



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

Gabriel da Cunha Canevari

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

São José do Rio Preto
2022

Gabriel da Cunha Canevari

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

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto
2022

C221e

Canevari, Gabriel da Cunha

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

74 p. : tabs., fotos

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

Orientador: Classius de Oliveira

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriel da Cunha Canevari

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

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

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

São José do Rio Preto
15 de julho de 2022

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

Metamorphosis in anurans is a process where animals are extremely sensitive, and disturbances, such as those caused by contaminants, can lead to irreversible physiological and morphological changes. Fipronil is an insecticide that has generated many concerns due to its impacts on biodiversity, since its use has increased greatly in recent years. Among the main phenomena during metamorphosis, there is an emphasis on the formation and remodeling of the skeletal system. Thus, due to the increasing use of fipronil and the fact that its contamination could lead to disturbances in metamorphosis and deleterious effects on various organs and systems, the aim of the present work was to investigate the effects of fipronil on development during metamorphosis, with emphasis on the skeletal system, also evaluating toxic responses of this compound on blood and hepatic biomarkers. For this, 48 tadpoles of *Leptodactylus fuscus* and *Scinax fuscovarius* at stage 28 Gosner were separated into four experimental groups (C0: 0.00mg/L; C1: 0.04mg/L, C2: 0.08mg/L and C3: 0.4mg/L of fipronil). Upon reaching stage 46 Gosner, they were euthanized, weighed and had their blood and liver removed (for toxicological analyses), and the animals were diaphanized (for analysis of the skeletal system). Regarding development, exposure to fipronil led to a change in metamorphosis time and a delay in the ossification process, not influencing body mass and hepatosomatic index in both species, however, it led to a decrease in body size and in the length of some bones of the posterior locomotor appendix of *L. fuscus*. Regarding toxicity, fipronil did not cause a genotoxic effect and led to an increase in the hepatic melanin area in both species, causing a negative effect on the survival of *S. fuscovarius*. Thus, we conclude that fipronil has the potential to change the metamorphosis time of anurans and causes a delay in the ossification process; it has no genotoxic effect on the analyzed species and generates hepatic responses by increasing the activity of melanomacrophages.

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

.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Anfíbios anuros e sua utilização como bioindicadores ambientais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* como modelo animal

Leptodactylus fuscus (Schneider, 1799) pertence a ordem Anura e a família Leptodactylidae (IUCN, 2022). A sua distribuição geográfica ocorre desde o Panamá até a Argentina, ocorrendo em toda a América do Sul podendo ser encontrada em até 1.700 metros de altitude (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Apresentam cerca de 44 – 47 milímetros de comprimento; dorso com coloração castanha esverdeada com pequenas manchas pretas esparsas; dorsolateralmente possuem seis pregas longitudinais; e região ventral branca (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020). Os membros posteriores apresentam proporção semelhante em relação ao restante do corpo, com a face inferior acinzentada ou esbranquiçada e superfície posterior da coxa com faixas longitudinais (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020). Apresentam a região gular branca onde nos machos são encontradas duas manchas enegrecidas laterais formadas pelos sacos vocais não inflados (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020).

Na fase larval, é caracterizada pelo corpo alongado e com coloração escura, com forma do corpo e focinho ovais em vista dorsal e corpo deprimido e focinho inclinado em vista lateral (Vaz-Silva *et al.*, 2020). A nadadeira dorsal é baixa com margem convexa, emergindo no terço posterior do corpo (Vaz-Silva *et al.*, 2020). Os olhos e narinas são dorsalmente posicionados (Vaz-Silva *et al.*, 2020). A cobertura da mandíbula superior apresenta formato de arco e a inferior de “V”, o disco oral é anteroventral, com papilas marginais longas, triangulares, unisseriadas, separadas por lacuna dorsal, apresentando uma fórmula dentária de 2(2)/3(1) (Vaz-Silva *et al.*, 2020).

Indivíduos dessa espécie apresentam hábito terrestre e noturno, e iniciam suas atividades reprodutivas logo nas primeiras chuvas, estendendo-se durante toda a estação chuvosa (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Nesse período os machos são extremamente territoriais, vocalizando para afastar os competidores e atrair as fêmeas (Lima *et al.*, 2006; Vaz-

Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Eles cavam tocas nas margens das poças temporárias e permanentes, onde realizam a cópula e as fêmeas depositam os ovos em ninhos de espuma, sendo que posteriormente a água da chuva inunda as tocas transportando os girinos recém eclodidos para a poça (Lima *et al.*, 2006; Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). De acordo com IUCN (2022) essa espécie não se encontra em um quadro preocupante de ameaça, devido principalmente a sua população presumivelmente grande e a sua adequada tolerância a diversos habitats o que a faz ser adaptável a mudanças ambientais.

