Benvindo-Souza, M., Amorim, N. P. L., Borges, R. E., Franco-Belussi, L., De Oliveira, C. Santos, L. R. S. (2021). Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 60741-60752. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14974-4>

Biswas, N. M., Chakraborty, J., Chanda, S., & Sanyal, S. (1978). Effect of continuous light and darkness on the testicular histology of toad (*Bufo melanostictus*). *Endocrinologia Japonica*, 25(2), 177-180. DOI: <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.25.177>

Bókony, V., Üveges, B., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Nemesházi, E., Csíkvári, O., & Hettyey, A. (2018). Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. *Science of the Total Environment*, 634, 1335-1345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.363>

Bordin, R. O., Fernandes, C. E. D. S., Franco-Belussi, L., Leão, T. R. F., & Sanabria, M. (2022). Sperm morphology and testicular histology of the polyandric species *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from an urban environment. *The Anatomical Record.*, 1-11. DOI: 10.1002/ar.24928

Çakıcı, 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1010-y>

Çakıcı, Ö. (2015). Toxic effects of carbaryl on the histology of testes of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Acta Herpetologica*, 10(1), 23-29. DOI: 10.13128/Acta_Herpetol-14780

Chaves, M. D. J. S., Barbosa, S. C., & Primel, E. G. (2021). Emerging contaminants in Brazilian aquatic environment: identifying targets of potential concern based on occurrence and ecological risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 67528-67543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15245-y>

Campbell, D. E., Montgomerie, R. D., & Langlois, V. S. (2018). Lifecycle exposure to perchlorate differentially alters morphology, biochemistry, and transcription as well as sperm motility in *Silurana tropicalis* frogs. *Environmental Pollution*, 237, 196-204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.038>

Campbell Grant, E. H., Miller, D. A., Muths, E. (2020). A synthesis of evidence of drivers of amphibian declines. *Herpetologica*, 76(2), 101-107. DOI: <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.101>

Catenazzi, A. (2015). State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*, 40(1), 91-119. DOI: 10.1146/annurev-environ-102014-021358

Cordier, J. M., Aguilar, R., Lescano, J. N., Leynaud, G. C., Bonino, A., Miloch, D., ... & Nori, J. (2021). A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. *Biological Conservation*, 253, 108863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108863>

Curi, L. M., Peltzer, P. M., Attademo, M. A., & Lajmanovich, R. C. (2021). Alterations in Gonads and Liver Tissue in Two Neotropical Anuran Species Commonly Occurring in Rice Fields Crops. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(5), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05164-6>

Da Silva, A. P. A., de Oliveira, C. D. L., Quirino, A. M. S., da Silva, F. D. M., de Aquino Saraiva, R., & Silva-Cavalcanti, J. S. (2018). Endocrine disruptors in aquatic environment: effects and consequences on the biodiversity of fish and amphibian species. *Aquatic Science and Technology*, 6(1), 35-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.5296/ast.v6i1.12565>

DeFries, R. S., Foley, J. A., & Asner, G. P. (2004). Land-use choices: Balancing human needs and ecosystem function. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(5), 249-257. DOI: [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0249:LCBHNA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0249:LCBHNA]2.0.CO;2)

De Oliveira, C., Zanetoni, C., Zieri, R. (2002). Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia Anura). *Revista chilena de anatomía* .20 (3), 263-268. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-98682002000300005>.

De Oliveira, C., Vicentini, C. A., & Taboga, S. R. (2003). Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius*

spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia*, 56(1), 75-83. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589310>

Delgado-Acevedo, J., Restrepo, C. (2008). The contribution of habitat loss to changes in body size, allometry, and bilateral asymmetry in two Eleutherodactylus frogs from Puerto Rico. *Conservation Biology*, 22(3), 773-782. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00930.x>

Ding, G. H., Tang, Y., Lin, Z. H., Fan, X. L., & Wei, L. (2019). Mating pattern, female reproduction and sexual size dimorphism in a narrow-mouthed frog (*Microhyla fissipes*). *Animal Biology*, 69(2), 247-257. DOI: <https://doi.org/10.1163/15707563-17000067>

Emerson, S. B. (1997). Testis size variation in frogs: testing the alternatives. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(4), 227-235. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002650050383>

Fan, X. L., Lin, Z. H., & Ji, X. (2013). Male size does not correlate with fertilization success in two bufonid toads that show size-assortative mating. *Current Zoology*, 59(6), 740-746. DOI: <https://doi.org/10.1093/czoolo/59.6.740>

Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., De Oliveira, C. (2018). Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237, 93-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>

Ferrante, L., & Fearnside, P. M. (2020). Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs. *Acta Amazonica*, 50, 363-366. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000562>

Franco-Belussi L., Provete D.B., Borges R.E., Oliveira C., Santos L.R.S. (2020) Idiosyncratic liver alterations of five frog species to land use changes in the Brazilian Cerrado. *PeerJ* 8:e9751. <https://doi.org/10.1101/837534>

Freitas, J. S., Giroto, L., Goulart, B. V., Alho, L. D. O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., ... & Espíndola, E. L. G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>

Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-574. DOI: DOI: 10.1126/science.1111772

Grimm, N. B., Faeth, S. H., Golubiewski, N. E., Redman, C. L., Wu, J., Bai, X., & Briggs, J. M. (2008). Global change and the ecology of cities. *Science*, 319(5864), 756-760. DOI: [10.1126/science.1150195](https://doi.org/10.1126/science.1150195)

Guo, R., Zhang, W., Yang, Y., Ding, J., Ai, S., Yang, W., ... & Zhang, Y. (2018). Sperm morphology and motility of *Bufo raddei* under long-term environmental heavy metal stress. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101(3), 305-313. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2408-3>

Hamlin, H. J., & Guillette Jr, L. J. (2010). Birth defects in wildlife: the role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(2), 113-121. DOI: <https://doi.org/10.3109/19396360903244598>

Hayes, T. B., Falso, P., Gallipeau, S., & Stice, M. (2010a). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 921-933. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>

Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... & Gallipeau, S. (2010b). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>

Hoffmann, F., & Kloas, W. (2010). An environmentally relevant endocrine-disrupting antiandrogen, vinclozolin, affects calling behavior of male *Xenopus laevis*. *Hormones and behavior*, 58(4), 653-659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.008>

Hoffmann, F., & Kloas, W. (2016). p, p'-Dichlordiphenyldichloroethylene (p, p'-DDE) can elicit antiandrogenic and estrogenic modes of action in the amphibian *Xenopus laevis*. *Physiology & Behavior*, 167, 172-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.012>

Haddad, C. F., & Prado, C. P. (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3), 207-217. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2)

Hua, J., Jones, D. K., Mattes, B. M., Cothran, R. D., Relyea, R. A., & Hoverman, J. T. (2015). The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. *Evolutionary applications*, 8(6), 586-596. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.12267>

Huang, M. Y., Duan, R. Y., & Ji, X. (2015). The influence of long-term cadmium exposure on phonotaxis in male *Pelophylax nigromaculata*. *Chemosphere*, 119, 763-768. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.014>

Hussain, Q. A., Pandit, A. K. (2012). Global amphibian declines: a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(10), 348-357. DOI: 10.5897/IJBC12

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2022). Disponível em :< <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/> >. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). (2022) Parque Nacional das Emas. Disponível em: < <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado/lista-de-ucs/parna-das-emas> >. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

IMB – Instituto Mauro Borges de estatísticas e estudos socioeconômicos. Goiás em dados 2022. Disponível em: < <https://www.imb.go.gov.br>>. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acessado em: 15 de julho de 2022.

Karlsson, O., Svanholm, S., Eriksson, A., Chidiac, J., Eriksson, J., Jernerén, F., & Berg, C. (2021). Pesticide-induced multigenerational effects on amphibian reproduction and metabolism. *Science of the Total Environment*, 775, 145771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145771>

Kloas, W., & Lutz, I. (2006). Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of chromatography A*, 1130(1), 16-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.001>

Leite, G. B., Franco-Belussi, L., Provete, D. B., & de Oliveira, C. (2015). Comparative testis morphology of Neotropical anurans. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 257, 29-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.005>

Li, Y., Cohen, J. M., & Rohr, J. R. (2013). Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*, 8(2), 145-161. DOI: <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12001>

Li, S., Li, M., Gui, W., Wang, Q., & Zhu, G. (2017). Disrupting effects of azocyclotin to the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and reproduction of *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 185, 121-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.010>

Liao, W. B., Mi, Z. P., Zhou, C. Q., Jin, L., Han, X., Lou, S. L., & Ma, J. (2011). Relative testis size and mating systems in anurans: large testis in multiple-male mating in foam-nesting frogs. *Animal Biology*, 61(2), 225-238. DOI: <https://doi.org/10.1163/157075511X570312>

Lucas, E. M., Brasileiro, C. A., Oyamaguchi, H. M., & Martins, M. (2008). The reproductive ecology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae): new data from natural temporary ponds in the Brazilian Cerrado and a review throughout its distribution. *Journal of natural history*, 42(35-36), 2305-2320. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222930802254698>

Mackenzie, C. A., Berrill, M., Metcalfe, C., & Pauli, B. D. (2003). Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2466-2475. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-173>

Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., & Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157(11), 2903-2927. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

Maragno, F. P., & Cechin, S. Z. (2009). Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 99, 237-241. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212009000300002>

McCoy, K. A., Bortnick, L. J., Campbell, C. M., Hamlin, H. J., Guillette Jr, 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. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.11536>

McDaniel, T. V., Martin, P. A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C. H., McMaster, M. E., ... & Tetreault, G. (2008). Potential 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*, 88(4), 230-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.002>

Montezol, M., Cassel, M., Silva, D., Ferreira, A., & Mehanna, M. (2018). Gametogenesis and reproductive dynamics of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae): Influence of environmental and anthropogenic factors. *Acta Zoologica*, 99(1), 93-104. DOI: <https://doi.org/10.1111/azo.12195>

Moresco, R. M., Margarido, V. P., & de Oliveira, C. (2014). A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the

neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. *Environmental Research*, 132, 6-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>

Orton, F., & Tyler, C. R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians?. *Biological Reviews*, 90(4), 1100-1117. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12147>

Orton, F., Säfholm, M., Jansson, E., Carlsson, Y., Eriksson, A., Fick, J., Uren Webster, T., McMillan, T., Leishman, M., Verbruggen, B., Berg, C. (2018). Exposure to an anti-androgenic herbicide negatively impacts reproductive physiology and fertility in *Xenopus tropicalis*. *Scientific Reports*, 8(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27161-2>

Othman, M. S., Khonsue, W., Kitana, J., Thirakhupt, K., Robson, M. G., & Kitana, N. (2011). Reproductive mode of *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) caught from Mae Sot, Thailand based on its gonadosomatic indices. *Asian Herpetological Research*, 2(1), 41. DOI: 10.3724/SP.J.1245.2011.00041

Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of environmental management*, 237, 408-423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>

Prado, C. P. A., & Haddad, C. F. (2003). Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *Journal of Herpetology*, 37(2), 354-362. DOI: [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037\[0354:TSILFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0354:TSILFA]2.0.CO;2)

Poulsen, R., Luong, X., Hansen, M., Styrisshave, B., & Hayes, T. (2015). Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 168, 28-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.008>

Pucci Alcaide, A., Pucci Alcaide, F. J., Michel, A. A., & Ponssa, M. L. (2020). Testicular histology of Anurans that deposit eggs out of the water. *Acta Zoológica Lilloana*, 84-115. DOI: <https://doi.org/10.30550/j.azl/2020.64.2/2>

Pyron, R. A. (2018). Global amphibian declines have winners and losers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), 3739-3741. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.180347711>

Ramm, S. A., & Schärer, L. (2014). The evolutionary ecology of testicular function: size isn't everything. *Biological Reviews*, 89(4), 874-888. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12084>

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*, 197(3), 277-302. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmor.1051970304>

Rastogi, R. K., Pinelli, C., Polese, G., D'Aniello, B., & Chieffi-Baccari, G. (2011). Hormones and reproductive cycles in anuran amphibians. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 171-186). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10009-4>

Rezende, W. R., Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2021). Testicular morphometric changes in neotropical anurans from agroecosystems. *Environmental Pollution*, 271, 116265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116265>

Rojas-Hucks, S., Gutleb, A. C., González, C. M., Contal, S., Mehennaoui, K., Jacobs, A., ... & Pulgar, J. (2019). *Xenopus laevis* as a Bioindicator of Endocrine Disruptors in the Region of Central Chile. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(3), 390-408. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00661-6>

Santana, D. J., Ferreira, V. G., Crestani, G. N., & Neves, M. O. (2019). Diet of the Rufous Frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) from two contrasting environments. *Herpetozoa*, 32, 1. DOI: 10.3897/herpetozoa.32.e35623

Santos, L. R.S., & de Oliveira, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 39(8), 1266-1270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.006>

Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., De Oliveira, C. (2011). Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoological science*. 28, 840e844. DOI: <https://doi.org/10.2108/zsj.28.840>.

Schwendiman, A. L., & Propper, C. R. (2012). A common environmental contaminant affects sexual behavior in the clawed frog, *Xenopus tropicalis*. *Physiology & Behavior*, 106(4), 520-526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.035>

Simmons, A.M., Narins, P.M. (2018). Effects of Anthropogenic Noise on Amphibians and Reptiles. In: Slabbekoorn, H., Dooling, R., Popper, A., Fay, R. (eds) *Effects of Anthropogenic Noise on Animals. Springer Handbook of Auditory Research*, vol 66. Springer, New York, NY. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8574-6_7

Smit, J. A. H., Cronin, A. D., van der Wiel, I., Oteman, B., Ellers, J., & Halfwerk, W. (2022). Interactive and independent effects of light and noise pollution on

sexual signaling in frogs. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 757. DOI: 10.3389/fevo.2022.934661

Sluchyk, I., Grytsulyak, B., Glodan, O., Ivasiuk, I., & Khallo, A. (2021). Comparison of sperm parameters and testis histological structure in lake frog (*Pelophylax ridibundus*) from areas with different level of anthropogenic pollution. *ScienceRise: Biological Science*, 1 (26), 10–13, 2021. DOI: 10.15587/2519-8025.2021.228082

Tamschick, S., Rozenblut-Kościsty, B., Ogielska, M., Kekenj, D., Gajewski, F., Krüger, A., ... & Stöck, M. (2016a). The plasticizer bisphenol A affects somatic and sexual development, but differently in pipid, hylid and bufonid anurans. *Environmental Pollution*, 216, 282-291. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.091>

Tamschick, S., Rozenblut-Kościsty, B., Ogielska, M., Lehmann, A., Lymberakis, P., Hoffmann, F., ... & Stöck, M. (2016b). Sex reversal assessments reveal different vulnerability to endocrine disruption between deeply diverged anuran lineages. *Scientific Reports*, 6(1), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep23825>

Tennessen, J. B., Parks, S. E., & Langkilde, T. (2014). Traffic noise causes physiological stress and impairs breeding migration behaviour in frogs. *Conservation Physiology*, 2(1). DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cou032>

Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Babajide, O. O., & Petrik, L. F. (2016). Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental chemistry letters*, 14(1), 27-49. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>

Touzot, M., Lengagne, T., Secondi, J., Desouhant, E., Thery, M., Dumet, A., Duchamp, C., Mondy, N. (2020). Artificial light at night alters the sexual behaviour and fertilisation success of the common toad. *Environmental Pollution*, 259, 113883. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113883>

Trudeau, V. L., Thomson, P., Zhang, W. S., Reynaud, S., Navarro-Martin, L., & Langlois, V. S. (2020). Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 513, 110861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>

Wake, D. B., Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11466-11473. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>

Wise, S. (2007). Studying the ecological impacts of light pollution on wildlife: amphibians as models. *Starlight: A Common Heritage*; Cipriano, M., Jafar, J., Eds, 209-218.

Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 248, 109103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>

Zlotnik, S., Gridi-Papp, M., & Bernal, X. E. (2019). Laryngeal demasculinization in wild cane toads varies with land use. *EcoHealth*, 16(4), 682-693. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01447-x>

Wynn, A., & Heyer, W. R. (2001). Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae). *Tropical Zoology*, 14(2), 255-285. DOI: <https://doi.org/10.1080/03946975.2001.10531157>

Zamora-Camacho, F. J., & Comas, M. (2017). Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. *PeerJ*, 5, e3791. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3791>

PRANCHA DE FIGURAS

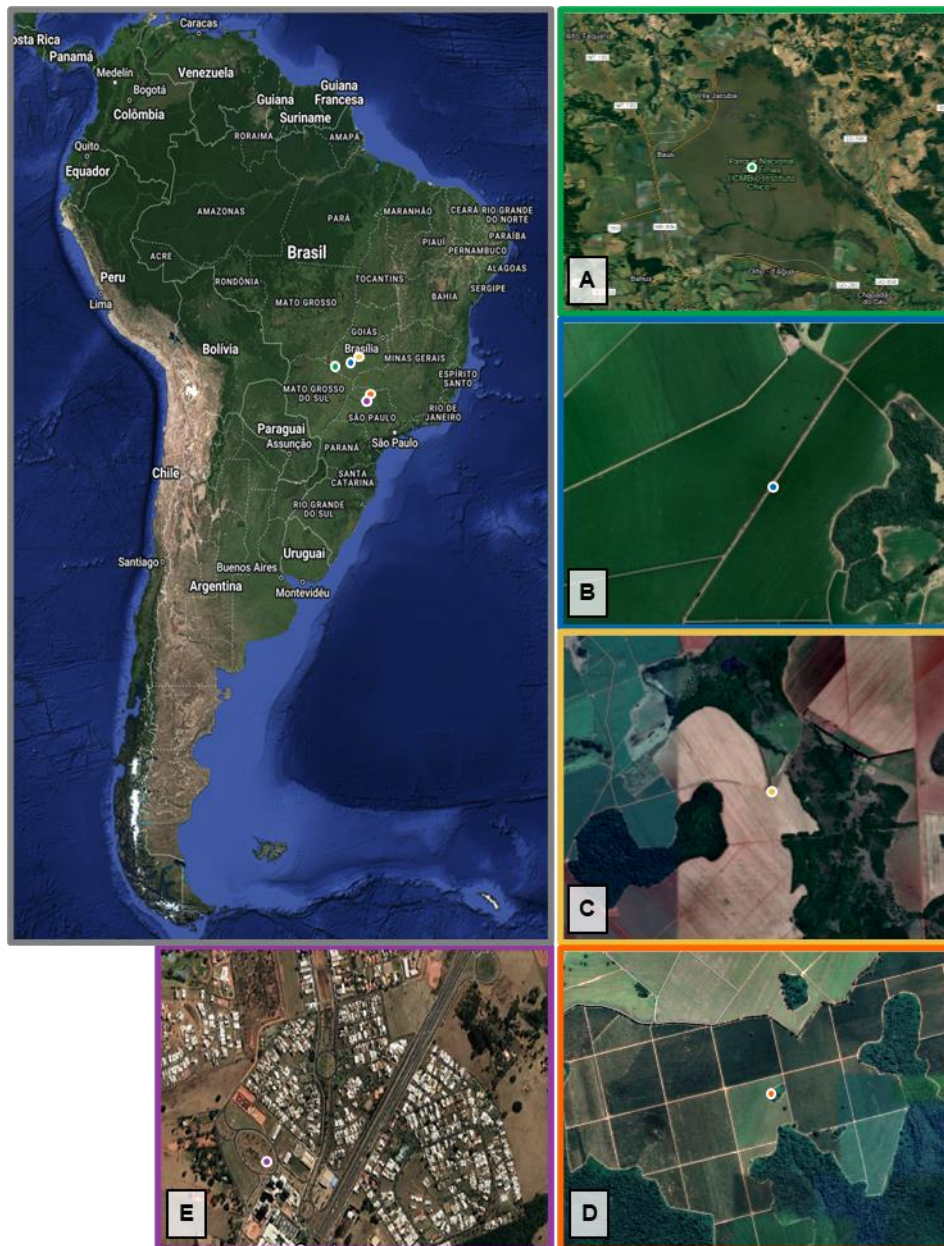


Figura 1: Imagens dos pontos de coletas de *Leptodactylus fuscus*: **A-** Unidade de conservação (Parque Nacional das Emas, Mineiros-GO); **B-** plantação de soja (Rio Verde- GO); **C-** plantação de cana associada a usina (Paraúna-GO); **D-** plantação de cana (São José do Rio Preto- SP); **E-** ambiente urbano (São José do Rio Preto- SP). Fonte: Google Earth.

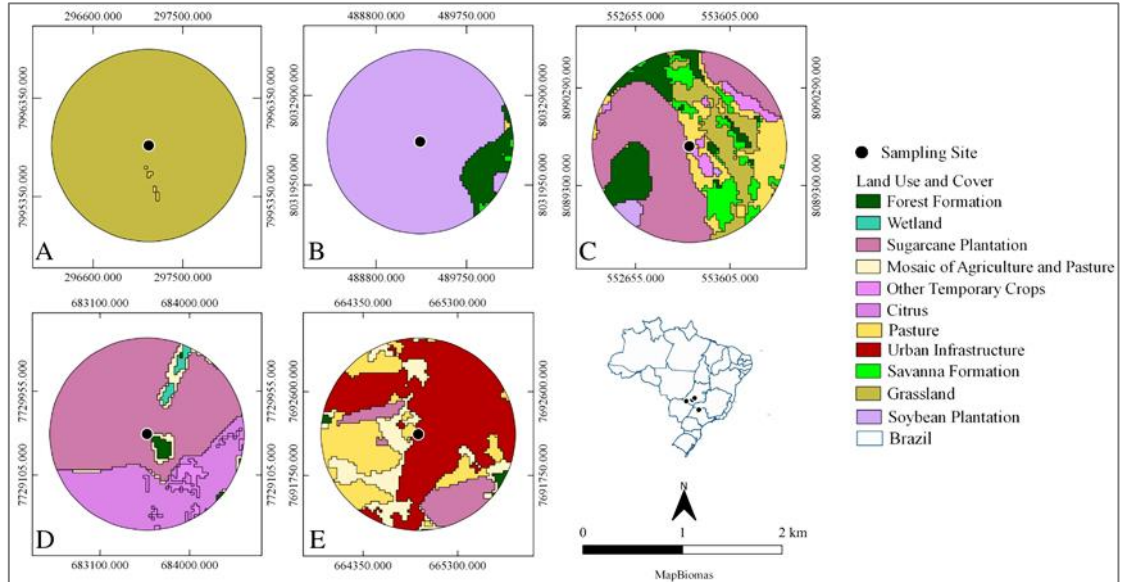


Figura 2: Caracterização dos ambientes amostrados: **A-** Unidade de conservação; **B-** SOJA_GO; **C-** CANA_GO; **D-** CANA_SP; **E-** URBANO_SP. Classificação de acordo com o Google Earth para os anos de 2018-2020. Raio de 2km.

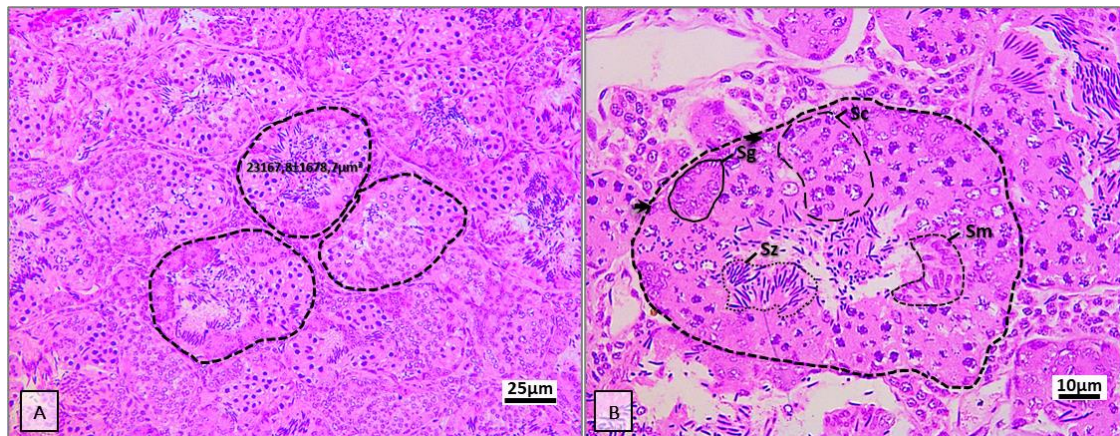
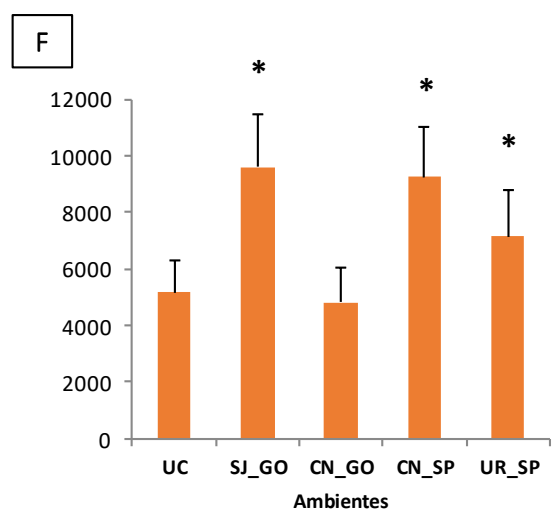
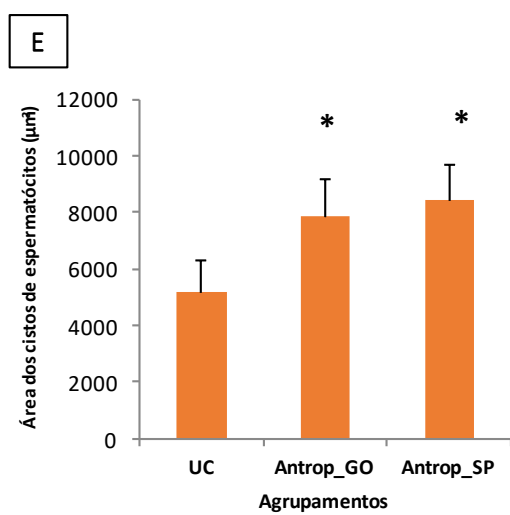
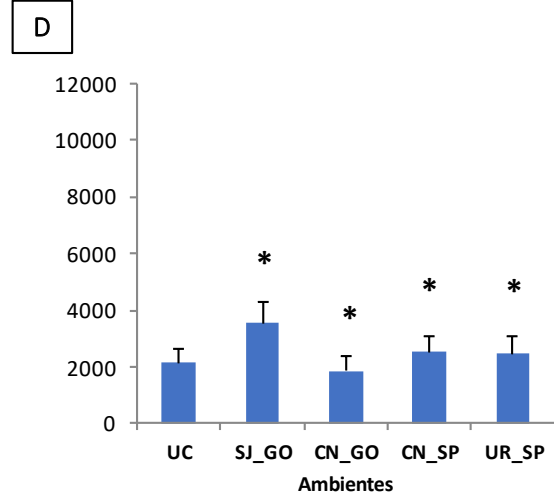
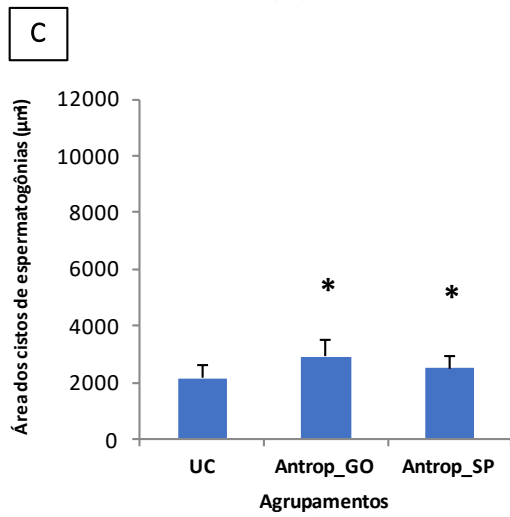
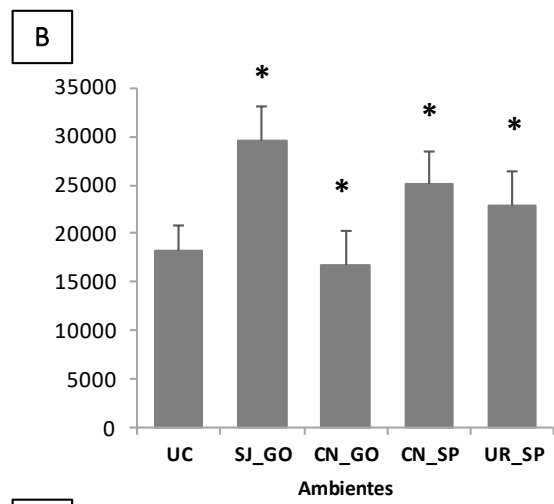
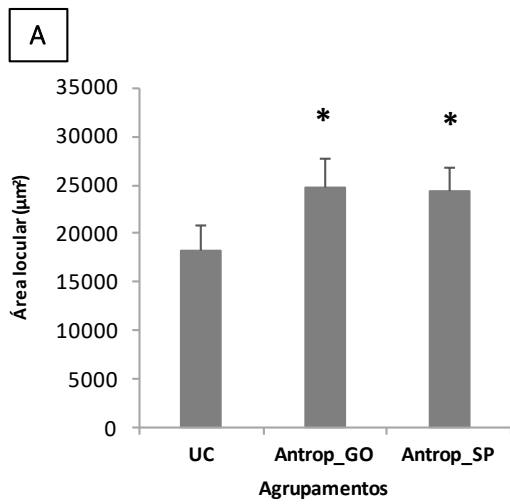


Figura 3: Arquitetura testicular de *L. fuscus*. Em **A** os lóculos seminíferos circunscritos em preto, para nossa amostra, esses lóculos se apresentaram com formas arredondadas com área média de $23167,8 \pm 1678,7 \mu\text{m}^2$. Em **B**, ampliação da unidade seminífera evidenciando os cistos germinativos em diferentes estágios de diferenciação, retidos pelas células de Sertoli (setas pretas). **Sg-** espermatogônias; **Sc-** espermátocitos; **Sm-** espermátides; **Sz-** espermatozoides. Coloração H-E



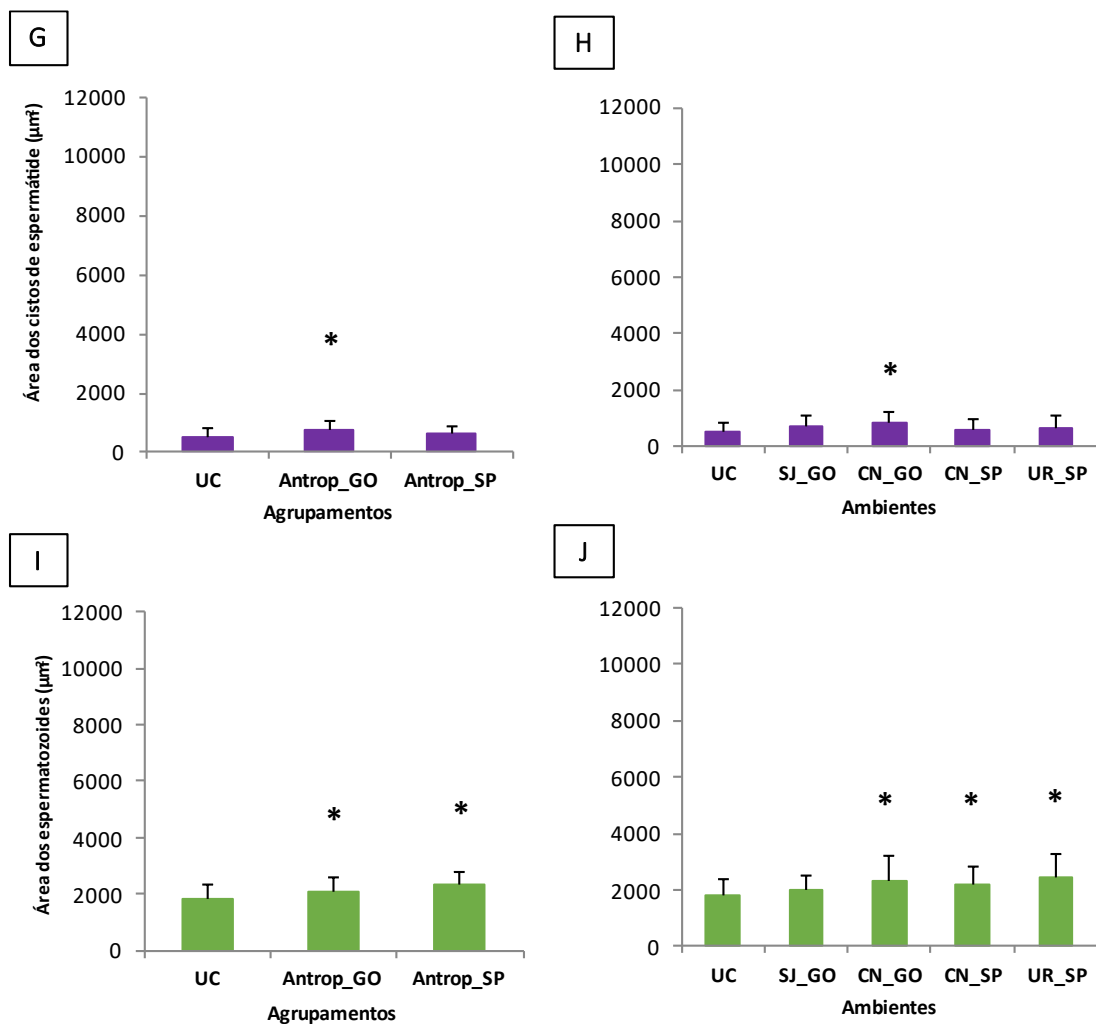


Figura 4: Área média dos parâmetros morfométricos testiculares de *L. fuscus*: as letras **A, C, E, G** e **I** representam os dados tratados de forma agrupada, já em **B, D, F, H** e **J** os dados estão representados de maneira separada. **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP. O “*” evidencia a diferença estatística em comparação a unidade de conservação ($p < 0.05$). Os dados apresentados em média $\pm$ SE.

TABELAS

Tabela 1: Parametros climáticos médios dos ambientes amostrados, referentes aos respectivos anos de coleta. **UC**- Unidade de conservação.

Ambientes	Data (M/A)	Temperatura (°C)		Precipitação (mm/dia)	Irradiação (kW/h/m ² /dia)
		Mínima	Máxima		
UC	dez/18	17,17	31,69	4,01	5,42
SOJA_GO	nov/18	17,00	32,61	4,53	5,16
CANA_GO	fev/19	19,91	34,44	7,72	3,88
CANA_SP	fev/20	18,65	31,92	7,22	3,36
URBANO_SP	jan/20	19,03	34,18	6,55	4,70

Tabela 2: Proporções dos tipos de uso do solo num raio de 2km dos pontos amostrados. UC- Unidade de conservação.

Ambientes	Tipos de matriz	%
UC	Pastagem natural	0,3
	Campo	99,7
SOJA_GO	Formação de Floresta	8,5
	Formação de savana	0,4
	Pastagem	0,2
	Plantação de soja	90,9
CANA_GO	Formação de Floresta	14,2
	Formação de savana	9,8
	Campo	13,1
	Pastagem	16,3
	Plantação de cana-de-açúcar	40,8
	Plantação de soja	1,8
CANA_SP	Outras plantações temporárias	4,0
	Formação de Floresta	1,2
	Zona úmida	1,3
	Plantação de cana-de-açúcar	61,6
	Mosaico de agricultura e pastagem	3,6
	Outras plantações temporárias	3,6
URBANO_SP	Citrus	28,8
	Formação de floresta	0,7
	pastagem	22,2
	Plantação de cana-de-açúcar	10,5
	Mosaico de agricultura e pastagem	15,1
	Infraestrutura Urbana	51,5

Tabela 3: Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. **nq** – não quantificado; **LQ/Faixa** - limite de quantificação; **UC** – unidade de conservação.

Parâmetros	Unidade	LQ/Faixa	CONAMA 357	Resultados				
				UC	Cana - GO	Soja - GO	Cana - SP	Urbano - SP
1 Coliformes Totais	NMP/100mL	10	---	nq	nq	nq	nq	> 24200
2 Coliformes Termotolerantes	NMP/100mL	10	1000	nq	nq	nq	nq	1722
3 Alumínio Dissolvido	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0986
4 Antimônio	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
5 Arsênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
6 Bário	mg/L	0,001	0,7	nq	nq	nq	nq	0,0113
7 Berílio	mg/L	0,001	0,04	nq	nq	nq	nq	< 0,001
8 Boro	mg/L	0,001	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
9 Cádmio	mg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0,001
10 Chumbo	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
11 Cianeto Livre	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
12 Cloreto	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	1,83
13 Cloro Residual Total	mg/L	0,01	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,01
14 Cobalto	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,001
15 Cobre Dissolvido	mg/L	0,001	0,009	nq	nq	nq	nq	0,0031
16 Cromo	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	0,0014
17 Ferro Dissolvido	mg/L	0,001	0,3	nq	nq	nq	nq	0,103
18 Fluoreto	mg/L	0,05	1,4	nq	nq	nq	nq	0,12
19 Fósforo Total	mg/L	0,01	Obs (2)	nq	nq	nq	nq	0,0585
20 Lítio	mg/L	0,001	2,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
21 Manganês	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0055
22 Mercúrio	mg/L	0,0001	0,0002	nq	nq	nq	nq	< 0,0001
23 Níquel	mg/L	0,001	0,025	nq	nq	nq	nq	< 0,001
24 Nitrato	mg/L	0,5	10	nq	nq	nq	nq	< 0,5
25 Nitrito	mg/L	0,02	1	nq	nq	nq	nq	< 0,02
26 Nitrogênio Amoniacal	mg/L	0,1	Obs (1)	nq	nq	nq	nq	< 0,1
27 Prata	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
28 Selênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
29 Sulfato	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	2,95
30 Sulfetos	mg/L	0,002	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0,002
31 Urânio	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0,001
32 Vanádio	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0021
33 Zinco	mg/L	0,001	0,18	nq	nq	nq	nq	0,0049
34 Acrilamida	µg/L	0,1	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,1
35 Alaclor	µg/L	0,005	20	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,005	< 0,005
36 Aldrin + Dieldrin	µg/L	0,002	0,005	< 0,02	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
37 Atrazina	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	0,0092	< 0,005
38 Benzeno	mg/L	0,0005	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,0005
39 Benzo(a)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
40 Benzo(a)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
41 Benzo(b)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
42 Benzo(k)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
43 Acenofileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
44 Fluoreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
45 Antraceno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
46 Benzo(g,h,i)perileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
47 Fenantreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
48 Pireno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
49 Acenafteno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
50 Carbaril	µg/L	0,005	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,005	< 0,005
51 Clordano (cis e trans)	µg/L	0,002	0,04	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,002	< 0,002
52 2-Clorofenol	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
53 Criseno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
54 2,4-D	µg/L	0,005	4	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,005	< 0,005
55 Dibenzo(a,h)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
56 2,4-Diclorofenol	µg/L	0,005	0,3	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
57 Dodecacloropentaciclodecano	µg/L	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
58 Endrin	µg/L	0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
59 Gution	µg/L	0,004	0,005	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
60 Indeno(1,2,3,cd)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,005
61 Lindano (g-HCH)	µg/L	0,001	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	nq	< 0,001
62 Malation	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
63 Metolacoloro	µg/L	0,005	10	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,17	< 0,005

64	Metoxicloro	µg/L	0,001	0,03	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
65	Paration	µg/L	0,005	0,04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.005	< 0.005
66	Pentaclorofenol	mg/L	0,000005	0,009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.000005	< 0.000005
67	Simazina	µg/L	0,005	2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.005	< 0.005
68	2,4,5-T	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
69	2,4,5-TP	µg/L	0,005	10	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
70	2,4,6-Triclorofenol	mg/L	0,000003	0,01	nq	nq	nq	< 0.000003	< 0.000003
71	Trifluralina	µg/L	0,005	0,2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.005	< 0.005
72	Demeton (-O e -S)	µg/L	0,01	0,1	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.01	< 0.01
73	Heptacloro e Heptacloro Epóxido	µg/L	0,002	0,01	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.002	< 0.002
74	o,p'-DDT	µg/L	0,001	0,002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	nq	nq
75	o,p'-DDT + o,p'-DDD + o,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	< 0.003	< 0.003	< 0.003	nq	nq
76	p,p'-DDT + p,p'-DDD + p,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.003
77	Endossulfan (a, b e sulfato)	µg/L	0,003	0,056	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.003	< 0.003
78	PCB's	µg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0.001
79	PCB 8	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
80	PCB 28	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
81	PCB 37	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
82	PCB 44	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
83	PCB 49	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
84	PCB 52	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
85	PCB 60	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
86	PCB 66	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
87	PCB 70	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
88	PCB 74	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
89	PCB 77	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
90	PCB 82	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
91	PCB 87	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
92	PCB 99	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
93	PCB 101	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
94	PCB 105	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
95	PCB 114	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
96	PCB 118	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
97	PCB 126 + 166	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
98	PCB 128 + 167	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
99	PCB 138 + 158	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
100	PCB 153	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
101	PCB 156	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
102	PCB 169	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
103	PCB 170	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
104	PCB 179	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
105	PCB 180	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
106	PCB 183	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
107	Hexaclorobenzeno	µg/L	0,005	0,0065	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005
108	Tributilestanho	µg/L	0,005	0,063	nq	nq	nq	< 0.005	< 0.005
109	Benzidina	µg/L	0,0001	0,001	nq	nq	nq	< 0.0001	< 0.0001
110	1,2-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00045	< 0.00045	< 0.00045	< 0.001	< 0.001
111	1,1-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001
112	Diclorometano	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
113	Estireno	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
114	Etilbenzeno	µg/L	1	90	nq	nq	nq	nq	< 1
115	Índice de Fenóis	mg/L	0,001	0,003	nq	nq	nq	nq	0,001
116	Glifosato	µg/L	5	65	< 55	< 55	< 55	nq	< 5
117	Surfactantes (como o LAS)	mg/L	0,2	0,5	nq	nq	nq	nq	0,21
118	Tetracloroeto de Carbono	mg/L	0,0005	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0.0005
119	Tetracloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00031	< 0.00031	< 0.00031	nq	< 0.001
120	Tolueno	µg/L	1	2	nq	nq	nq	nq	< 1
121	Toxafeno	µg/L	0,01	0,01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	nq	< 0.01
122	Triclorobenzenos	mg/L	0,003	0,02	< 0.00043	< 0.00043	< 0.00043	nq	< 0.003
123	Tricloroetano	mg/L	0,0005	0,03	< 0.002	< 0.002	< 0.002	nq	< 0.0005
124	Xilenos	µg/L	3	300	nq	nq	nq	nq	< 3
125	pH (a 25°C)	- - -	2 - 13	6 - 9	nq	nq	nq	nq	6,79
126	Sólidos Dissolvidos Totais	mg/L	5	500	nq	nq	nq	nq	20

Obs (1): VMP em função do pH: 3,7mg/L para pH ≤ 7,5; 2,0mg/L para 7,5 < pH < 8,0; 1,0mg/L para 8,0 < pH < 8,5; 0,5mg/L para pH > 8,5.