Scinax fuscovarius (Lutz, 1925) está inserida na ordem Anura e pertence à família Hylidae (IUCN, 2022). Apresenta ampla distribuição geográfica na região meridional da América do Sul, incluindo Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai e Bolívia, podendo ser encontrada na faixa de até 2.000 metros de altitude (Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Apresenta tamanho corporal médio de 47 milímetros, com um corpo robusto com coloração dorsal amarela com manchas irregulares, região cranial larga e longa onde os tímpanos são arredondados e bem evidentes (Vaz-Silva *et al.*, 2020).

Na fase larval, é caracterizada pela forma do corpo oval e focinho arredondado em vista dorsal e corpo triangular e focinho inclinado em vista lateral (Vaz-Silva *et al.*, 2020). Os olhos são posicionados lateralmente e as narinas dorsolaterais (Vaz-Silva *et al.*, 2020). A cobertura da mandíbula superior apresenta forma em “M” e inferior em “V”, e o disco oral é posicionado anteroventralmente e apresenta fórmula dentária de 2(2)/3(1), sendo emarginado ventralmente, com papilas marginais cônicas, longas, unisseriadas, interrompidas por lacuna dorsal e papilas submarginais menores que as marginais, formando linhas na região lateral (Vaz-Silva *et al.*, 2020).

Essa espécie é altamente abundante e muito associada a áreas abertas como pastos, clareiras e brejos, podendo ser encontrada tanto em ambientes naturais quanto antropizados, uma vez que é altamente adaptável a ambientes alterados (Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Durante o período reprodutivo, vocalizam no solo ou empoleirados em vegetação arbustiva próxima a água, e após a cópula, a desova é depositada aderida à vegetação submersa em poças temporárias ou permanentes, ou em ambientes lênticos, sendo que passada a eclosão, os girinos já ficam em contato com a água onde se desenvolvem (Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2022). Assim como *L. fuscus*, segundo a IUCN (2022) essa espécie não se encontra em um quadro preocupante de ameaça, devido principalmente a sua população presumivelmente grande e a sua adequada tolerância a diversos habitats o que a faz ser adaptável a mudanças ambientais. Dessa forma, partindo das informações citadas anteriormente, ambas as espécies apresentam requisitos necessários para serem consideradas bons bioindicadores ambientais.

1.3. Metamorfose em anuros e o desenvolvimento do sistema esquelético

Durante o ciclo de vida, os anuros passam por um marcante e emblemático processo conhecido como metamorfose (Denver, 2013), caracterizado como um fenômeno pós-embrionário que marca a transição da fase larval para a adulta (Shi, 2000; Tata, 2006). Esse processo é desencadeado, regido e altamente dependente da ação dos hormônios tireoidianos, T4 (3,5,3',5'- Tetraiodotironina ou Tiroxina) e a sua forma metabolizada e mais ativa, T3 (3,5,3'- Triiodotironina), que atuam em praticamente todas as células, tecidos e órgãos desses animais durante o seu desenvolvimento, de forma direta e local através de fatores de transcrição conhecidos como receptores de hormônios tireoidianos (Shi, 2000; Brown, 2005; Tata, 2006; Brown; Cai, 2007).

A metamorfose pode ser dividida em três momentos: 1) Premetamorfose é o momento em que a embriogênese e o desenvolvimento e crescimento inicial do girino ocorre na ausência dos hormônios tireoidianos; 2) Prometamorfose refere-se ao momento em que os membros locomotores posteriores iniciam sua formação e desenvolvimento, apresentando um rápido e extensivo crescimento, ocorrendo também um aumento gradativo das concentrações endógenas de T3 e T4; 3) o momento do clímax é quando as concentrações endógenas dos hormônios da tireoide atingem seu ápice e os animais cessam a alimentação e a maioria das alterações morfológicas ocorrem rapidamente, sendo que a total regressão da cauda marca o final do processo de metamorfose e é quando os níveis séricos de T3 e T4 apresentam uma redução, ficando iguais aos de indivíduos adultos (Shi, 2000).