Obs (2): VMP Ambiente Léntico: 0,030 mg/L. / VMP Ambiente Intermediário: 0,050 mg/L. / VMP Ambiente Lótico: 0,100 mg/L

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de *L. fuscus*.

Ambientes	Data (M/A)	Temperatura (°C)	pH	O ² Dissolvido (%)	Condutividade (µS)	Resistividade	Salinidade (psu)	Sólidos totais dissolvidos (ppm)
UC	dez/18	23,20	7,41	101,90	2,56	3,20	0,01	1,40
SOJA_GO	nov/18	35,70	5,38	76,10	3,70	24,80	1,31	20,00
CANA_GO	fev/19	28,90	7,74	90,50	52,60	19,20	0,03	26,00
CANA_SP	fev/20	27,00	8,84	60,00	47,60	–	0,02	–
URBANO_SP	jan/20	30,80	9,37	62,00	49,20	–	0,03	–

Tabela 5: Média dos valores encontrados nos parâmetros biométricos. **CRC** – Comprimento rostro-cloacal; **IGS** – Índice gonadosomático. Média ± SE.

Agrupamentos	Parâmetros biométricos		
	Peso Total (g)	CRC (mm)	IGS (%)
	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
Unidade de Conservação	9,314 ± 0,293	50,414 ± 2,030	0,063 ± 0,007
Antropizado_GO	8,570 ± 0,394	43,498 ± 0,632	0,163 ± 0,037
Antropizado_SP	9,385 ± 0,348	44,705 ± 0,520	0,170 ± 0,046
Ambientes			
Unidade de Conservação	9,314 ± 0,293	50,414 ± 2,030	0,063 ± 0,007
Soja_GO	9,643 ± 0,289	44,956 ± 0,612	0,106 ± 0,008
Cana_GO	6,732 ± 0,333	41,000 ± 0,654	0,344 ± 0,071
Cana_SP	9,352 ± 0,506	44,438 ± 0,740	0,188 ± 0,069
Urbano_SP	9,447 ± 0,378	45,200 ± 0,595	0,136 ± 0,019

Tabela 6: Valores estatísticos encontrados nos parâmetros biométricos, considerando como significativo p<0.05. **CRC** – Comprimento rostro-cloacal; **IGS** – Índice gonadossomático; **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **C_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

Parâmetros biométricos												
Agrupamentos	Peso Total				CRC				IGS			
	Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP	
Unidade de Conservação	=0.2		=0.2		<0.0001		<0.0006		=0.1		=0.1	
Antrop_GO X Antrop_SP	= 0.2				=0.5				=0.1			
Ambientes	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP	SJ_GO	CN_GO	CN_SP	UR_SP
UC	=0.9	=0.001	=1.0	=0.9	=0.006	<0.0001	=0.001	=0.003	=0.9	<0.0001	=0.9	=0.9
SJ_GO		= 0.0001	=0.9	=0.9		=0.1	=0.9	=0.9		<0.0001	=0.9	=0.9
CN_GO			=0.0005	=0.002			=0.2	=0.1			<0.0001	<0.0001
CN_SP				=0.9				=0.9				=0.9

Tabela 7: Média da área dos parâmetros morfométricos testiculares. **A.LOC** – área locular; **Sg** - espermátogônias; **Sc** - espermátocitos; **Sm**- espermátides; **Sz**- espermatozoides. Média ± SE.

Agrupamentos	Parâmetros morfométricos testiculares				
	A.LOC (µm²)	Sg (µm²)	Sc (µm²)	Sm (µm²)	Sz (µm²)
	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
Unidade de Conservação	18168,80 ± 2678,84	2161,88 ± 458,87	5180,94 ± 1089,35	521,71 ± 293,56	1812,81 ± 550,83
Antropizado_GO	24757,56 ± 1783,32	2918,45 ± 566,60	7840,05 ± 1352,46	753,60 ± 293,33	2114,87 ± 469,70
Antropizado_SP	24264,55 ± 903,74	2503,78 ± 421,65	8422,04 ± 1266,37	616,25 ± 285,48	2310,20 ± 493,53
Ambientes					
Unidade de Conservação	18168,80 ± 2678,84	2161,88 ± 458,87	5180,94 ± 1089,35	521,71 ± 293,56	1812,81 ± 550,83
Soja_GO	29450,60 ± 3654,91	3532,79 ± 795,22	9607,86 ± 1826,62	714,41 ± 399,10	1982,46 ± 555,14
Cana_GO	16712,58 ± 3513,97	1865,29 ± 506,48	4809,53 ± 1263,58	820,80 ± 406,30	2341,88 ± 841,96
Cana_SP	25181,58 ± 3263,02	2537,53 ± 565,88	9233,60 ± 1751,38	594,36 ± 364,25	2209,12 ± 628,71
Urbano_SP	22823,49 ± 3627,55	2450,75 ± 620,31	7146,73 ± 1629,17	650,65 ± 459,67	2469,04 ± 793,36

Tabela 8: Valores estatísticos encontrados para os parâmetros morfométricos testiculares, considerando como significativo p<0.05. **A.LOC** – área locular; **Sg** - espermátogônias; **Sc** - espermátocitos; **Sm**- espermátides; **Sz**: espermatozoides; **UC**- Unidade de conservação; **Antrop_GO** – Antropizado_GO; **Antrop_SP** – Antropizado_SP; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO** – Cana_GO; **CN_SP** – Cana_SP; **UR_SP** – Urbano_SP.

Parâmetros morfométricos testiculares																				
Agrupamentos	A.LOC (µm²)				Sg (µm²)				Sc (µm²)				Sm (µm²)				Sz (µm²)			
	Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP		Antrop_GO		Antrop_SP	
Unidade de Conservação	< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001	
Antrop_GO X Antrop_SP	=0.358				< 0.0001				= 0.0002				= 0.0001				= 0.008			
Ambientes	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	CN_SP	SJ_GO	CN_GO	UR_SP	CN_SP
UC	<0.0001	=0.039	<0.0001	<0.0001	<0.0001	=0.01	=0.0001	=0.02	<0.0001	=0.559	<0.0001	<0.0001	=0.0014	<0.0001	=0.62	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
SJ_GO		<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	=0.37	<0.0001		=0.32	=0.10	=0.79	=0.001	=0.05	<0.0001	
CN_GO			<0.0001	<0.0001			<0.0001	<0.0001			<0.0001	<0.0001			=0.0008	=0.05	=0.64	=0.75		
CN_SP				<0.0001				=0.8				<0.0001			=0.86			=0.05		

CAPÍTULO 3

Capítulo 3

Interação do sistema reprodutor e imunológico (*trade-off*) em anuros vivos em diferentes ambientes antropizados

RESUMO

Para a manutenção das espécies é essencial que os organismos apresentem uma resposta imune dinâmica e uma ótima atividade reprodutiva. Porém, esses processos são energeticamente custosos, e como os animais não dispõem de grandes reservas, os organismos podem priorizar um sistema em função do outro (*trade-off*), essa relação pode ainda sofrer influência de ambientes alterados e poluentes neles presente. Tendo isso em vista, nosso trabalho visou investigar a interação entre a imunidade celular e reprodução do anuro *Leptodactylus fuscus*, e se a antropização exerce influência tanto nos sistemas isoladamente, quanto na possível relação entre eles. Foram analisados biomarcadores morfométricos, imunológicos (contagem diferencial de leucócitos, densidade estrutural volumétrica e quantificação de mastócitos do baço) e reprodutivos (área locular e dos cistos espermatogênicos) além do índice de massa escalonar, para estimar a saúde e fitness. Com esses marcadores, foram realizadas análises comparativas correlacionais, visando estabelecer a relação entre os sistemas. Os animais nativos de áreas antropizadas apresentaram uma resposta imune maior bem como um aumento na atividade reprodutiva, entretanto não houve correlações significativas entre os dados. O índice de massa corporal evidenciou um maior número de correlações positivas (ainda que fracas) com parâmetros reprodutivos (área locular, e cistos de espermatogônias e espermatócitos). Ainda que não tenhamos encontrados relações diretas entre os marcadores dos sistemas, os animais por apresentarem boas condições corporais aparentemente podem manter tanto uma boa resposta reprodutiva quanto uma resposta imune sistêmica, nos ambientes antrópicos. Essa resposta pode ser produto de adaptações que espécies generalistas podem apresentar, capacitando-as a se manterem nesses ambientes alterados.

1. INTRODUÇÃO

O esforço reprodutivo e a imunocompetência são de fundamental importância para a adaptação, pois garantem a sobrevivência do indivíduo e a continuidade das espécies (Lochmiller e Deerenberg, 2000; Segner et al., 2017; Schoenle et al., 2018). Esses sistemas ainda que com funções completamente distintas, possuem pontos de interações em comum. Sabe-se que hormônios andrógenos, como a testosterona, regulam as atividades reprodutivas, como comportamento e maturação sexual, mas também podem atuar no sistema imunológico (Segner et al., 2017). Alguns vertebrados apresentam receptores androgênicos em diversas células imunes como neutrófilos, macrófagos e linfócitos B e T (Segner et al., 2017), de forma que a testosterona pode modular as respostas imunes em anuros, suprimindo ou potencializando-as (Desprat et al., 2015; Kindermann et al., 2017; Madelaire et al., 2017; Titon et al., 2018).

Contudo, tanto as respostas reprodutivas quanto as imunológicas demandam de um alto custo energético, e considerando que os organismos dispõem de recursos limitados (Sheldon e Verhulst, 1996; Lochmiller e Deerenberg, 2000; Emerson e Hess, 2001; Demas, 2004; Madelaire e Gomes, 2016; Madelaire et al., 2017; Titon et al., 2018; Gomes et al., 2022), diante de situações de estresse ou desafio imunológico com possível diminuição de expectativa de vida, vertebrados como os anuros podem reagir de maneiras distintas: podendo investir em um maior esforço reprodutivo, garantindo um momento efetivo porém final (Brannelly et al., 2016; Zamora-Camacho e Comas, 2017); ou podem priorizar uma resposta imune, potencializando-a, mas reduzindo a atividade reprodutiva (McCallum e Trauth 2007; Roznik et al., 2015; Kindermann et al., 2017).

Essa complexa relação de demanda conflitante (trad-off) pode ainda estar sujeita a interferências das alterações antrópicas nos habitats (Iglesias-Carrasco et al., 2016), que por si só já exercem pressões negativas aos anuros (Cordier et al., 2021), mas também adicionam aos ambientes inúmeros compostos desreguladores endócrinos (DEs) de diferentes origens (agrícolas, resíduos industriais e urbanos, entre outros), com potencial de intervir em rotas hormonais importantes desses sistemas (reprodutivo e imune) (Tijani et al.,

2016; Da Silva et al., 2018; Esbaugh et al., 2018; Trudeau et al., 2020), o que pode desbalancear ainda essas respostas.

Sendo os anuros muito susceptíveis a contaminantes ambientes (tanto aquáticos como terrestres) (Hayes et al., 2010; Awkerman et al., 2020), este estudo teve por objetivo investigar a possível interrelação entre a resposta imune celular e atividade reprodutiva (nas células germinativas) de *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae), viventes em ambientes com pressões antrópicas distintas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Dados utilizados

Para estabelecer a interação do sistema reprodutor e imunológico, utilizamos dados já coletados de experimentos anteriores, referentes aos capítulos um (Título: “Áreas antropizadas desencadeiam alterações morfofuncionais em células e tecidos imunes em *L. fuscus*”) e dois (Título: “Morfometria testicular como atributo fenotípico para avaliação de antropização ambiental”).

De maneira resumida, foram realizadas coletas em cinco ambientes distribuídos entre os estados de Goiás (Parque Nacional das Emas – controle, plantação de cana e de soja) e de São Paulo (plantação de cana e área urbana). Foram coletados 49 espécimes de *Leptodactylus fuscus*, com imediata eutanásia e coleta de amostras biológicas de baço, sangue e testículos. Foram realizadas as seguintes análises: *biométricos* - peso total, comprimento rostro-cloacal, índice de massa escalonar (IME); *baço*: índice esplenossomático, densidade estrutural volumétrica, e quantificação de mastócitos e melanina; *sangue*: contagem diferencial de leucócitos; *testículo*: índice gonadossomático, área dos componentes germinativos quantificação de mastócitos.

2.2. Análises exploratórias

Para as análises exploratórias dos dados foi realizada uma análise multivariada dos componentes principais (PCA) a fim de comparar as variáveis respostas nos locais amostrados. Essa análise foi escolhida, pois é uma ordenação de reduz a dimensionalidade dos dados. Para avaliar a relação

entre as variáveis respostas de diferentes órgãos, bem como saber se eram complementares, foram realizadas análises de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas no software R.

3.RESULTADOS

De forma bastante ampla e integrada, em nossos dados foi possível evidenciar que houve uma resposta imune sistêmica (com relativos aumentos dos parâmetros leucocitários e esplênicos); um aumento da resposta reprodutiva (expressa através da morfometria testicular); e maiores médias para o IME dos animais viventes em ambientes antropizados.

Os dados referentes às análises exploratórias podem ser observados nas **Figuras 1 e 2**. Das variáveis fenotípicas analisadas, área locular é a que contribui em maior porcentagem (72%) para o eixo 1 da PCA, já para o eixo 2 é a presença da melanina que se destacou com também cerca de 70%. Os valores estatísticos estão sumarizados nos Apêndices D e E.

Apenas o índice de massa escalonar (IME), apresentou um número maior de correlações positivas (ainda que fracas) com parâmetros reprodutivos, especificamente com a área locular ($r = 0.40$; $p = 0.01$), cistos de espermatogônias ($r = 0.35$; $p = 0.02$) e espermátocitos ($r = 0.37$; $p = 0.01$).

Quanto aos parâmetros histológicos comparados entre o sistema reprodutor (testículo) e o imunológico (baço e sangue) não houve nenhum tipo de correlação significativa. Dessa forma, as alterações histológicas observadas no testículo, sangue e baço são independentes entre si.

4 DISCUSSÃO

4.1 Índice de condição corporal

Os índices de condições corporais (ICC) podem predizer a saúde e o fitness de animais, refletindo a condição nutricional e reservas energéticas que esses organismos dispõem, para realizar suas funções fisiológicas (Brodeur et al. 2020), desta forma, em nosso trabalho esse índice representou de forma métrica, um indicador comum entre os dois sistemas.

Quando associados a parâmetros reprodutivos e imunes esses índices, fornecem informações da demanda energética desses sistemas (e.g. Roznik et al., 2015; Madelaire e Gomes, 2016; Madelaire et al., 2017; Titon Junior et al., 2021). Considerando que o IME, apresentou um maior número de correlações positivas (ainda que fracas), com parâmetros reprodutivos (especificamente com a área de espermatogônia, espermátócito e locular), é possível estabelecer uma relação próxima entre esses marcadores, por exemplo, sapos machos com maiores ICC podem obter maior sucesso reprodutivo (Madelaire et al., 2017), já que comportamentos reprodutivos como a vocalização utilizam intensamente as reservas energéticas (Madelaire e Gomes et al., 2016), além disso, esses comportamentos levam ao aumentar hormônios glicocorticoides, que estão associados ao aumento da mobilização de energia utilizadas para atividades imediatas e futuras (Carr, 2011; Leary et al., 2015; Madelaire e Gomes, 2016; Titon et al., 2018).

Ainda que não tenhamos encontrado correlações do IME com marcadores imunes, existem trabalhos na literatura indicando que esses índices são importantes mediadores nas modulações imunológicas (Schoenle et al., 2018), anuros com menores índices corpóreos são negativamente impactados na resposta defensiva quando expostos a lipopolissacarídeos de bactérias (LPS) (Titon Junior et al., 2021), sabe-se também que em situação de estresse a resposta imune pode variar positiva ou negativamente em função dos ICCs (Leary et al. 2015; Titon et al., 2018; Gomes et al., 2022).

Sendo então um reflexo da saúde e nutrição desses animais, o ambiente a qual estão inseridos exerce pressões nesses indicadores, a exemplo, Brodeur et al. (2011) relatou uma diminuição desses índices em anuros coletados em plantio de soja, incluindo espécies do mesmo gênero de *L. fuscus*. Outros tipos de alterações ambientais, como fragmentação e urbanização também podem gerar efeitos negativos nesses organismos (Matías-Ferrer e Escalante, 2015). Entretanto, a resposta pode variar em função das espécies, de forma que espécies generalistas tendem a se beneficiar de ambientes com diferentes graus de fragmentação (Steinicke et al., 2015; Catenazzi, 2015), em alguns casos a variedade de habitats existentes em áreas agrícolas, pode fornecer diferentes tipos de sítios reprodutivos e reduzir a competição intra e interespecífica por recursos alimentares, o que

pode gerar uma melhora nos índices corporais de anuros ali viventes (Guillot et al., 2016; Li et al., 2019; 2020).

É importante considerar que compensações imunológicas e reprodutivas não são obrigatórias e sim facultativas, sendo principalmente adaptadas de acordo com as necessidades e condições de recursos do animal (French et al., 2007). Desta maneira, se o indivíduo apresenta uma boa condição corporal, é possível que haja um equilíbrio entre as respostas reprodutivas e imunes, ainda que em situações de estresse seria viável manter uma resposta dinâmica, desses dois sistemas (Roznik et al., 2015; Schoenle et al., 2018; Madelaire et al., 2019; Cassettari et al., 2022).

4.2 Imunidade e reprodução: relação entre os sistemas e como respondem a antropização

Em nossos dados evidenciamos que animais viventes em ambientes antropizados tendem a apresentar um quadro de imunomodulação sistêmica e uma atividade reprodutiva maior. Como as respostas imunes e reprodutivas são bastante dispendiosas energeticamente (Sheldon e Verhulst, 1996; Emerson e Hess, 2001; Gomes et al., 2022), esperava-se que quando um sistema estivesse em maior atividade, o outro respondesse inversamente, fato este que não foi constatado em nossos dados, além de não encontramos correlações entre os marcadores. No que diz respeito à relação entre esses dois sistemas, existem trabalhos traçando um efeito da testosterona atuando na modulação das respostas. Durante a estação reprodutiva a taxa desse hormônio é alta nos anuros, podendo atuar de maneira imunoestimulatória (Desprat et al., 2015; Titon et al., 2018; Gomes et al., 2022). Por exemplo, quando os machos estão engajados na atividade reprodutiva, e com altas taxas de esteroides, apresentam também maior número de leucócitos circulantes e uma resposta mais forte ao desafio imunológico, indicando uma imunidade mediada por células mais forte (Madelair et al., 2017; Cassettari et al., 2022), Desprat et al. (2015) relatam também uma maior resposta inflamatória em animais expostos a testosterona exógena.

Por viverem em diferentes habitats antropizados, os anuros encontram-se expostos a inúmeras fontes de exposição de compostos desreguladores

endócrinos (Slaby et al., 2019). Em ambientes agrícolas, onde há muitos sítios de reprodução (Li et al., 2019; 2020; Trudeau et al., 2020; Suárez et al., 2021), a aplicação de agrotóxicos coincidem com a estação reprodutiva, sendo que muitos desses compostos apresentam ação estrogênica, androgênica, antiandrogênica e progestogênica, que podem interferir nos esteroides sexuais ligados a diferenciação gonadal (Mackenzie et al., 2003; Slaby et al., 2019; Trudeau et al., 2020; Yang et al., 2021), bem como interferir nas respostas imunes desses animais (Christin et al., 2003; 2013; Brodtkin et al., 2007; Shutler e Marcogliese, 2011).

Uma das estratégias adotadas pelos organismos, quando em desafios muito intensos de forma que seja quase improvável se reproduzir futuramente, boa parte de seu investimento se direciona para um último evento reprodutivo, conhecido como “hipótese de investimento terminal” (Brannelly et al., 2016). A exemplo, sapos infectados pelo fungo Bd (*Batrachochytrium dendrobatidis*), apresentam uma maior probabilidade de exibir comportamentos reprodutivos, bem como uma maior proporção de espermatócitos e feixe de espermatozoides, sugerindo um maior esforço reprodutivo (Chatfield et al., 2013; Roznik et al., 2015; Brannelly et al., 2016). A ação antrópica e seus poluentes podem ser um ativador dessa resposta, quando o tempo de vida é reduzido por estar inseridos ambientes antropizados – como áreas agrícolas –, pode haver esse investimento na reprodução para a manutenção da espécie (Zamora-Camacho e Comas, 2017), como é observado em fêmea de anuros presentes em ambientes com contaminação de metais pesados, que priorizam a reprodução ao invés de investir em saúde e sobrevivência (Zhang et al., 2018).

Como já mencionado, a resposta de ambos os sistemas também pode variar entre as espécies, ainda que esses ambientes antrópicos exerçam essa pressão aos anuros, espécies generalistas se munem de adaptações que beneficiam sua permanência nesses cenários (Catenazzi, 2015; Pyron, 2018). Essas estas espécies se ajustam de maneiras mais eficientes a condições estressantes, mantendo níveis de cortisol (hormônio do estresse) mais baixos, exibindo também uma maior imunocompetência (Gomes et al., 2012; Assis et al., 2019; Garcia Neto et al., 2020), e mesmo vivendo em ambientes com diferentes tipos de poluição (como áreas industriais ou contaminadas com

metais pesados), conseguem se reproduzir sem dificuldades (Guo et al., 2018; Santana et al., 2021).

É importante ressaltar que por um lado ainda que essas espécies tendam a se expandir e beneficiar nesses ambientes antropizados, por outro, o aumento das espécies generalistas gera um impacto no valor de conservação ambiental, além de uma perda geral na riqueza (Thompson et al., 2016; Cordier et al., 2021; Saccol et al., 2022), reforçando ainda mais a importância da manutenção de habitats naturais como unidades de conservação para a preservação da anurofauna (Oliveira et al., 2019; Saccol et al., 2022).

CONCLUSÃO

Ainda que tenhamos identificado que os animais vivos em ambientes antropizados apresentem atividade imunológica e reprodutiva aumentada, não foi possível estabelecer uma relação consistente entre esses dois sistemas. Entretanto, salientamos a importância dos índices de condição corporal não somente como um indicador eficiente, mas como uma característica importante sobre a saúde desses animais, já que animais com ICC maiores podem manter a resposta desses sistemas sem que haja uma demanda conflitante. Concluímos também, que as espécies classificadas como generalistas, podem se beneficiar desses ambientes antropizados, exibindo uma resposta imune e reprodutiva eficientes, mesmo nesses ambientes modificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assis, V. R., Titon, S. C. M., & Gomes, F. R. (2019). Acute stress, steroid plasma levels, and innate immunity in Brazilian toads. *General and comparative endocrinology*, 273, 86-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.008>

Awkerman, J., Raimondo, S., Schmolke, A., Galic, N., Rueda-Cediel, P., Kapo, K., ... & Forbes, V. (2020). Guidance for developing amphibian population models for ecological risk assessment. *Integrated environmental assessment and management*, 16(2), 223-233. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.4215>

Brannelly, L. A., Webb, R., Skerratt, L. F., & Berger, L. (2016). Amphibians with infectious disease increase their reproductive effort: evidence for the terminal investment hypothesis. *Open Biology*, 6(6), 150251. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.150251>

Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., Zaccagnini, M. E. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1370-1380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>

Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Candioti, J. V., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., Bahl, M. F. (2020). Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. *Ecological Indicators*, 112, 106098. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106098>

Brodtkin, 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: An International Journal*, 26(1), 80-84. DOI: <https://doi.org/10.1897/05-469.1>

Carr, J. A. (2011). Stress and reproduction in amphibians. *Hormones and reproduction of vertebrates*, 99-116. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10006-9>

Cassettari, B. O., Madelaire, C. B., & Gomes, F. R. (2022). Elevated corticosterone levels are associated with increased immunocompetence in male toads, both when calling and under experimental conditions. *Hormones and behavior*, 137, 105083. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105083>

Catenazzi, A. (2015). State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*, 40(1), 91-119. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

Chatfield, M. W., Brannelly, L. A., Robak, M. J., Freeborn, L., Lailvaux, S. P., & Richards-Zawacki, C. L. (2013). Fitness consequences of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *EcoHealth*, 10(1), 90-98. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0833-7>

Christin, M. S., Gendron, A. D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D. J., Cyr, D., ... & Fournier, M. (2003). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(5), 1127-1133. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620220522>

Christin, M. S., Ménard, L., Giroux, I., Marcogliese, D. J., Ruby, S., Cyr, D., ... & Brousseau, P. (2013). Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 601-611. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1160-1>

Cordier, J. M., Aguilar, R., Lescano, J. N., Leynaud, G. C., Bonino, A., Miloch, D., ... & Nori, J. (2021). A global assessment of amphibian and reptile

responses to land-use changes. *Biological conservation*, 253, 108863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108863>

Da Silva, A. P. A., de Oliveira, C. D. L., Quirino, A. M. S., da Silva, F. D. M., de Aquino Saraiva, R., & Silva-Cavalcanti, J. S. (2018). Endocrine disruptors in aquatic environment: effects and consequences on the biodiversity of fish and amphibian species. *Aquatic Science and Technology*, 6(1), 35-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.5296/ast.v6i1.12565>

Demas, G. E. (2004). The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Hormones and behavior (Print)*, 45(3), 173-180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.11.002>

Desprat, J. L., Lengagne, T., Dumet, A., Desouhant, E., Mondy, N. (2015). Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity?. *Behavioral Ecology*, 26(4), 1138-1146. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arv057>

Emerson, S. B., & Hess, D. L. (2001). Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. *Hormones and behavior*, 39(1), 59-69. DOI: <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1635>

Esbaugh, A. J., Khursigara, A., & Johansen, J. (2018). Toxicity in Aquatic Environments: The Cocktail Effect. In *Development and Environment* (pp. 203-234). Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75935-7_9

French, S. S., DeNardo, D. F., & Moore, M. C. (2007). Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction?. *The American Naturalist*, 170(1), 79-89. DOI: <https://doi.org/10.1086/518569>

Garcia Neto, P. G., Nowakowski, A. J., da Silva, A. F. C., Oliveira, O. C. C., Guerra, R. N. M., & de Andrade, G. V. (2020). Leukocyte profiles of two Neotropical anuran species affected by anthropogenic habitat alteration. *Animal Conservation*, 23(5), 524-532. DOI: <https://doi.org/10.1111/acv.12564>

Gomes, F. R., Oliveira, R. V., de Assis, V. R., Junior, B. T., Moretti, E. H., & Mendonça, M. T. (2012). Interspecific variation in innate immune defenses and stress response of toads from Botucatu (São Paulo, Brazil). *South American Journal of Herpetology*, 7(1), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.2994/057.007.0101>

Gomes, F. R., Madelaire, C. B., Moretti, E. H., Titon, S. C. M., & Assis, V. R. (2022). Immunoendocrinology and Ecoimmunology in Brazilian Anurans. *Integrative and Comparative Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icac014>

Guillot, H., Boissinot, A., Angelier, F., Lourdais, O., Bonnet, X., Brischoux, F. (2016). Landscape influences the morphology of male common toads (*Bufo*

bufo). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 106-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.032>

Guo, R., Zhang, W., Yang, Y., Ding, J., Ai, S., Yang, W., ... & Zhang, Y. (2018). Sperm morphology and motility of *Bufo raddei* under long-term environmental heavy metal stress. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101(3), 305-313. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2408-3>

Hayes, T. B., Falso, P., Gallipeau, S., & Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 921-933. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>

Iglesias-Carrasco, M., Head, M. L., Jennions, M. D., & Cabido, C. (2016). Condition-dependent trade-offs between sexual traits, body condition and immunity: the effect of novel habitats. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0706-0>

Kindermann, C., Narayan, E. J., Hero, J. M. (2017). Does physiological response to disease incur cost to reproductive ecology in a sexually dichromatic amphibian species?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 203, 220-226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.019>

Leary, C. J., Lippincott, J., Harris, S., & Hawkins, D. L. (2015). A test of the Energetics-Hormone Vocalization model in the green treefrog. *General and Comparative Endocrinology*, 213, 32-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.017>

Li, B., Zhang, W., Wang, T., Zhou, L. (2019). Breeding habitat influences abundance and body condition of rice frog (*Fejervarya multistriata*) in agricultural landscape of Shanghai, China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 279, 74-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.003>

Li, B., Zhang, W., Wang, Z., Xie, H., Yuan, X., Pei, E., Wang, T. (2020). Effects of landscape heterogeneity and breeding habitat diversity on rice frog abundance and body condition in agricultural landscapes of Yangtze River Delta, China. *Current zoology*, 66(6), 615-623. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zoaa025>

Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?. *Oikos*, 88(1), 87-98. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x>

Mackenzie, C. A., Berrill, M., Metcalfe, C., & Pauli, B. D. (2003). Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2466-2475. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-173>

Madelaire, C. B., Gomes, F. R. (2016). Breeding under unpredictable conditions: annual variation in gonadal maturation, energetic reserves and plasma levels of androgens and corticosterone in anurans from the Brazilian semi-arid. *General and Comparative Endocrinology*, 228, 9-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.011>

Madelaire, C. B., Sokolova, I., Gomes, F. R. (2017). Seasonal patterns of variation in steroid plasma levels and immune parameters in anurans from Brazilian semiarid area. *Physiological and Biochemical Zoology*, 90(4), 415-433. DOI: <https://doi.org/10.1086/691202>

Madelaire, C. B., de Oliveira Cassettari, B., & Gomes, F. R. (2019). Immunomodulation by testosterone and corticosterone in toads: Experimental evidences from transdermal application. *General and Comparative Endocrinology*, 273, 227-235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.005>

Matías-Ferrer, N., & Escalante, P. (2015). Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico. *The Herpetological Journal*, 25(3), 169-176.

McCallum, M. L., & Trauth, S. E. (2007). Physiological trade-offs between immunity and reproduction in the northern cricket frog (*Acris crepitans*). *Herpetologica*, 63(3), 269-274. DOI: [https://doi.org/10.1655/0018-0831\(2007\)63\[269:PTBIAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0018-0831(2007)63[269:PTBIAR]2.0.CO;2)

Oliveira, S. R., Lima-Ribeiro, M. S., de Souza, A. O., dos Santos, C. E., Silva, K. V., Zortea, M., ... & Morais, A. R. (2019). Are protected areas effective in preserving anurans and promoting biodiversity discoveries in the Brazilian Cerrado?. *Journal for Nature Conservation*, 52, 125734. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2019.125734>

Pyron, R. A. (2018). Global amphibian declines have winners and losers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), 3739-3741. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803477115>

Roznik, E. A., Sapsford, S. J., Pike, D. A., Schwarzkopf, L., & Alford, R. A. (2015). Condition-dependent reproductive effort in frogs infected by a widespread pathogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1810), 20150694. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0694>

Saccol, S.S.A, Ucha, J.L.C.D., Madalozzo, B., Cechin, S.Z., & Santos, T.G. (2022). Influence of land use on the diversity of pond-breeding anurans in South Brazilian grasslands. *Biodiversity and Conservation*, 31(1), 21-37. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02317-1>

Santana, E., Schiesari, L., Gomes, F., & Martins, M. (2021). Morphophysiological traits of an amphibian exposed to historical industrial

pollution in a Brazilian biodiversity hotspot. *Amphibia-Reptilia*, 42(3), 283-295. DOI: 10.1163/15685381-bja10050

Schoenle, L. A., Downs, C. J., & Martin, L. B. (2018). An introduction to ecoimmunology. In *Advances in comparative immunology* (pp. 901-932). Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_26

Segner, H., Verburg-van Kemenade, B. L., Chadzinska, M. (2017). The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: Proximate mechanism for reproduction-immune trade offs?. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 43-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.004>

Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in ecology & evolution*, 11(8), 317-321. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2)

Shutler, D., & Marcogliese, D. J. (2011). Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia*, 2011(2), 301-307. DOI: <https://doi.org/10.1643/CP-10-065>

Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., & Lemiere, S. (2019). Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature?. *Environmental Pollution*, 248, 478-495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>

Steinicke, H., Gruber, B., Grimm, A., Grosse, W. R., Henle, K. (2015). Morphological shifts in populations of generalist and specialist amphibians in response to fragmentation of the Brazilian Atlantic forest. *Nature Conservation*, 13, 47-59. DOI: 10.3897/natureconservation.13.7428

Suárez, R. P., Goijman, A. P., Cappelletti, S., Solari, L. M., Cristos, D., Rojas, D., ... & Gavier-Pizarro, G. I. (2021). Combined effects of agrochemical contamination and forest loss on anuran diversity in agroecosystems of east-central Argentina. *Science of The Total Environment*, 759, 143435. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143435>

Thompson, M. E., Nowakowski, A. J., & Donnelly, M. A. (2016). The importance of defining focal assemblages when evaluating amphibian and reptile responses to land use. *Conservation Biology*, 30(2), 249-258. DOI: <https://doi.org/10.1111/cobi.12637>

Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Babajide, O. O., & Petrik, L. F. (2016). Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental chemistry letters*, 14(1), 27-49. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>

Titon, S. C. M., Titon Junior, B., Assis, V. R., Kinker, G. S., Fernandes, P. A. C. M., & Gomes, F. R. (2018). Interplay among steroids, body condition and immunity in response to long-term captivity in toads. *Scientific reports*, 8(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35495-0>

Titon Junior, B., Titon, S. C. M., Assis, V. R., Barsotti, A. M. G., Vasconcelos-Teixeira, R., Fernandes, P. A. C. M., Gomes, F. R. (2021). LPS-induced immunomodulation and hormonal variation over time in toads. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 335(6), 541-551. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.2474>

Trudeau, V. L., Thomson, P., Zhang, W. S., Reynaud, S., Navarro-Martin, L., & Langlois, V. S. (2020). Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Molecular and cellular endocrinology*, 513, 110861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>

Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 248, 109103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>

Zamora-Camacho, F. J., & Comas, M. (2017). Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. *PeerJ*, 5, e3791. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3791>

Zhang, W., Guo, R., Ai, S., Yang, Y., Ding, J., & Zhang, Y. (2018). Long-term heavy metal pollution varied female reproduction investment in free-living anura, *Bufo raddei*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 159, 136-142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.001>

PRANCHA DE FIGURAS

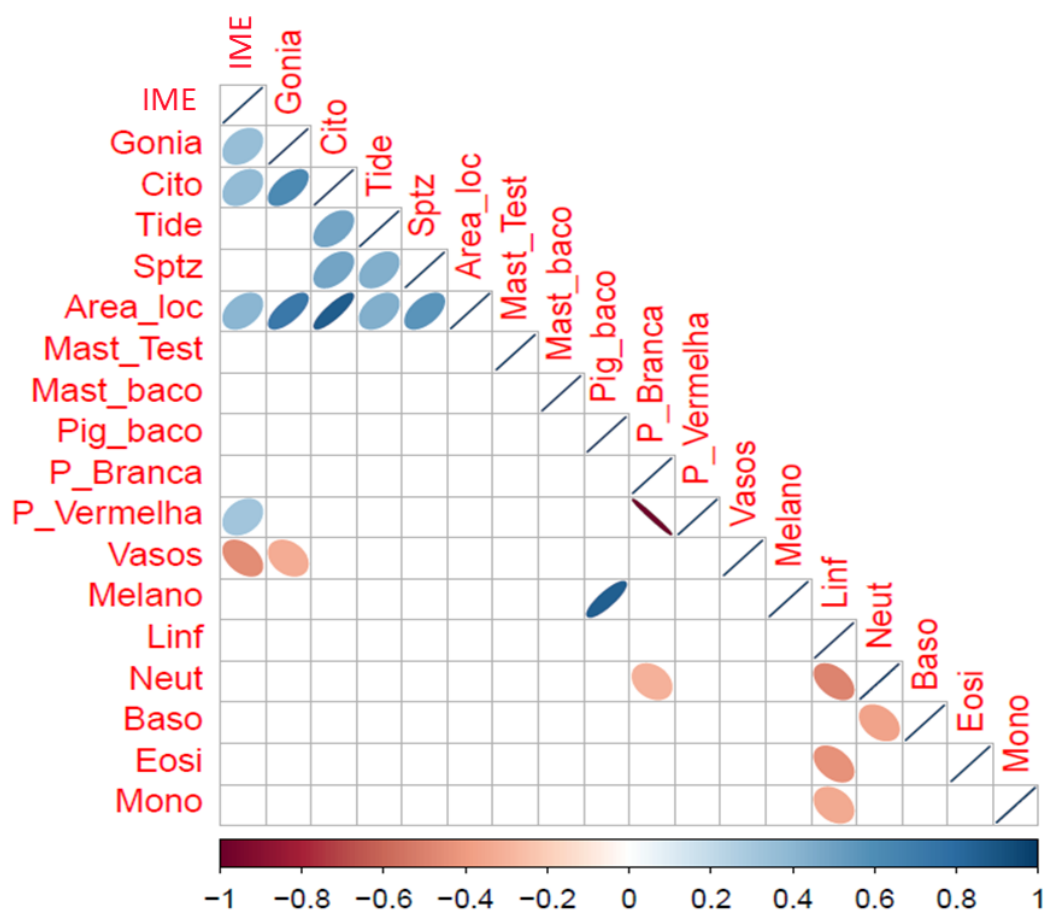


Figura 1: Correlograma dos marcadores imunes e reprodutivos. **IME**- Índice de massa escalonar; **Gonia** – espermatogônia; **Cito** – espermatócito; **Sptz** - espermatozoide; Tide– espermátide; **Mast_Test**– mastócito testicular; **Mast_baco**- mastócito no baço; **Pig_Baco**- pigmentação no baço; **P_Branca**– Polpa Branca; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Vasos**– vasos sanguíneos; **Melano**– melanócitos; **Linf** – linfócito; **Neut**– neutrófilos; **Baso**– Basófilos; **Eosi**– Eosinófilos; **Mono**– Monócitos.