Três principais tipos de mudanças ocorrem durante a metamorfose, sendo todas desencadeadas e mediadas pelos hormônios tireoidianos: a reabsorção ou regressão de estruturas úteis para a fase larval, mas não para a fase adulta, compreendendo as brânquias e a cauda, ocorre através de mecanismos de morte celular e ação enzimática; a remodelação de células, tecidos e órgãos comuns a ambas as fases de vida, compreendendo componentes do sistema imune, eritrócitos, músculos, pele, componentes esqueléticos, pulmão, cérebro, fígado, pâncreas, intestino, e a forma do corpo que se altera, principalmente a região cefálica onde os olhos mudam de posição e há a remodelação da retina; e o surgimento e desenvolvimento de novas estruturas que não tem uso para a fase larval, mas sim para o adulto (desenvolvimento *De novo*), compreendendo as glândulas estomacais e da pele, e membros locomotores posteriores e anteriores, que inclui a formação de pele, nervos, vasos sanguíneos, músculos, cartilagens, ossos e medula óssea (Shi, 2000; Brown, 2005; Tata, 2006; Brown; Cai, 2007).

O desenvolvimento do sistema esquelético em anfíbios é relativamente diferente dos demais vertebrados, uma vez que os componentes desse sistema são formados em um processo pós embrionário, sendo dessa forma tardios, diferentemente da maioria dos demais vertebrados onde o esqueleto é formado durante o período embrionário propriamente dito (Shi, 2000; Rose, 2021). Durante a sua formação, os componentes ósseos dos anfíbios, principalmente anuros, passam por severos processos de remodelação e desenvolvimento *De novo* (Shi, 2000; Brown; Cai, 2007; Smirnov; Vassilieva, 2014), e assim como as demais estruturas do corpo, durante a metamorfose os ossos sofrem uma alta influência dos hormônios tireoidianos, que desencadeiam os processos de remodelação de alguns ossos do crânio e da coluna vertebral, assim como a formação dos ossos dos apêndices locomotores, e de outros ossos craniais (Brown; Cai, 2007; Smirnov; Vassilieva, 2014).

Outro fenômeno de extrema importância que é regido pelos hormônios tireoidianos no desenvolvimento do sistema esquelético é o processo de ossificação, que pode ocorrer de forma intramembranosa ou endocondral, responsável pela deposição mineral na matriz extracelular (Miura; Hanaoka; Togashi, 2008; Smirnov; Vassilieva, 2014), fazendo com que os ossos fiquem rígidos e possam realizar as funções de proteção de determinados órgãos, sustentar o corpo e atuam como reserva mineral (Miura; Hanaoka; Togashi, 2008). É interessante notar que a sequência de ossificação, que compreende a ordem que cada osso surge e se ossifica em cada espécie, é altamente variável dentro dos anuros, o que torna uma caracterização ou estabelecimento de um padrão altamente desafiador (Rose, 2021).

1.4.Fipronil

O fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) compõe uma nova classe de inseticidas pertencente ao grupo químico dos fenilpirazois (Agrofit, 2022; Gupta; Anadón, 2018). Foi desenvolvido pela empresa francesa Rhone-Poulenc Agro entre 1985 e 1987, sendo lançado no mercado pela primeira vez em 1993 (Narahashi *et al.*, 2010; Tingle *et al.*, 2003), e a partir de então, passou a ser usado amplamente em vários locais do mundo.

Esse composto com ação neurotóxica atua no alvo através do contato ou ingestão (Tingle *et al.*, 2003). Seu modo de ação se dá bloqueando os canais de cloreto regulados por ácido gama-aminobutírico (GABA) nos neurônios, levando a uma hiperexcitação no sistema nervoso e consequente paralisia e morte do organismo alvo (Gunasekara *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015; Gupta; Anadón, 2018.). Além de atuar nos receptores GABA, o fipronil apresenta alta afinidade por canais de cloreto controlados por glutamato, presentes apenas em

invertebrados protostômios, fazendo com que esse inseticida seja altamente seletivo para invertebrados, o que o torna muito eficaz (Narahashi *et al.*, 2010; Wolstenholme, 2012).

A popularidade desse composto aumentou muito nas últimas décadas (Simon-Delso *et al.*, 2015) devido ao fato de que: 1) grande parte dos insetos considerados pragas desenvolveram um certo grau de resistência aos inseticidas antecessores do fipronil (organofosforados, carbamatos, piretróides, hidrocarbonetos clorados e reguladores de crescimento em insetos) (Gunasekara *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015); 2) da sua seletividade a invertebrados, apresentando um amplo espectro e alta letalidade em baixas concentrações, eliminando tanto as fases adultas quanto as larvas (Tingle *et al.*, 2003; Gunasekara *et al.*, 2007); 3) da sua grande persistência ambiental o que demanda poucas aplicações; e da sua ação sistêmica (Tingle *et al.*, 2003; Simon-Delso *et al.*, 2015). Esse inseticida é muito utilizado na veterinária, atuando no combate de ectoparasitas na forma de *spray*, e na agricultura no combate de pragas e tratamento do solo (Gupta; Anadón, 2018) com uma alta versatilidade de modos de aplicação (Bonmatin *et al.*, 2015), onde suas formulações incluem grânulos dispersíveis em água (WG), microgrânulos (GR), concentrado solúvel (SC), volume ultra baixo (ULV) e sólido fluido (FS) (Tingle *et al.*, 2003).