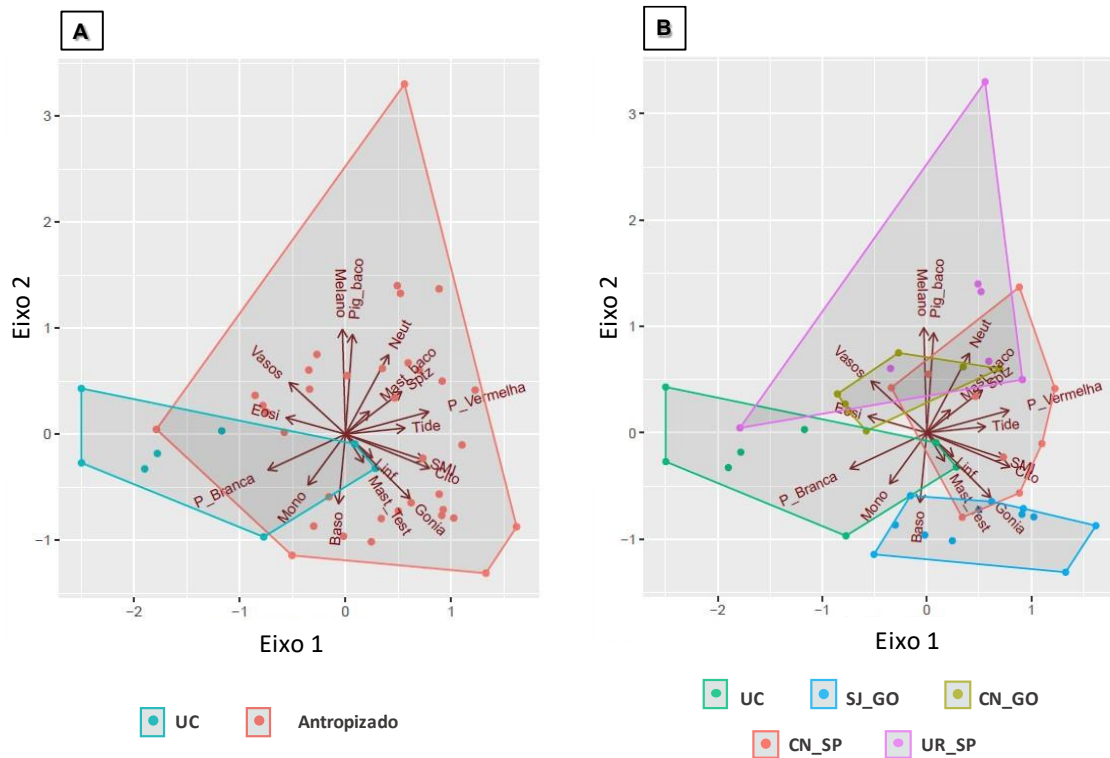


Figura 2: Análise dos componentes principais com dados agrupados em **A**, e separados em **B**. **Vetores:** **SMI**- Índice de massa escalonar; **Gonio** – espermatogônia; **Cito** – espermatócito; **Tide**– espermátide; **Sptz** - espermatozoide; **Mast_Test**– mastócito testicular; **Mast_baco**- mastócito no baço; **Pig_Baco**- pigmentação no baço; **P_Branca**– Polpa Branca; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Vasos**– vasos sanguíneos; **Melano**– melanócitos; **Linf** – linfócito; **Neut**– neutrófilos; **Baso**– Basófilos; **Eosi**– Eosinófilos; **Mono**– Monócitos. **Grupos:** **UC** – Unidade de conservação; **SJ_GO** – Soja_GO; **CN_GO**- Cana_GO; **CN_SP**- Cana_SP; **UR_SP**- Urbano_SP.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em caráter imunológico, os animais viventes em ambientes antropizados evidenciaram um quadro de imunomodulação sistêmica, gerando alterações em diferentes componentes (como a estrutura esplênica e perfil leucocitário) o que pode comprometer a eficiência da defesa frente a agentes estressores.

Quanto à reprodução, ficou evidente o efeito da antropização na atividade reprodutiva refletido nas proporções das células germinativas. O quadro geral evidencia que os animais apresentaram maior atividade nesses ambientes, contudo a pressão exercida não é uniforme quando se atenta aos cenários isolados. Desta forma, essas respostas podem configurar mais uma adaptação de espécies generalistas a novos ambientes, que respondem de maneira plástica a essas condições.

Mesmo que não tenhamos encontrado relações diretas entre os sistemas, nossos dados apontam para uma resposta imune ativa e um aumento reprodutivos e bons índices corporais dessa espécie. Em alguns casos, animais podem exibir melhores desempenhos reprodutivos quando sua longevidade se encontra diminuída por agentes externos, alocando recursos para um último evento reprodutivo (o que pode ser associado às correlações do IME com parâmetros reprodutivos). É plausível supor que quando os animais apresentam boas condições corporais, eles conseguem manter uma resposta imune atuante e um bom desempenho reprodutivo, o que capacita ainda mais as espécies generalistas a perpetuarem em ambientes antrópicos.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MAJEED, H. Studies on haemopoiesis and histological aspects of *Rana ridibunda* spleen. **Kufa Medical Journal**, v. 11, n. 2, p. 61-66, 2008.

ACAYABA, R. D. A.; DE ALBUQUERQUE, A. F.; RIBESSI, R. L.; UMBUZEIRO, G. D. A.; MONTAGNER, C. C. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 9824-9835, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11428-1>

ADAMS, E.; LEEB, C.; BRÜHL, C. A. Pesticide exposure affects reproductive capacity of common toads (*Bufo bufo*) in a viticultural landscape. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 2, p. 213-223, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02335-9>

AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of fish biology**, v. 24, n. 4, p. 471-488, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of fish diseases**, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

AKAT, E. Histological characteristics of the pancreas and spleen of *Pelophylaxbedriagae* (Anura: Ranidae). **Biharean Biologist**, v. 12, n. 2, p. 102-105, 2018.

ALVAREZ, R. An ultrastructural study of the spleen of the ranid frog *Rana perezii*. **Journal of Morphology**, v. 204, p. 25-32, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmor.1052040104>

AmphibiaWeb, 2022. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/> Acessado em: 16 de dezembro de 2022.

ASSIS, R. A.; REZENDE, W. R.; DOS SANTOS, C. G. A.; BENVINDO-SOUZA, M.; AMORIM, N. P. L.; BORGES, R. E.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C.; SANTOS, L. R. S. Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 60741-60752, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14974-4>

ASSIS, V. R.; TITON, S. C. M.; GOMES, F. R. Acute stress, steroid plasma levels, and innate immunity in Brazilian toads. **General and comparative endocrinology**, v. 273, p. 86-97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.008>

ASSIS, V. R.; TITON, S. C. M.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G. T.; MASSOCO, C. O.; GOMES, F. R. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 327, n. 4, p. 200-213, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.2093>

ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; JUNGES, C. M.; BASSO, A. Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. **Environmental Monitoring and**

Assessment, v. 186, p. 635-649, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3404-Z>

AWKERMANN, J.; RAIMONDO, S.; SCHMOLKE, A.; GALIC, N.; RUEDA-CEDIEL, P.; KAPO, K.; ACCOLLA, C.; VAUGEOIS, M.; FORBES, V. Guidance for developing amphibian population models for ecological risk assessment. **Integrated environmental assessment and management**, v. 16, n. 2, p. 223-233, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.4215>

BACCARI, G. C.; PINELLI, C.; SANTILLO, A.; MINUCCI, S.; RASTOGI, R. K. Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 290, p. 1-53, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386037-8.00006-5>

BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana snkesculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 45-54, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>

BECKMANN, M.; GERSTNER, K.; AKIN-FAJIYE, M.; CEAUȘU, S.; KAMBACH, S.; KINLOCK, N. L.; PHILLIPS, H. R. P.; VERHAGEN, W.; GUREVITCH, J.; KLOTZ, S.; NEWBOLD, T.; VERBURG, P. H.; WINTER, M.; SEPPELT, R. Conventional land-use intensification reduces species richness and increases production: a global meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 25, n. 6, p. 1941-1956, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.14606>

BISWAS, N. M.; CHAKRABORTY, J.; CHANDA, S.; SANYAL, S. Effect of continuous light and darkness on the testicular histology of toad (*Bufo melanostictus*). **Endocrinologia Japonica**, v. 25, n. 2, p. 177-180, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.25.177>

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, p. 60-71, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08010060.x>

BLAUSTEIN, A. R.; HAN, B. A.; RELYEA, R. A.; JOHNSON, P. T. J.; BUCK, J. C.; GERVASI, S. S.; KATS, L. B. 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, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x>

BÖGI, C.; SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; STEINECK, C.; SINOWATZ, F.; KALBFUS, W.; NEGELE, R. D.; LUTZ, I.; KLOAS, W. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. **Environmental Research**, v. 93, n. 2, p. 195-201, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00082-3)

BÓKONY, V.; ÜVEGES, B.; UJHEGYI, N.; VEREBÉLYI, V.; NEMESHÁZI, E.; CSÍKVÁRI, O.; HETTYEY, A. Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1335-1345, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.363>

BORDIN, R. O.; FERNANDES, C. E. D. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; LEÃO, T. R. F.; SANABRIA, M. Sperm morphology and testicular histology of the polyandric species *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from an urban environment. **The Anatomical Record**, v. 305, n. 12, p. 3532-3542, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.24928>

BORGES, R. E.; SANTOS, L. R. D. S.; BENVINDO-SOUZA, M.; MODESTO, R. S.; ASSIS, R. A.; DE OLIVEIRA, C. Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the Central Cerrado, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 22-28, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>

BOSCH, J.; ELVIRA, S.; SAUSOR, C.; BIELBY, J.; GONZALEZ-FERNANDEZ, I.; ALONSO, R.; BERMEJO-BERMEJO, V. Increased tropospheric ozone levels enhance pathogen infection levels of amphibians. **Science of the Total Environment**, v. 759, 143461, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143461>

BRANNELLY, L. A.; WEBB, R.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L. Amphibians with infectious disease increase their reproductive effort: evidence for the terminal investment hypothesis. **Open Biology**, v. 6, n. 6, 150251, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.150251>

BRODEUR, J. C.; SUAREZ, R. P.; NATALE, G. S.; RONCO, A. E.; ZACCAGNINI, M. E. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1370-1380, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>

BRODEUR, J. C.; DAMONTE, M. J.; CANDIOTI, J. V.; POLISERPI, M. B.; D'ANDREA, M. F.; BAHL, M. F. Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. **Ecological Indicators**, v. 112, 106098, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106098>

BRODKIN, M. A.; MADHOUN, H.; RAMESWARAN, M.; VATNICK, I. Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 26, n. 1, p. 80-84, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1897/05-469.1>

BRÜHL, C. A.; PIEPER, S.; WEBER, B. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2465-2472, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.650>

BUCK, J. C.; HUA, J.; BROGAN, W. R.; URBINA, J.; BENDIS, R. J.; STOLER, A. B.; BLAUSTEIN, A. R.; RELYEA, R. A. Effects of Pesticides Mixtures on Host-Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2015.

BUKOWSKA, B.; MOKRA, K.; MICHAŁOWICZ, J. Benzo[a]pyrene – environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, 6348, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116348>

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; STRINGHINI, G.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; PELTZER, P. M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fé Province, Argentina. **Applied Herpetology**, v. 2, p. 373-380, 2005.

CAMPBELL, T. W. Hematology of Amphibians. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. John Wiley & Sons, 2012.

ÇAKICI, Ö. Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of Levantine frog, *Pelophylaxbedriagae* (Anura: Ranidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 96-101, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1010-y>

ÇAKICI, Ö. Toxic effects of carbaryl on the histology of testes of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). **Acta Herpetologica**, v. 10, n. 1, p. 23-29, 2015. DOI: https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14780

ÇAKICI, Ö. Histopathological analysis of carbaryl-induced toxicity in the spleen of Levantine frog, *Pelophylaxbedriagae*(Anura: Ranidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 25, p. 24917-24922, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2538-5>

CAMPBELL, D. E.; MONTGOMERIE, R. D.; LANGLOIS, V. S. Lifecycle exposure to perchlorate differentially alters morphology, biochemistry, and transcription as well as sperm motility in *Silurana tropicalis* frogs. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 196-204, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.038>

CAMPBELL GRANT, E. H.; MILLER, D. A.; MUTHS, E. A synthesis of evidence of drivers of amphibian declines. **Herpetologica**, v. 76, n. 2, p. 101-107, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.101>

CANTARELLA, H.; ROSSETTO, R. Fertilizantes para a cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar. P&D para produtividade e sustentabilidade**, Blucher, 2010. p. 405–422.

CARR, J. A. Stress and reproduction in amphibians. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**, p. 99-116, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10006-9>

CASSETTARI, B. O.; MADELAIRE, C. B.; GOMES, F. R. Elevated corticosterone levels are associated with increased immunocompetence in male toads, both when calling and under experimental conditions. **Hormones and Behavior**, v. 137, 105083, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105083>

CATENAZZI, A. State of the world's amphibians. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, n. 1, p. 91-119, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

CHANG, H. S.; CHOO, K. H.; LEE, B.; CHOI, S. J. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p.1-12, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.135>

CHATFIELD, M. W.; BRANNELLY, L. A.; ROBAK, M. J.; FREEBORN, L.; LAILVAUX, S. P.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Fitness consequences of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). **EcoHealth**, v. 10, n. 1, p. 90-98, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0833-7>

CHAVES, M.J. S.; BARBOSA, S. C.; PRIMEL, E. G.. Emerging contaminants in Brazilian aquatic environment: identifying targets of potential concern based on occurrence and ecological risk. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 67528-67543, 2021. DOI: [DOI: https://doi.org/10.1007/s11356-021-15245-y](https://doi.org/10.1007/s11356-021-15245-y)

CHIEFFI-BACCARI, G.; DE PAULIS, A.; DI MATTEO, L.; GENTILE, M.; MARONE, G.; MINUCCI, S. In situ characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta*. **Cell and tissue research**, v. 292, n. 1, p. 151-162, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004410051045>

CHIEFFI-BACCARI, G.; PINELLI, C.; SANTILLO, A.; MINUCCI, S.; RASTOGI, R. K. Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. **International review of cell and molecular biology**, v. 290, p. 1-53, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386037-8.00006-5>

CHRISTIN, M. S.; GENDRON, A. D.; BROUSSEAU, P.; MÉNARD, L.; MARCOGLIESE, D. J.; CYR, D.; RUBY, S.; FOURNIER, M. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1127-1133, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620220522>

CHRISTIN, M. S.; MENARD, L.; GENDRON, A. D.; RUBY, S.; CYR, D.; MARCOGLIESE, D. J.; ROLLINS-SMITH, L.; FOURNIER, M. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n.1, p. 33-43, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007>

CHRISTIN, M. S.; MÉNARD, L.; GIROUX, I.; MARCOGLIESE, D. J.; RUBY, S.; CYR, D.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P. Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 601-611, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1160-1>

CLAY, J. World agriculture and the environment: a commodity- by-commodity guide to impacts and practices. Washington, DC: Island Press, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 9, n. 9, 2022a. Disponível em: <https://www.conab.gov.br> Acessado em: 28 de janeiro de 2023.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 9, n. 3, 2022b. Disponível em: <https://www.conab.gov.br> Acessado em: 29 de janeiro de 2023.

CORDIER, J. M.; AGUILAR, R.; LESCANO, J. N.; LEYNAUD, G. C.; BONINO, A.; MILOCH, D.; LOYOLA, R.; NORI, J. A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. **Biological Conservation**, v. 253, 108863, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108863>

CUNHA, N. R. S; LIMA, J. E. GOMES, M. F. M.; BRAGA, M. J. A Intensidade da Exploração Agropecuária como Indicador da Degradação Ambiental na Região dos Cerrados, Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 2, p. 291-323, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-20032008000200002>

CURI, L. M.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, M. A.; LAJMANOVICH, R. C. Alterations in Gonads and Liver Tissue in Two Neotropical Anuran Species Commonly Occurring in Rice Fields Crops. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 5, p. 1-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05164-6>

DA SILVA, A. P. A.; DE OLIVEIRA, C. D. L.; QUIRINO, A. M. S.; DA SILVA, F. D. M.; DE AQUINO SARAIVA, R.; SILVA-CAVALCANTI, J. S. Endocrine disruptors in aquatic environment: effects and consequences on the biodiversity of fish and amphibian species. **Aquatic Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 35-51, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5296/ast.v6i1.12565>

DA SILVA, P. S.; GIROL, A. P.; OLIANI, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Molecular vision**, v. 17, p. 1310-1319, 2011.

DAUTREMEPUITS, C.; ROBERT, J.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; SALO, H. Immunotoxicology of amphibians, **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 297-309, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1163/1570754054507451>

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. **International Journal of Zoology**, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/735937>

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional ecology**, v. 22, n. 5, p. 760-772, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>

DAVIS, D. R.; FERGUSON, K. J.; SCHWARZ, M. S.; KERBY, J. L. Effects of Agricultural Pollutants on Stress Hormones and Viral Infection in Larval Salamanders. **Wetlands**, v. 40, p. 577-586, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01207-1>

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. Melanic pigmentation in ectothermic vertebrates: occurrence and function. In: MA, X. P.; SUN, X. X. **Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects**. Hauppauge: Nova Science Publisher, 2012. p. 213-225.

DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; SANTOS, L. R. S. 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 terrestrial models**, The Royal Society of Chemistry, 2017. p. 123-142.

DE OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura Hylidae). **Biociências**, v. 6, n. 1, p. 79-88, 1998.

DE OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A.; TABOGA, S. R. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 75-83, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589310>

DE OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia Anura). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 20, n. 3, p. 263-268, 2002. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-98682002000300005>

DEFRIES, R. S.; FOLEY, J. A.; ASNER, G. P. Land-use choices: Balancing human needs and ecosystem function. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 5, p. 249-257, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0249:LCBHNA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0249:LCBHNA]2.0.CO;2)

DELGADO-ACEVEDO, J.; RESTREPO, C. The contribution of habitat loss to changes in body size, allometry, and bilateral asymmetry in two Eleutherodactylus frogs from Puerto Rico. **Conservation Biology**, v. 22, n. 3, p. 773-782, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00930.x>

DEMAS, G. E. The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. **Hormones and behavior**, v. 45, n. 3, p. 173-180, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.11.002>

DESPRAT, J. L., LENGAGNE, T., DUMET, A., DESOUHANT, E., MONDY, N. Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity? **Behavioral Ecology**, v. 26, n. 4, p. 1138-1146, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arv057>

DING, G. H.; TANG, Y.; LIN, Z. H.; FAN, X. L.; WEI, L. Mating pattern, female reproduction and sexual size dimorphism in a narrow-mouthed frog (*Microhylafissipes*). **Animal Biology**, v. 69, n. 2, p. 247-257, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1163/15707563-17000067>

DOHM, M. R.; MAUTZ, W. J.; DORATT, R. E.; STEVENS, J. R. Ozone exposure affects feeding and locomotor behavior of adult *Bufo marinus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1209-1216, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1897/07-388.1>

DU PASQUIER, L.; ROBERT, J.; COURTET, M.; MUBUMANN, R. B-cell development in the amphibian *Xenopus*. **Immunological Reviews**, v. 175, p. 201-213, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2000.imr017501.x>

DU PASQUIER, L.; SCHWAGER, J.; FLAJNIK, M. F. The immune system of *Xenopus*. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 251-275, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001343>

EHRENFELD, J. G. Evaluating wetlands within an urban context. **Urban Ecosystems**, v. 4, p. 69-85, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009543920370>

EMERSON, S. B. Testis size variation in frogs: testing the alternatives. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 41, n. 4, p. 227-235, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002650050383>

EMERSON, S. B.; HESS, D. L. Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. **Hormones and Behavior**, v. 39, n. 1, p. 59-69, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1635>

ESBAUGH, A. J.; KHURSIGARA, A.; JOHANSEN, J. Toxicity in Aquatic Environments: The Cocktail Effect. In: BURGGREN, W.; DUBANSKY, B. **Development and Environment**. Springer, 2018. p. 203-234. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75935-7_9

FALCONE, F. H.; ZILLIKENS, D.; GIBBS, B. F. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity.

Experimental Dermatology, v. 15, n. 11, p. 855-864, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00477.x>

FALSO, P. G.; NOBLE, C. A.; DIAZ, J. M.; HAYES, T. B. The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. **General and Comparative Endocrinology**, v. 212, p. 73-83, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.003>

FAN, X. L.; LIN, Z. H.; JI, X. Male size does not correlate with fertilization success in two bufonid toads that show size-assortative mating. **Current Zoology**, v. 59, n. 6, p. 740-746, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/czoolo/59.6.740>

FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; DE OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>

FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 259-268, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>

FERRANTE, L.; FEARNSIDE, P. M. Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs. **Acta Amazonica**, v. 50, p. 363-366, 2020.

FILOSO, S.; DO CARMO, J. B.; MARDEGAN, S. F.; LINS, S. R. M.; GOMES, T. F.; MARTINELLI, L. A. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1847-1856, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.012>

FOLEY, J. A.; DEFRIES, R.; ASNER, G. P.; BARFORD, C.; BONAN, G.; CARPENTER, S. R.; CHAPIN, F. S.; COE, M. T.; DAILY, G. C.; GIBBS, H. K.; HELKOWSKI, J. H.; HOLLOWAY, T.; HOWARD, E. A.; KUCHARIK, C. J.; MONFREDA, C.; PATZ, J. A.; PRENTICE, I. C.; RAMANKUTTY, N.; SNYDER, P. K. Global consequences of land use. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 570-574, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.111177>

FOURNIER, M.; ROBERT, J.; SALO, H. M.; DAUTREMEPUITS, C.; BROUSSEAU, P. Immunotoxicology of amphibians. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 297-309, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1163/1570754054507451>

FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; DE OLIVEIRA, C. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 292, n. 2, p. 178-182, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.20832>

FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. **Italian Journal of Zoology**, v. 83, n. 3, p. 298-305, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/11250003.2016.1194488>

FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; DE OLIVEIRA, C. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog

tadpoles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, p. 109-117, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>

FRANCO-BELUSSI, L.; JONES-COSTA, M.; SALLA, R. F.; SOUZA, B. F. S.; PINTO-VIDAL, F. A.; OLIVEIRA, C. R.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; ABDALLA, F. C.; DUARTE, I. C. S.; DE OLIVEIRA, C. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzenesulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 266, 129014, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129014>

FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G. B.; FREITAS, J. S.; DE OLIVEIRA, C. Morphological effects of bacterial compoundson testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Animal Biology**, v. 64, n. 3, p. 261-275, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1163/15707563-00002445>

FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D. B.; BORGES, R. E.; OLIVEIRA, C.; SANTOS, L. R. S. Idiosyncratic liver alterations of five frog species to land use changes in the Brazilian Cerrado. **PeerJ**, v. 8, 2020. <https://doi.org/10.1101/837534>

FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D. B.; LEÃO, T. R.; SIQUEIRA, M. S.; VALVERDE, B. S. L.; MARTINS, B. O.; DE OLIVEIRA, C.; FERNANDES, C. E. Hematological parameters of a Neotropical wild frog population, with a phylogenetic perspective on blood cell composition in Anura. **Current Zoology**, v. 68, n. 3, p. 361-369, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zoab059>

FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L. R. S.; ZIERI, R.; DE OLIVEIRA, C. Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): Occurrence and comparison. **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p. 102-110, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2010.12.001>

FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L. R. S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. Visceral pigmentation in three species of the genus *Scinax* (Anura: Hylidae): distinct morphological pattern. **The Anatomical Records**, v. 295, p. 298-306, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.21524>

FRANCO-BELUSSI, L.; SKOLD, H. N.; DE OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 1378-1383, 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.134973>

FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L. R. S.; MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. **The Anatomical Records**, v. 292, p. 178-182, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.20832>

FREERE, R. H.; WEIBEL, E. R. Stereologic techniques in microscopy. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 87, n. 1, p. 25-34, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1967.tb04489.x>

FREITAS, J. S.; GIROTTO, L.; GOULART, B. V.; ALHO, L. D. O. G.; GEBARA, R. C.; MONTAGNER, C. C.; SCHIESARI, L.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>

FRENCH, S. S.; DENARDO, D. F.; MOORE, M. C. Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? **The American Naturalist**, v. 170, n. 1, p. 79-89, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1086/518569>

FUESS, L. T.; ALTOÉ, M. E.; FELIPE, M. C.; GARCIA, M. L. Pros and cons of fertirrigation with in natura sugarcane vinasse: do improvements in soil fertility offset environmental and bioenergy losses? **Journal of Cleaner Production**, v. 319, 128684, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128684>

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29-40, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>

GADGIL, M.; BOSSERT, W. H. Life Historical Consequences of Natural Selection. **The American Naturalist**, v. 104, n. 935, p. 1-28, 1970.

GARCIA NETO, P. G.; NOWAKOWSKI, A. J.; DA SILVA, A. F. C.; OLIVEIRA, O. C. C.; GUERRA, R. N. M.; DE ANDRADE, G. V. Leukocyte profiles of two Neotropical anuran species affected by anthropogenic habitat alteration. **Animal Conservation**, v. 23, n. 5, p. 524-532, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/acv.12564>

GARDNER, S. T.; ASSIS, V. R.; SMITH, K. M.; APPEL, A. G.; MENDONÇA, M. T. Innate immunity of Florida cane toads: how dispersal has affected physiological responses to LPS. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 190, n. 3, p. 317-327, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01272-7>

GLENNEMEIER, K. A.; DENVER, R. J. Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, n. 1, p. 32-40, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1140>

GOLEMAN, W. L.; CARR, J. A.; ANDERSON, T. A. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 590-597, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210318>

GOMES, F. R.; MADELAIRE, C. B.; MORETTI, E. H.; TITON, S. C. M.; ASSIS, V. R. Immunoendocrinology and Ecoimmunology in Brazilian Anurans. **Integrative and Comparative Biology**, v. 62, n. 6, p. 1654-1670, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icac014>

GOMES, F. R.; OLIVEIRA, R. V.; ASSIS, V. R.; JUNIOR, B. T.; MORETTI, E. H.; MENDONÇA, M. T. Interspecific variation in innate immune defenses and stress response of toads from Botucatu (São Paulo, Brazil). **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2994/057.007.0101>

GOSSET, A.; POLOMÉ, P.; PERRODIN, Y. Ecotoxicological risk assessment of micropollutants from treated urban wastewater effluents for watercourses at a territorial scale: application and comparison of two approaches. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 224, 113437, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113437>

GRIMM, N. B.; FAETH, S. H.; GOLUBIEWSKI, N. E.; REDMAN, C. L.; WU, J.; BAI, X.; BRIGGS, J. M. Global change and the ecology of cities. **Science**, v. 319, n. 5864, p. 756-760, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1150195>

GROGAN, L. F.; ROBERT, J.; BERGER, L.; SKERRATT, L. F.; SCHEELE, B. C.; CASTLEY, J. G.; NEWELL, D. A.; MCCALLUM, H. I. Review of the amphibian immune

response to chytridiomycosis, and future directions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2536, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02536>

GUILLOT, H.; BOISSINOT, A.; ANGELIER, F.; LOURDAIS, O.; BONNET, X.; BRISCHOUX, F. Landscape influences the morphology of male common toads (*Bufo bufo*). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 233, p. 106-110, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.032>

GUO, R.; ZHANG, W.; YANG, Y.; DING, J.; AI, S.; YANG, W.; BAI, X.; ZHANG, Y. Sperm morphology and motility of *Bufo raddei* under long-term environmental heavy metal stress. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 3, p. 305-313, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2408-3>

HADDAD, C. F.; PRADO, C. P. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2)

HAMLIN, H. J.; GUILLETTE JR, L. J. Birth defects in wildlife: the role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, n. 2, p. 113-121, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3109/19396360903244598>

HANSEN, A. J.; DEFRIES, R. S.; TURNER, W. Land Use Change and Biodiversity. In: GUTMAN, G.; JANETOS, A. C.; JUSTICE, C. O.; MORAN, E. F.; MUSTARD J. F.; RINDFUSS, R. R.; SKOLE, D.; TURNER, B. L.; COCHRANE, M. A. **Land Change Science**. Dordrecht: Springer, 2012. p. 277-299. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2562-4_16

HANSEN, J. D.; ZAPATA, A. G. Lymphocyte development in fish and amphibians. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 199-220, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01264.x>

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A.; VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 5476-5480, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.082121499>

HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V. P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J.; TSUI, M. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 40-50, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010a. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>

HAYES, T. B.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. 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, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.5932>

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

induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010b. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>

HOFFMANN, F.; KLOAS, W. An environmentally relevant endocrine-disrupting antiandrogen, vinclozolin, affects calling behavior of male *Xenopus laevis*. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 653-659, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.008>

HOFFMANN, F.; KLOAS, W. p, p'-Dichlordiphenyldichloroethylene (p, p'-DDE) can elicit antiandrogenic and estrogenic modes of action in the amphibian *Xenopus laevis*. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 172-178, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.012>

HUA, J.; JONES, D. K.; MATTES, B. M.; COTHRAN, R. D.; RELYEA, R. A.; HOVERMAN, J. T. The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 6, p. 586-596, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.12267>

HUANG, M. Y.; DUAN, R. Y.; JI, X. The influence of long-term cadmium exposure on phonotaxis in male *Pelophylax nigromaculata*. **Chemosphere**, v. 119, p. 763-768, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.014>

HUSSAIN, Q. A.; PANDIT, A. K. Global amphibian declines: a review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 10, p. 348-357, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5897/IJBC12.008>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/> Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2022. Parque Nacional das Emas. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado/lista-de-ucs/parna-das-emas> . Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

IGLESIAS-CARRASCO, M.; HEAD, M. L.; JENNIONS, M. D.; CABIDO, C. Condition-dependent trade-offs between sexual traits, body condition and immunity: the effect of novel habitats. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0706-0>

IGLESIAS-CARRASCO, M.; MARTÍN, J.; CABIDO, C. Urban habitats can affect body size and body condition but not immune response in amphibians. **Urban Ecosystems**, v. 20, n. 6, p. 1331-1338, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11252-017-0685-y>

IMB – Instituto Mauro Borges de estatísticas e estudos socioeconômicos. Goiás em dados 2022. Disponível em: < <https://www.imb.go.gov.br> >. Acessado em: 13 de dezembro de 2022.

IUCN, 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org> . Acessado em: 15 de julho de 2022.

JANIN, A.; LÉNA, J. P.; JOLY, P. Beyond occurrence: body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. **Biological Conservation**, v. 144, n. 3, p. 1008-1016, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.12.009>

JASROTIA, R.; LANGER, S.; DHAR, M. Endocrine Disrupting Chemicals in Aquatic Ecosystem: An Emerging Threat to Wildlife and Human Health. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 74, p. 634–647, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12595-021-00410-5>

JIA, X.; WANG, D.; GAO, N.; CAO, H.; ZHANG, H. Atrazine triggers the extrinsic apoptosis pathway in lymphocytes of the frogs *Phelophylaxnigromaculata* in vivo. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 2010-2018 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00238>

JIANG, R.; LIU, J.; HUANG, B.; WANG, X.; LUAN, T.; YUAN, K. Assessment of the potential ecological risk of residual endocrine-disrupting chemicals from wastewater treatment plants. **Science of The Total Environment**, v. 714, 136689, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136689>

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, n. 1, p. 57-88, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)

KARLSSON, O.; SVANHOLM, S.; ERIKSSON, A.; CHIDIAC, J.; ERIKSSON, J.; JERNERÉN, F.; BERG, C. Pesticide-induced multigenerational effects on amphibian reproduction and metabolism. **Science of the Total Environment**, v. 775, 145771, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145771>

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9900-9904, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.152098899>

KINDERMANN, C.; NARAYAN, E. J.; HERO, J. M. Does physiological response to disease incur cost to reproductive ecology in a sexually dichromatic amphibian species? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 203, p. 220-226, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.019>

KLOAS, W. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. **International Review of Cytology**, v. 216, p. 1-57, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)16002-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)16002-5)

KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. **Journal of Chromatography A**, v. 1130, n. 1, p. 16-27, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.001>

KOLBY, J. E. Amphibia: global amphibian declines caused by an emerging infectious disease and inadequate immune responses. *In*: COOPER, E. L. **Advances in comparative immunology**. Springer, 2018. p. 981-990. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_29

KOLPIN, D. W.; FURLONG, D. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARRER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceutical, hormones, and others organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science &Tecnology**,v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/es011055j>

LARSSON, B. S. Interaction between chemicals and melanin. **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 3, p. 127-133, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x>

LEARY, C. J.; LIPPINCOTT, J.; HARRIS, S.; HAWKINS, D. L. A test of the Energetics-Hormone Vocalization model in the green treefrog. **General and Comparative Endocrinology**, v. 213, p. 32-39, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.017>

LEITE, G. B.; FRANCO-BELUSSI, L.; PROVETE, D. B.; DE OLIVEIRA, C. Comparativetestismorphologyof Neotropical anurans. **Zoologischer Anzeiger**, v. 257, p. 29-38, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.005>

LI, B.; ZHANG, W.; WANG, T.; ZHOU, L. Breeding habitat influences abundance and body condition of rice frog (*Fejervaryamultistriata*) in agricultural landscape of Shanghai, China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 279, p. 74-79, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.003>

LI, B.; ZHANG, W.; WANG, Z.; XIE, H.; YUAN, X.; PEI, E.; WANG, T. Effects of landscape heterogeneity and breeding habitat diversity on rice frog abundance and body condition in agricultural landscapes of Yangtze River Delta, China. **Current Zoology**, v. 66, n. 6, p. 615-623, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zoaa025>

LI, S.; LI, M.; GUI, W.; WANG, Q.; ZHU, G. Disrupting effects of azocyclotin to the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and reproduction of *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 121-128, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.010>

LI, Y.; COHEN, J. M.; ROHR, J. R; Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. **Integrative Zoology**, v. 8, p. 145-161, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12001>

LIAO, W. B.; MI, Z. P.; ZHOU, C. Q.; JIN, L.; HAN, X.; LOU, S. L.; MA, J. Relative testis size and mating systems in anurans: large testis in multiple-male mating in foam-nesting frogs. **Animal Biology**, v. 61, n. 2, p. 225-238, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1163/157075511X570312>

LINZEY, D.; BURROUGHS, J.; HUDSON, L.; MARINI, M.; ROBERTSON, J.; BACON, J.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, n. 2, p. 125-148, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/0960312031000098053>

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.280570302>

LOCHMILLER, R. L.; DEERENBERG, C. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? **Oikos**, v. 88, n. 1, p. 87-98, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x>

LUCAS, E. M.; BRASILEIRO, C. A.; OYAMAGUCHI, H. M.; MARTINS, M. The reproductive ecology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae): new data from natural temporary ponds in the Brazilian Cerrado and a review throughout its distribution. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 35-36, p. 2305-2320, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222930802254698>

LUTTON, B.; CALLARD, I. Evolution of reproductive – immune interactions. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 6, p. 1060-1071, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icl050>

MACCRACKEN, J. G.; STEBBINGS, J. L. Test of a body condition index with amphibians. **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 3, p. 346-350, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1670/10-292>

MACKENZIE, C. A.; BERRILL, M.; METCALFE, C.; PAULI, B. D. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2466-2475, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-173>

MACKINTOSH, T.; DAVIS, J. The importance of urban wetlands. *In*: PAULS, S. **Workbook for managing urban wetlands in Australia**. Sydney Olympic Park Authority. 2013. p. 2-17.

MADELAIRE, C. B.; CASSETTARI, B. O.; GOMES, F. R. Immunomodulation by testosterone and corticosterone in toads: Experimental evidences from transdermal application. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 227-235, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.005>

MADELAIRE, C. B.; GOMES, F. R. Breeding under unpredictable conditions: annual variation in gonadal maturation, energetic reserves and plasma levels of androgens and corticosterone in anurans from the Brazilian semi-arid. **General and Comparative Endocrinology**, v. 228, p. 9-16, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.011>

MADELAIRE, C. B.; SOKOLOVA, I.; GOMES, F. R. Seasonal patterns of variation in steroid plasma levels and immune parameters in anurans from Brazilian semiarid area. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 90, n. 4, p. 415-433, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1086/691202>

MANN, R. M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Relatório Consolidado de Ingredientes Ativos, 2020. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_con. Acessado em: 22 de março de 2023.

MAPBIOMAS – Coleção 7.0 da Série Anual de Mapas de Uso e Cobertura da Terra do Brasil, 2023. Disponível em: <https://plataforma.brasil.mapbiomas.org/>. Acessado em: 28 de janeiro de 2023.

MARAGNO, F. P.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, p. 237-241, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212009000300002>

MARCOGLIESE, D. J.; KING, K. C.; SALO, H. M.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P.; SPEAR, P.; CHAMPOUX, L.; MCLAUGHLIN, J. D.; BOILY, M. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*.

Aquatic Toxicology, v. 91, n. 2, p. 126-134, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.10.001>

MATÍAS-FERRER, N.; ESCALANTE, P. Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, Mexico. **The Herpetological Journal**, v. 25, n. 3, p. 169-176, 2015.

MARTIN, L. B.; HOPKINS, W. A.; MYDLARZ, L. D.; ROHR, J. R. The effects of antropogenic global changes on imune functions and disease resistance. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1195, n. 1, p. 129-148, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05454.x>

MATTHIESSEN, P.; WHEELER, J. R.; WELTJE, L. A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 195-216, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1397099>

MCCALLUM, M. L.; TRAUTH, S. E. Physiological trade-offs between immunity and reproduction in the northern cricket frog (*Acris crepitans*). **Herpetologica**, v. 63, n. 3, p. 269-274, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1655/0018-0831\(2007\)63\[269:PTBIAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0018-0831(2007)63[269:PTBIAR]2.0.CO;2)

MCCOY, K. A.; AMANTO, C. M.; GUILLETTE, J. R. L. J.; MARY, C. M. S. Giant toads (*Rhinella marina*) living in agricultural areas have altered spermatogenesis. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1230-1237, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.185>

MCCOY, K. A.; BORTNICK, L. J.; CAMPBELL, C. M.; HAMLIN, H. J.; GUILLETTE JR, L. J.; MARY, C. M. ST. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 11, p. 1526-1532, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.11536>

MCCOY, K. A.; PERALTA, A. L. Pesticides could alter amphibian skin microbiomes and the effects of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00748>

MCDANIEL, T. V.; MARTIN, P. A.; STRUGER, J.; SHERRY, J.; MARVIN, C. H.; MCMASTER, M. E.; CLARENCE, S.; TETREAULT, G. Potential 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, n. 4, p. 230-242, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.002>

MCKINNEY, M. L. Urbanization, Biodiversity, and Conservation: The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. **Bioscience**, v. 52, n. 10, p. 883-890, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0883:UBAC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0883:UBAC]2.0.CO;2)

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1669>

MONTEZOL, M.; CASSEL, M.; SILVA, D.; FERREIRA, A.; MEHANNA, M. Gametogenesis and reproductive dynamics of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae): Influence of environmental and anthropogenic factors. **Acta Zoologica**, v. 99, n. (1), p. 93-104, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/azo.12195>

MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; DE OLIVEIRA, C. 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, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>

MOSCONI, G.; CARNEVALI, O.; FRANZONI, M. F.; COTTONE, E.; LUTZ, I.; KLOAS, W.; YAMAMOTO, K.; KIKUYAMA, S.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. **General and Comparative Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 125-129, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1006/gcen.2002.7781>

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. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 3-4, p. 230-245, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.010>

NARAYAN, E. J.; COCKREM, J. F.; HERO, J. M. Sight of a predator induces a corticosterone stress response and generates fear in an amphibian. **PlosOne**, v. 8, n. 8, e73564, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073564>

NAVAS, C. A.; OTANI, L. Physiology, environmental change, and anuran conservation. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 6, n. 2, p. 83-103, 2007. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v6i2p83-103>

NELLEMANN, C.; MACDEVETTE, M.; MANDERS, T.; EICKHOUT, B.; SVIHUS, B.; PRINS, A. G.; KALTENBORN, B. P. **The environmental food crisis – The environment's role in averting future food crises. A UNEP rapid response assessment**. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal, 2009. Disponível em: <<https://www.grida.no/publications/154>>. Acessado em: 25 de Agosto de 2022.

NEWBOLD, T.; HUDSON, L. N.; HILL, S. L.; CONTU, S.; LYSENKO, I.; SENIOR, R. A.; BÖRGER, L.; BENNETT, D. J.; CHOIMES, A.; COLLEN, B.; DAY, J.; DE PALMA, A.; DÍAZ, S.; ECHEVERRÍA-LONDOÑO, S.; EDGAR, M. J.; FELDMAN, A.; GARON, M.; HARRISON, M. L. K.; ALHUSSEINI, T.; INGRAM, D. J.; ITESCU, Y.; KATTGE, J.; KEMP, V.; KIRKPATRICK, L.; KLEYER, M.; CORREIA, D. L. P.; MARTIN, C. D.; MEIRI, S.; NOVOSOLOV, M.; PAN, Y.; PHILLIPS, H. R. P.; PURVES, D. W.; ROBINSON, A.; SIMPSON, J.; TUCK, S. L.; WEIHER, E.; WHITE, H. J.; EWERS, R. M.; MACE, G. M.; SCHARLEMANN, J. P. W.; PURVIS, A. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 45-50, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14324>

NEWBOLD, T. Future effects of climate and land-use change on terrestrial vertebrate community diversity under different scenarios. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1881, 20180792, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0792>

NILSSON, S. Autonomic nerve function in the vertebrates. Springer Science & Business Media, 2012.

NORDLING, D.; ANDERSSON, M.; ZOHARI, S.; GUSTAFSSON, L. Reproductive effort reduce specific immune response and parasite resistance. **The Royal Society**, v. 265, p. 1291-1298, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0432>

NORRIS, D. O.; JONES, R. E. Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. Plenum Press, 1987.

NORRIS, K.; EVANS, M. R. Ecological immunology: life history trade-offs and immune-defense in birds. **Behavioral Ecology**, v. 11, n. 1, p. 19-26, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/11.1.19>

NUNES, A. L.; FILL, J. M.; DAVIES, S. J.; LOUW, M.; REBELO, A. D.; THORP, C. J.; VIMERCATI, G.; MEASEY, J. (2019). A global meta-analysis of the ecological impacts of alien species on native amphibians. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1897, 20182528, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2528>

OGIELSKA, M.; BARTMAŃSKA, J. Spermatogenesis and male reproductive system in Amphibia – Anura. In: OGIELSKA, M. **Reproduction of Amphibians**. Science Publishers, 2009. p. 34-99.

OKASHA, S. A.; RYU, S.; DO, Y.; MCKALLIP, R. J.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus. **Toxicology**, v. 163, n. 1, p. 49-62, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00374-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00374-2)

OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; DUARTE, I. C. S.; LUIZ SILVA, E.; VARESCHE, M. B. A. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate in fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 539-543, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322010000400005>

OLIVEIRA, S. R.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; DE SOUZA, A. O.; DOS SANTOS, C. E.; SILVA, K. V.; ZORTEA, M.; GUILHERME, F. A. G.; MELO, F. R.; CARNEIRO, S. E. S.; SILVA, W. V.; MORAIS, A. R. Are protected areas effective in preserving anurans and promoting biodiversity discoveries in the Brazilian Cerrado? **Journal for Nature Conservation**, v. 52, 125734, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2019.125734>

OPPLIGER, A.; GIOGI, M. S.; NEMBRINI, M.; JOHM-ALDER, H. B. Effects of testosterone on, immunocompetence, parasite load, and metabolism in the common wall lizard (*Podarcismuralis*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 82, n. 11, p. 1713-1719, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/z04-152>

ORTON, F.; TYLER, C. R. Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? **Biological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1100-1117, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12147>

ORTON, F.; SÄFHOLM, M.; JANSSON, E.; CARLSSON, Y.; ERIKSSON, A.; FICK, J.; UREN WEBSTER, T.; MCMILLAN, T.; LEISHMAN, M.; VERBRUGGEN, B.; BERG, C. Exposure to an anti-androgenic herbicide negatively impacts reproductive physiology and fertility in *Xenopus tropicalis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27161-2>

OTHMAN, M. S.; KHONSUE, W.; KITANA, J.; THIRAKHUPT, K.; ROBSON, M. G.; KITANA, N. Reproductive mode of *Fejervaryalimnocharis* (Anura: Ranidae) caught from Mae Sot, Thailand based on its gonadosomatic indices. **Asian Herpetological Research**, v. 2, n. 1, p. 41-45, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3724/SP.J.1245.2011.00041>

PEIG, J.; GREEN, A. J. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. **Oikos**, v. 118, n. 12, p. 1883-1891, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>

PEIG, J.; GREEN, A. J. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. **Functional Ecology**, v. 24, n. 6, p. 1323-1332, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x>

PEÑA-GUZMÁN, C.; ULLOA-SÁNCHEZ, S.; MORA, K.; HELENA -BUSTOS, R.; LOPEZ-BARRERA, E.; ALVAREZ, J.; RODRIGUEZ-PÍNZÓN, M.. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. **Journal of environmental management**, v. 237, p. 408-423, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>

PETTERSSON, I.; ARUKWE, A.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; MORTENSEN, A. S.; BERG, C. Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 356-365, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.004>

PETTERSSON, I.; BERG, C. Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1005-1009, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1897/06-464R.1>

POCHINI, K.; HOVERMAN, J. Immediate and lag effects of pesticide exposure on parasite resistance in larval amphibians. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 817-822, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182016002560>

PONGRATZ, J.; SCHWINGSHACKL, C.; BULTAN, S.; OBERMEIER, W.; HAVERMANN, F.; GUO, S. Land use effects on climate: current state, recent progress, and emerging topics. **Current Climate Change Reports**, v. 7, p. 99-120, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40641-021-00178-y>

PORTELA, A. A. B.; DOS SANTOS, T. G.; DOS ANJOS, L. A. Changes in land use affect anuran helminths in the South Brazilian grasslands. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000905>

POULSEN, R.; LUONG, X.; HANSEN, M.; STYRISHAVE, B.; HAYES, T. Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 168, p. 28-37, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.008>

PRADO, C. P. A.; HADDAD, C. F. Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 2, p. 354-362, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037\[0354:TSILFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0354:TSILFA]2.0.CO;2)

PRIYADARSHANI, S.; MADHUSHANI, W. A. N.; JAYAWARDENA, U. A.; WICKRAMASINGHE, D. D.; UDAGAMA, P. V. Heavy metal mediated immunomodulation of the Indian green frog, *Euphlyctis hexadactylus* (Anura: Ranidae) in urban wetlands. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 40-49, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.037>

PROVETE, D. B.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE SOUZA SANTOS, L. R.; ZIERI, R.; MORESCO, R. M.; MARTINS, I. A.; DE ALMEIDA, S. C.; DE OLIVEIRA, C. Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 547-556, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2012.00559.x>

PUCCI ALCAIDE, A.; PUCCI ALCAIDE, F. J.; MICHEL, A. A.; PONSSA, M. L. Testicular histology of anurans that deposit eggs out of the water. **Acta Zoológica Lilloana**, v. 64, n. 2, 84-115, 2020. DOI: <https://doi.org/10.30550/j.azl/2020.64.2/2>

PYRON, R. A. Global amphibian declines have winners and losers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 15, p. 3739-3741, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803477115>

QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE, C. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. **PlosOne**, v. 4, n. 11, e7699, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>

RAI, P. K. Heavy metal pollution aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an ecosustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, p. 133-160, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226510801913918>

RAI, P. K. Heavy metals in water, sediments and wetland plants, in aquatic ecosystem, industrial region, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p. 433-457, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0595-9>

RAMM, S. A.; SCHÄRER, L. The evolutionary ecology of testicular function: size isn't everything. **Biological Reviews**, v. 89, n. 4, p. 874-888, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12084>

RASTOGI, R. K.; BAGNARA, J. T.; IELA, L.; KRASOVICH, M. A. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **Journal of Morphology**, v. 197, n. 3, p. 277-302, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmor.1051970304>

RASTOGI, R. K.; PINELLI, C.; POLESE, G.; D'ANIELLO, B.; CHIEFFI-BACCARI, G. Hormones and reproductive cycles in anuran amphibians. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. Academic Press, 2011. p. 171-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10009-4>

READING, C. J.; LOMAN, J.; MADSEN, T. Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. **Journal of Zoology**, v. 225, p. 201-211, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb03811.x>

REBELATO, M. G.; MADALENO, L. L.; RODRIGUES, A. M. Ponderação do impacto ambiental dos resíduos e subprodutos da produção industrial sucroenergética. **Revista Gestão Industrial**, v. 9, n. 2, p. 392-415, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3895/S1808-04482013000200006>

REID, I. M. Morphometric methods in veterinary pathology: a review. **Veterinary Pathology**, v. 17, n. 5, p. 522-543, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098588001700502>

REZENDE, W. R.; SANTOS, L. R. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Testicular morphometric changes in neotropical anurans from agroecosystems. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116265, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116265>

RIAZ, A.; MAJEED, M.; RIAZ, M. A.; IQBAL, A.; ASHFAQ, U. A. Histopathological alteration in organs of adult male frog after exposure to alpha-cypermethrin. **Pure and**

Applied Biology, v. 11, n. 1, p. 175-180, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2022.110019>

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 4373-4402, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac800660d>

ROBERT, J.; MCGUIRE, C. C.; NAGEL, S.; LAWRENCE, B. P.; ANDINO, F. D. J. Developmental exposure to chemicals associated with unconventional oil and gas extraction alters immune homeostasis and viral immunity of the amphibian *Xenopus*. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 644-654, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.395>

ROCHA, E.; MONTEIRO, R. A.; PEREIRA, C. A. Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels. **The Anatomical Record**, v. 247, n. 3, p. 317-328, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199703\)247:3<317::AID-AR3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<317::AID-AR3>3.0.CO;2-R)

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. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1235-1239, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07281>

ROJAS-HUCKS, S.; GUTLEB, A. C.; GONZÁLEZ, C. M.; CONTAL, S.; MEHENNAOUI, K.; JACOBS, A.; WITTERS, H. E.; PULGAR, J. *Xenopus laevis* as a bioindicator of endocrine disruptors in the region of Central Chile. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 390-408, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00661-6>

ROLLINS-SMITH, L. A. Metamorphosis and the amphibian immune system. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 221-230, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01265.x>

ROLLINS-SMITH, L. A. Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 66, p. 111-119, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.002>

ROLLINS-SMITH, L. A.; RAMSEY, J. P.; PASK, J. D.; REINERT, L. K.; WOODHAMS, D. C. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 4, p. 552-562, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/ucr095>

ROMANOVA, E. B.; EGORIKHINA, M. N. Changes in hematological parameters of *Rana* frogs in a transformed urban environment. **Russian Journal of Ecology**, v. 37, n. 3, p. 188-192, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1067413606030076>

ROMANOVA, E. B.; SHAPOVALOVA, K. V.; RYABININA, E. S.; GELASHVILI, D. B. Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions. **Biology Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1230-1238, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1062359019100273>

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Lippincott Williams & Wilkins, 2018.

- ROZNIK, E. A.; SAPSFORD, S. J.; PIKE, D. A.; SCHWARZKOPF, L.; ALFORD, R. A. Condition-dependent reproductive effort in frogs infected by a widespread pathogen. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1810, 20150694, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0694>
- SACCOL, S. S. A.; UCHA, J. L. C. D.; MADALOZZO, B.; CECHIN, S. Z.; SANTOS, T. G. Influence of land use on the diversity of pond-breeding anurans in South Brazilian grasslands. **Biodiversity and Conservation**, v. 31, n. 1, p. 21-37, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02317-1>
- SAI, L.; WU, Q.; QU, B.; BO, C.; YU, G.; JIA, Q.; XIE, L.; LI, Y.; GUO, Q.; NG, J. C.; PENG, C. Assessing atrazine-induced toxicities in *Bufo bufogargarizans* Cantor. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, p. 152-157, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1441-0>
- SANCHEZ, L.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; MANZANO, A. S.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M. 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, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-13759
- SANTANA, D. J.; FERREIRA, V. G.; CRESTANI, G. N.; NEVES, M. O. Diet of the rufous frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) from two contrasting environments. **Herpetozoa**, v. 32, p. 1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.32.e35623>
- SANTANA, E.; SCHIESARI, L.; GOMES, F.; MARTINS, M. Morphophysiological traits of an amphibian exposed to historical industrial pollution in a Brazilian biodiversity hotspot. **Amphibia-Reptilia**, v. 42, n. 3, p. 283-295, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10050>
- SANTOS, E. M.; ALMEIDA, A. V.; VASCONCELOS, S. D. Feeding habits of six anuran (Amphibia: Anura) species in a rainforest fragment in Northeastern Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, p. 433-438, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212004000400014>
- SANTOS, L. R. S.; DE OLIVEIRA, C. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1266-1270, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.006>
- SANTOS, L. R. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). **Zoological Science**, v. 28, p. 840-844, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2108/zsj.28.840>
- SANTOS, L. R. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R. E.; DE OLIVEIRA, C. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, v. 297, n. 5, p. 864-875, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. Biogeographic biases in research and their consequence for linking amphibian declines to pollution. **Conservation Biology**, v. 21, n. 2, p. 465-471, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00616.x>

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 4, p. 215-221, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1890/090139>

SCHOENLE, L. A.; DOWNS, C. J.; MARTIN, L. B. An introduction to ecoimmunology. In: COOPER, E. L. **Advances in comparative immunology**. Springer, 2018. p. 901-932. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_26

SCHWENDIMAN, A. L.; PROPPER, C. R. A common environmental contaminant affects sexual behavior in the clawed frog, *Xenopus tropicalis*. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 4, p. 520-526, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.035>

SECONDI, J.; MONDY, N.; GIPPET, J. M. W.; TOUZOT, M.; GARDETTE, V.; GUILLARD, L.; LENGAGNE, T. Artificial light at night alters activity, body mass, and corticosterone level in a tropical anuran. **Behavioral Ecology**, v. 32, n. 5, p. 932-940, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arab044>

SEGALLA, M.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LOURENÇO, A. C.; MANGIA, S.; MOTT, T.; NASCIMENTO, L. TOLEDO, L. F.; WERNECK, F.; LANGONE, J. A. List of Brazilian Amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4716176>

SEGNER, H.; KEMENADE, B. L. V.-V.; CHADZINSKA, M. The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: Proximate mechanism for reproduction-immune trade offs? **Developmental & Comparative Immunology**, v. 66, p. 43-60, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.004>

SEMLITSCH, R. D. Biological delineation of terrestrial buffer zones for pond-breeding salamanders. **Conservation Biology**, v. 12, p. 1113-1119, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.97274.x>

SHELDON, B. C.; VERHULST, S. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 8, p. 317-321, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2)

SHERMAN, E.; STEPHENS, A. Fever and metabolic rate in the toad *Bufo marinus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 23, n. 1, p. 49-52, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00045-4)

SHUTLER, D.; MARCOGLIESE, D. J. Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. **Copeia**, v. 2011, n. 2, p. 301-307, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1643/CP-10-065>

SHUTLER, D.; SMITH, T. G.; ROBINSON, S. R. Relationships between leukocytes and Hepatozoon spp. in green frogs, *Rana clamitans*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 67-72, 2009. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.67>

SILVA, M. B. D.; FRAGA, R. E.; NISHIYAMA, P. B.; SILVA, I. S. S. D.; COSTA, N. L. B.; DE OLIVEIRA, L. A. A.; ROCHA, M. A.; JUNCÁ, F. A. Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 7, p. 1-11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04726-4>

SIMMONS, A. M.; NARINS, P. M. Effects of anthropogenic noise on amphibians and reptiles. In: SLABBEKOORN, H.; DOOLING, R. J.; POPPER, A. N.; FAY, R. R. **Effects of anthropogenic noise on animals**. New York: Springer, 2018. p. 179-208. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8574-6_7

ŞİŞMAN, T.; AŞKIN, H.; TÜRKEZ, H.; ÖZKAN, H.; İNCEKARA, Ü.; ÇOLAK, S. Determination of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of the frog *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) sampled from Karasu River Basin (Turkey) for pollution impacts. **Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research**, v. 1, n. 2, p. 75-81, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17216/LimnoFish-5000115825>

SLABY, S.; MARIN, M.; MARCHAND, G.; LEMIERE, S. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? **Environmental Pollution**, v. 248, p. 478-495, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>

SLUCHYK, I.; GRYTSULYAK, B.; GLODAN, O.; IVASIUK, I.; KHALLO, A. Comparison of sperm parameters and testis histological structure in lake frog (*Pelophylax ridibundus*) from areas with different level of anthropogenic pollution. **ScienceRise: Biological Science**, v. 1 n. 26, p. 10–13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2021.228082>

SMIT, J. A. H.; CRONIN, A. D.; VAN DER WIEL, I.; OTEMAN, B.; ELLERS, J.; HALFWERK, W. Interactive and independent effects of light and noise pollution on sexual signaling in frogs. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.934661>

SROGI, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 169-195, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>

STEINICKE, H.; GRUBER, B.; GRIMM, A.; GROSSE, W. R.; HENLE, K. Morphological shifts in populations of generalist and specialist amphibians in response to fragmentation of the Brazilian Atlantic forest. **Nature Conservation**, v. 13, p. 47-59, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3897/natureconservation.13.7428>

STEVENSON, R. D.; WOODS JR., W. A. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 6, p. 1169-1190, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/icl052>

SUÁREZ, R. P.; GOIJMAN, A. P.; CAPPELLETTI, S.; SOLARI, L. M.; CRISTOS, D.; ROJAS, D.; KRUG, P.; BABBITT, K. J.; GAVIER-PIZARRO, G. I. Combined effects of agrochemical contamination and forest loss on anuran diversity in agroecosystems of east-central Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 759, 143435, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143435>

SUTTIE, A. W. Histopathology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 466-503, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230600867750>

TAMSCHICK, S.; ROZENBLUT-KOŚCISTY, B.; OGIELSKA, M.; KEKENJ, D.; GAJEWSKI, F.; KRÜGER, A.; KLOAS, W.; STÖCK, M. The plasticizer bisphenol A affects somatic and sexual development, but differently in pipid, hyliid and bufonid anurans. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 282-291, 2016a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.091>

TAMSchICK, S.; ROZENBLUT-KOŚCISTY, B.; OGIELSKA, M.; LEHMANN, A.; LYMBERAKIS, P.; HOFFMANN, F.; LUTZ, I.; KLOAS, W.; STÖCK, M. Sex reversal assessments reveal different vulnerability to endocrine disruption between deeply diverged anuran lineages. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016b. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep23825>

TAMSchICK, S.; ROZENBLUT-KOŚCISTY, B.; OGIELSKA, M.; LEHMANN, A.; LYMBERAKIS, P.; HOFFMANN, F.; LUTZ, I.; SCHNEIDER, R. J.; KLOAS, W.; STÖCK, M. Impaired gonadal and somatic development corroborate vulnerability differences to the synthetic estrogen ethinylestradiol among deeply diverged anuran lineages. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 503-514, 2016c. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.001>

TENNESSEN, J. B.; PARKS, S. E.; LANGKILDE, T. Traffic noise causes physiological stress and impairs breeding migration behaviour in frogs. **Conservation Physiology**, v. 2, n. 1, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cou032>

TENNESSEN, J. B.; PARKS, S. E.; LANGKILDE, T. L. Anthropogenic noise and physiological stress in wildlife. **The Effects of Noise on Aquatic Life II**, p. 1145-1148, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2981-8_142

THOMPSON, M. E.; NOWAKOWSKI, A. J.; DONNELLY, M. A. The importance of defining focal assemblages when evaluating amphibian and reptile responses to land use. **Conservation Biology**, v. 30, n. 2, p. 249-258, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/cobi.12637>

TIJANI, J. O.; FATOBA, O. O.; BABAJIDE, O. O.; PETRIK, L. F. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, n. 1, p. 27-49, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>

TITON, S. C. M.; TITON JUNIOR, B.; ASSIS, V. R.; KINKER, G. S.; FERNANDES, P. A. C. M.; GOMES, F. R. Interplay among steroids, body condition and immunity in response to long-term captivity in toads. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35495-0>

TITON JUNIOR, B.; TITON, S. C. M.; ASSIS, V. R.; BARSOTTI, A. M. G.; VASCONCELOS-TEIXEIRA, R.; FERNANDES, P. A. C. M.; GOMES, F. R. LPS-induced immunomodulation and hormonal variation over time in toads. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 335, n. 6, p. 541-551, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.2474>

TOUZOT, M.; LENGAGNE, T.; SECONDI, J.; DESOUHANT, E.; THERY, M.; DUMET, A.; DUCHAMP, C.; MONDY, N. Artificial light at night alters the sexual behaviour and fertilisation success of the common toad. **Environmental Pollution**, v. 259, 113883, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113883>

TRACHANTONG, W.; PROMYA, J.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. Effects of atrazine herbicide on metamorphosis and gonadal development of *Hoplobatrachus rugulosus*. **MaejorInternacional Journal of Science and Technology**, v. 7, p. 60-71, 2013.

TRUDEAU, V. L.; THOMSON, P.; ZHANG, W. S.; REYNAUD, S.; NAVARRO-MARTIN, L.; LANGLOIS, V. S. Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians.

Molecular and Cellular Endocrinology, v. 513, 110861, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>

VALVERDE, B. S. L.; USUNOMIYA, H. S. M.; CARVALHO, C. S. FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo(α)pyrene exposure routes. **Ecotoxicology**, v. 31, p. 516-523, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02527-5>

VAN-TIENHOVEN, A. Reproductive Physiology of the Vertebrates. Comstock, 1983.

VERRELL, P. Methoxychlor increases susceptibility to predation in the salamander *Ambystoma macrodactylum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 85-92, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001289910014>

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **PNAS**, v. 105, p. 11466-11473, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>

WEE, S. Y.; ARIS, A. Z.; YUSOFF, F. M.; PRAVEENA, S. M. Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 431-442, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.243>

WISE, S. Studying the ecological impacts of light pollution on wildlife: amphibians as models. In: CIPRIANO, M.; JAFAR, J. **Starlight: A Common Heritage**, 2007. p. 209-218.

WHO. World Health Organization IPCS. In: Environmental Health Criteria 165 e **Inorganic Lead**. Publish under the Joint Sponsorship of the United Nations Environment Programme, vol. 300. The International Labour Organization, and the World Health Organization. 1995

WYNN, A.; HEYER, W. R. Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae). **Tropical Zoology**, v. 14, n. 2, p. 255-285, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/03946975.2001.10531157>

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, 109103, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>

ZAKARIA, M. P.; TAKADA, H.; TSUTSUMI, S.; OHNO, K.; YAMADA, J.; KOUNO, E.; KUMATA, H. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: a widespread input of petrogenic PAHs. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1907-1918, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/es011278+>

ZHELEV, Z.; TSONEV, S.; GEORGIEVA, K.; ARNAUDOVA, D. Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 7884–7895, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1109-5>

ZAMORA-CAMACHO, F. J.; COMAS, M. Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. **PeerJ**, v. 5, e3791, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3791>

ZERA, A. J.; HARSHMAN, L. G. The physiology of life history tradeoffs in animals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 95-126, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006>

ZHANG, W.; GUO, R.; AI, S.; YANG, Y.; DING, J.; ZHANG, Y. Long-term heavy metal pollution varied female reproduction investment in free-living anura, *Bufo raddei*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 159, p. 136-142, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.001>

ZHELEV, Z.; TSONEV, S.; GEORGIEVA, K.; ARNAUDOVA, D. Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 7884–7895, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1109-5>

ZHELEV, Z. M.; POPGEORGIEV, G. S. Use of Haematological Indicators in Anurans for Assessing Their Health Status When Inhabiting Conditions of Anthropogenic Stress. *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as an Example: A Review and Appraisal. **Ecologia Balkanica**, v. 13, n. 2, p. 289-320, 2021.

ZHELEV, Z.; ARNAUDOVA, D.; TSONEV, S. Genotoxicity and erythrocyte nuclear abnormalities in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura: Ranidae) in an industrial area in southern Bulgaria: evaluation as biomarkers for ecological stress assessment. **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 74, n. 1, p. 59-67, 2022. DOI: <http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/2022/002549>

ZLOTNIK, S.; GRIDI-PAPP, M.; BERNAL, X. E. Laryngeal demasculinization in wild cane toads varies with land use. **EcoHealth**, v. 16, n. 4, p. 682-693, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01447-x>

7. APÊNDICES

Apêndice A: Proporções detalhadas dos tipos de uso de solo encontrados nos pontos amostrados num raio de 2km.

Ambientes	Tipos de matriz	%
UC	Pastagem natural	0,3
	Campo	99,7
SOJA_GO	Formação de Floresta	8,5
	Formação de savana	0,4
	Pastagem	0,2
	Plantação de soja	90,9
CANA_GO	Formação de Floresta	14,2
	Formação de savana	9,8
	Campo	13,1
	Pastagem	16,3
	Plantação de cana-de-açúcar	40,8
	Plantação de soja	1,8
	Outras plantações temporárias	4,0
CANA_SP	Formação de Floresta	1,2
	Zona úmida	1,3
	Plantação de cana-de-açúcar	61,6
	Mosaico de agricultura e pastagem	3,6
	Outras plantações temporárias	3,6
	Citrus	28,8
URBANO_SP	Formação de floresta	0,7
	pastagem	22,2
	Plantação de cana-de-açúcar	10,5
	Mosaico de agricultura e pastagem	15,1
	Infraestrutura Urbana	51,5

Apêndice B: Análises das amostras de água coletadas nos diferentes ambientes estudados. **nq** – não quantificado; **LQ/Faixa** - limite de quantificação; **UC** – unidade de conservação.

Parâmetros	Unidade	LQ/Faixa	CONAMA 357	Resultados				
				UC	Cana - GO	Soja - GO	Cana - SP	Urbano - SP
1 Coliformes Totais	NMP/100mL	10	---	nq	nq	nq	nq	> 24200
2 Coliformes Termotolerantes	NMP/100mL	10	1000	nq	nq	nq	nq	1722
3 Alumínio Dissolvido	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0986
4 Antimônio	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
5 Arsênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
6 Bário	mg/L	0,001	0,7	nq	nq	nq	nq	0,0113
7 Berílio	mg/L	0,001	0,04	nq	nq	nq	nq	< 0,001
8 Boro	mg/L	0,001	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
9 Cádmio	mg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0,001
10 Chumbo	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
11 Cianeto Livre	mg/L	0,001	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,001
12 Cloreto	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	1,83
13 Cloro Residual Total	mg/L	0,01	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,01
14 Cobalto	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,001
15 Cobre Dissolvido	mg/L	0,001	0,009	nq	nq	nq	nq	0,0031
16 Cromo	mg/L	0,001	0,05	nq	nq	nq	nq	0,0014
17 Ferro Dissolvido	mg/L	0,001	0,3	nq	nq	nq	nq	0,103
18 Fluoreto	mg/L	0,05	1,4	nq	nq	nq	nq	0,12
19 Fósforo Total	mg/L	0,01	Obs (2)	nq	nq	nq	nq	0,0585
20 Lítio	mg/L	0,001	2,5	nq	nq	nq	nq	< 0,001
21 Manganês	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0055
22 Mercúrio	mg/L	0,0001	0,0002	nq	nq	nq	nq	< 0,0001
23 Níquel	mg/L	0,001	0,025	nq	nq	nq	nq	< 0,001
24 Nitrato	mg/L	0,5	10	nq	nq	nq	nq	< 0,5
25 Nitrito	mg/L	0,02	1	nq	nq	nq	nq	< 0,02
26 Nitrogênio Amoniacal	mg/L	0,1	Obs (1)	nq	nq	nq	nq	< 0,1
27 Prata	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
28 Selênio	mg/L	0,001	0,01	nq	nq	nq	nq	< 0,001
29 Sulfato	mg/L	0,5	250	nq	nq	nq	nq	2,95
30 Sulfetos	mg/L	0,002	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0,002
31 Urânio	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0,001
32 Vanádio	mg/L	0,001	0,1	nq	nq	nq	nq	0,0021
33 Zinco	mg/L	0,001	0,18	nq	nq	nq	nq	0,0049
34 Acrilamida	µg/L	0,1	0,5	nq	nq	nq	nq	< 0,1
35 Alaclor	µg/L	0,005	20	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,005	< 0,005
36 Aldrin + Dieldrin	µg/L	0,002	0,005	< 0,02	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
37 Atrazina	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	0,0092	< 0,005
38 Benzeno	mg/L	0,0005	0,005	nq	nq	nq	nq	< 0,0005
39 Benzo(a)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
40 Benzo(a)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
41 Benzo(b)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
42 Benzo(k)fluoranteno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
43 Acenoflileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
44 Fluoreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
45 Antraceno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
46 Benzo(g,h,i)perileno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
47 Fenantreno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
48 Pireno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
49 Acenafteno	µg/L	0,01	nid	nq	nq	nq	< 0,01	< 0,01
50 Carbaril	µg/L	0,005	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,005	< 0,005
51 Clordano (cis e trans)	µg/L	0,002	0,04	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,002	< 0,002
52 2-Clorofenol	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
53 Criseno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
54 2,4-D	µg/L	0,005	4	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,005	< 0,005
55 Dibenzo(a,h)antraceno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	< 0,005	< 0,005
56 2,4-Diclorofenol	µg/L	0,005	0,3	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
57 Dodecacloropentaciclodecano	µg/L	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
58 Endrin	µg/L	0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
59 Gution	µg/L	0,004	0,005	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
60 Indeno(1,2,3,cd)pireno	µg/L	0,005	0,05	nq	nq	nq	nq	< 0,005
61 Lindano (g-HCH)	µg/L	0,001	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	nq	< 0,001
62 Malation	µg/L	0,005	0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
63 Metolacoloro	µg/L	0,005	10	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,17	< 0,005

64	Metoxicloro	µg/L	0,001	0,03	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
65	Paration	µg/L	0,005	0,04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.005	< 0.005
66	Pentaclorofenol	mg/L	0,000005	0,009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.000005	< 0.000005
67	Simazina	µg/L	0,005	2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.005	< 0.005
68	2,4,5-T	µg/L	0,005	2	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
69	2,4,5-TP	µg/L	0,005	10	< 1	< 1	< 1	< 0.005	< 0.005
70	2,4,6-Triclorofenol	mg/L	0,000003	0,01	nq	nq	nq	< 0.000003	< 0.000003
71	Trifluralina	µg/L	0,005	0,2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.005	< 0.005
72	Demeton (-O e -S)	µg/L	0,01	0,1	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.01	< 0.01
73	Heptacloro e Heptacloro Epóxido	µg/L	0,002	0,01	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.002	< 0.002
74	o,p'-DDT	µg/L	0,001	0,002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	nq	nq
75	o,p'-DDT + o,p'-DDD + o,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	< 0.003	< 0.003	< 0.003	nq	nq
76	p,p'-DDT + p,p'-DDD + p,p'-DDE	µg/L	0,003	0,002	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.003
77	Endossulfan (a, b e sulfato)	µg/L	0,003	0,056	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.003	< 0.003
78	PCB's	µg/L	0,001	0,001	nq	nq	nq	nq	< 0.001
79	PCB 8	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
80	PCB 28	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
81	PCB 37	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
82	PCB 44	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
83	PCB 49	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
84	PCB 52	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
85	PCB 60	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
86	PCB 66	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
87	PCB 70	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
88	PCB 74	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
89	PCB 77	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
90	PCB 82	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
91	PCB 87	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
92	PCB 99	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
93	PCB 101	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
94	PCB 105	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
95	PCB 114	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
96	PCB 118	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
97	PCB 126 + 166	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
98	PCB 128 + 167	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
99	PCB 138 + 158	µg/L	0,002	nid	nq	nq	nq	< 0.002	< 0.002
100	PCB 153	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
101	PCB 156	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
102	PCB 169	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
103	PCB 170	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
104	PCB 179	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
105	PCB 180	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
106	PCB 183	µg/L	0,001	nid	nq	nq	nq	< 0.001	< 0.001
107	Hexaclorobenzeno	µg/L	0,005	0,0065	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005
108	Tributilestanho	µg/L	0,005	0,063	nq	nq	nq	< 0.005	< 0.005
109	Benzidina	µg/L	0,0001	0,001	nq	nq	nq	< 0.0001	< 0.0001
110	1,2-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00045	< 0.00045	< 0.00045	< 0.001	< 0.001
111	1,1-Dicloroetano	mg/L	0,001	0,003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001
112	Diclorometano	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
113	Estireno	mg/L	0,001	0,02	nq	nq	nq	nq	< 0.001
114	Etilbenzeno	µg/L	1	90	nq	nq	nq	nq	< 1
115	Índice de Fenóis	mg/L	0,001	0,003	nq	nq	nq	nq	0,001
116	Glifosato	µg/L	5	65	< 55	< 55	< 55	nq	< 5
117	Surfactantes (como o LAS)	mg/L	0,2	0,5	nq	nq	nq	nq	0,21
118	Tetracloroeto de Carbono	mg/L	0,0005	0,002	nq	nq	nq	nq	< 0.0005
119	Tetracloroetano	mg/L	0,001	0,01	< 0.00031	< 0.00031	< 0.00031	nq	< 0.001
120	Tolueno	µg/L	1	2	nq	nq	nq	nq	< 1
121	Toxafeno	µg/L	0,01	0,01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	nq	< 0.01
122	Triclorobenzenos	mg/L	0,003	0,02	< 0.00043	< 0.00043	< 0.00043	nq	< 0.003
123	Tricloroetano	mg/L	0,0005	0,03	< 0.002	< 0.002	< 0.002	nq	< 0.0005
124	Xilenos	µg/L	3	300	nq	nq	nq	nq	< 3
125	pH (a 25°C)	- - -	2 - 13	6 - 9	nq	nq	nq	nq	6,79
126	Sólidos Dissolvidos Totais	mg/L	5	500	nq	nq	nq	nq	20

Obs (1): VMP em função do pH: 3,7mg/L para pH ≤ 7,5; 2,0mg/L para 7,5 < pH < 8,0; 1,0mg/L para 8,0 < pH < 8,5; 0,5mg/L para pH > 8,5.
Obs (2): VMP Ambiente Léntico: 0,030 mg/L. / VMP Ambiente Intermediário: 0,050 mg/L. / VMP Ambiente Lótico: 0,100 mg/L

Apêndice C: Parâmetros físico-químicos das amostras de água das proximidades dos ambientes onde foram coletados os indivíduos de *L. fuscus*.

Ambientes	Data (M/A)	Temperatura (°C)	pH	O ² Dissolvido (%)	Condutividade (µS)	Resistividade	Salinidade (psu)	Sólidos totais dissolvidos (ppm)
UC	dez/18	23,20	7,41	101,90	2,56	3,20	0,01	1,40
SOJA_GO	nov/18	35,70	5,38	76,10	3,70	24,80	1,31	20,00
CANA_GO	fev/19	28,90	7,74	90,50	52,60	19,20	0,03	26,00
CANA_SP	fev/20	27,00	8,84	60,00	47,60	—	0,02	—
URBANO_SP	jan/20	30,80	9,37	62,00	49,20	—	0,03	—

Apêndice D: Valores estatísticos da correlação entres os marcadores imunes e reprodutivos realizadas no Capítulo 3. Em **A** valor de p, sendo considerado significativo $p \leq 0.05$; em **B** os valores de r. **IME**- Índice de massa escalonar; **Gonia** – espermatogônia; **Cito** – espermatócito; **Tide**– espermátide; **Sptz** - espermatozoide; **Mast_Test**– mastócito testicular; **Mast_baco**- mastócito no baço; **Pig_Baco**- pigmentação no baço; **P_Branca**– Polpa Branca; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Vasos**– vasos sanguíneos; **Melano**– melanócitos; **Linf** – linfócito; **Neut**– neutrófilos; **Baso**– Basófilos; **Eosi**– Eosinófilos; **Mono**– Monócitos.

A

	IME	Gonia	Cito	Tide	Sptz	Area_loc	Mast_Test	Mast_baco	Pig_baco	P_Branca	P_Vermelha	Vasos	Melano	Linf	Neut	Baso	Eosi	Mono
IME	---																	
Gonia	0,02	---																
Cito	0,01	<0.001	---															
Tide	0,24	0,13	<0.001	---														
Sptz	0,81	0,21	<0.001	<0.001	---													
Area_loc	0,01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	---												
Mast_Test	0,8	0,5	0,45	0,49	0,31	0,68	---											
Mast_baco	0,38	0,57	0,46	0,85	0,91	0,99	0,56	---										
Pig_baco	0,92	0,87	0,76	0,71	0,22	0,81	0,62	0,93	---									
P_Branca	0,1	0,99	0,3	0,67	0,27	0,16	0,82	0,96	0,97	---								
P_Vermelha	0,04	0,74	0,24	0,73	0,36	0,11	0,72	0,92	0,76	<0.001	---							
Vasos	<0.001	0,03	0,35	0,73	0,6	0,08	0,45	0,27	0,74	0,51	0,12	---						
Melano	0,54	0,47	0,48	0,64	0,16	0,94	0,54	0,89	<0.001	0,98	0,59	0,24	---					
Linf	0,96	0,25	0,9	0,22	0,66	0,77	1	0,42	0,69	0,85	0,98	0,24	0,99	---				
Neut	0,15	0,32	0,52	0,82	0,39	0,63	0,64	0,14	0,36	0,05	0,06	0,92	0,34	<0.001	---			
Baso	0,99	0,38	0,38	0,82	0,49	0,24	0,95	0,18	0,33	0,61	0,7	0,56	0,59	0,54	0,01	---		
Eosi	0,09	0,18	0,28	0,39	0,65	0,11	0,54	0,45	0,63	0,28	0,2	0,05	0,6	<0.001	0,28	0,37	---	
Mono	0,88	0,59	0,52	0,22	0,31	0,78	0,96	0,08	0,43	0,27	0,28	0,75	0,63	0,03	0,07	0,42	0,62	---

B

	IME	Gonia	Cito	Tide	Sptz	Area_loc	Mast_Test	Mast_baco	Pig_baco	P_Branca	P_Vermelha	Vasos	Melano	Linf	Neut	Baso	Eosi	Mono
IME	---																	
Gonia	0,352	---																
Cito	0,376	0,614	---															
Tide	0,182	0,236	0,488	---														
Sptz	0,037	0,194	0,488	0,439	---													
Area_loc	0,405	0,722	0,869	0,431	0,56	---												
Mast_Test	0,039	0,105	0,118	0,109	-0,157	0,064	---											
Mast_baco	0,137	0,088	-0,114	0,028	0,018	0,001	-0,091	---										
Pig_baco	-0,016	-0,025	-0,047	0,058	0,19	0,038	-0,078	0,013	---									
P_Branca	-0,256	-0,002	-0,163	-0,067	-0,17	-0,218	-0,035	0,007	-0,005	---								
P_Vermelha	0,315	0,051	0,184	0,054	0,143	0,249	0,055	0,015	-0,048	-0,988	---							
Vasos	-0,451	-0,325	-0,146	0,055	0,081	-0,273	-0,118	-0,17	0,051	0,102	-0,242	---						
Melano	-0,095	-0,113	-0,11	0,074	0,218	-0,011	-0,096	-0,022	0,858	0,004	-0,083	0,183	---					
Linf	-0,008	0,18	0,02	0,189	0,069	0,045	-0,0007	0,125	0,063	0,029	-0,004	-0,183	0,001	---				
Neut	0,222	-0,155	0,101	0,036	0,134	0,074	0,073	0,231	0,142	-0,306	0,292	-0,015	0,149	-0,481	---			
Baso	-0,001	0,138	0,135	-0,036	-0,108	0,184	0,009	-0,207	-0,15	0,079	-0,061	-0,09	-0,084	-0,096	-0,369	---		
Eosi	-0,261	-0,21	-0,168	-0,133	-0,071	-0,25	-0,09	-0,119	-0,075	0,168	-0,199	0,298	-0,081	-0,437	-0,167	-0,141	---	
Mono	-0,024	0,084	-0,1	-0,19	-0,159	-0,043	-0,008	-0,274	-0,123	0,171	-0,169	0,05	-0,074	-0,331	-0,278	0,127	-0,077	---

Apêndice E: Valore estáticos significativos da análise dos componentes principais realizadas no Capítulo 3. **Legenda: Vetores:** **Area_loc**: área locular; **Cito** – espermátócito; **SMI**- Índice de massa escalonar; **P_Vermelha**– Polpa vermelha; **Gonia** – espermatogônia; **Tide**– espermátide; **Sptz** - espermatozoide; **Neut**– neutrófilos; **Vasos**– vasos sanguíneos; **Eosi**– Eosinófilos; **P_Branca**– Polpa Branca; **Melano** – melanócitos; **Pig_Baco**- pigmentação no baço; **Baso** - basófilo.

Eixo 1		
	Correlação	Valor de p
Area_loc	0,724	4.03×10^{-8}
Cito	0,673	7.44×10^{-7}
P_Vermelh	0,667	1.03×10^{-6}
SMI	0,633	5.03×10^{-6}
Gonia	0,518	3.73×10^{-4}
Tide	0,476	1.24×10^{-3}
Sptz	0,451	2.38×10^{-3}
Neut	0,344	2.34×10^{-2}
Vasos	-0,451	2.38×10^{-3}
Eosi	-0,476	1.24×10^{-3}
P_Branca	-0,621	8.56×10^{-6}

Eixo 2		
	Correlação	Valor de p
Melano	0,721	4.86×10^{-8}
Pig_baco	0,685	3.91×10^{-7}
Neut	0,545	1.53×10^{-4}
Vasos	0,354	1.95×10^{-2}
Mono	-0,349	2.15×10^{-2}
Gonia	-0,443	2.87×10^{-3}
Baso	-0,478	1.18×10^{-3}