O fipronil apresenta meia vida entre 36 horas a 7 meses dependendo das condições do substrato, uma vez que o processo responsável pela degradação é muito variável (Tingle *et al.*, 2003). No ambiente são encontrados principalmente cinco subprodutos advindos da sua degradação, sendo *fipronil-sulfone*, *fipronil-sulfide*, *fipronildesulfinyl*, *fipronil-amide*, e *fipronil-detrifluoromethylsulfinyl*, onde três principais processos são os responsáveis pela degradação (Gunasekara *et al.*, 2007). A hidrólise é variável segundo o pH e em temperatura de 22°C, sendo estável em meio ácido (pH 5-6) e neutro (pH 7), condições normalmente encontradas no ambiente, e aumentando segundo a alcalinidade, sendo altamente instável em meio básico (Tingle *et al.*, 2003; Gunasekara *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015). Assim, em condição ambiental esse não é considerado o principal meio de degradação (Gunasekara *et al.*, 2007). A fotólise é variável segundo o substrato, uma vez que é relativamente lenta em solo, com meia vida de aproximadamente 34 dias (Tingle *et al.*, 2003). Já em solução aquosa, a meia vida é de aproximadamente 4 horas em exposição à luz xênon em laboratório (Tingle *et al.*, 2003). A degradação microbiana é relativamente lenta tanto em meio aeróbico no solo quanto anaeróbico em água (Tingle *et al.*, 2003).

Partindo da premissa que em meio natural o fipronil está sujeito a diversos fatores ambientais e meios de degradação, seu comportamento pode variar no ambiente. No solo, o fipronil apresenta alta afinidade pelas partículas e têm de baixa a moderada sorção, fazendo

com que o potencial de lixiviação seja quase inexistente uma vez que sua mobilidade é relativamente baixa (Tingle *et al.*, 2003; Gunasekara *et al.*, 2007).

Os meios de degradação se dão por fotólise em porções mais próximas à superfície, e ação microbiana em camadas mais profundas (Gunasekara *et al.*, 2007). Dessa forma, dependendo das condições do solo a meia vida do fipronil pode variar de quatro meses a um ano (Tingle *et al.*, 2003).

Em meio aquático, a persistência do fipronil é variável, dependendo de temperatura, pH, incidência de luz e ação microbiana, sendo que a fotólise atua mais na degradação do que a hidrólise (Gunasekara *et al.*, 2007; Bonmatin *et al.*, 2015). Esse composto é pouco solúvel em água (Tingle *et al.*, 2003), entretanto é importante enfatizar que em produtos formulados, a adição de surfactantes balanceia essa característica (Bonmatin *et al.*, 2015).

O fipronil apresenta um baixo potencial de volatilização, e devido a esse fator sua forma gasosa fica presente no ambiente por um curto período, não sendo regularmente encontrado no ar (Gunasekara *et al.*, 2007; Bonmatin *et al.*, 2015). É de importância citar que outro fator que influencia na meia vida e persistência desse composto no ambiente é vinculado a suas formulações (Tingle *et al.*, 2003). Dessa forma, definir a exata meia vida e persistência do fipronil em ambiente natural é desafiador, entretanto, levando-se em conta todas as características, esse composto é considerado persistente no ambiente (Tingle *et al.*, 2003; Gunasekara *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015).

O fipronil é o ingrediente ativo de uma alta gama de formulados (Agrofit, 2022). Entre esses, o Regent[®] 800 WG é classificado como extremamente tóxico e muito perigoso para o meio ambiente, sendo utilizado para o controle de várias pragas no cultivo de batata, milho e cana-de-açúcar (Agrofit, 2022), sendo que as duas últimas caracterizam a região noroeste do estado de São Paulo. Sua forma de ação ocorre através do contato ou ingestão, sendo aplicado por via terrestre ou aérea (Agrofit, 2022), podendo dessa forma ser transportado e encontrado em ambientes aquáticos onde pode afetar a biota local.

Devido às características de amplo espectro, persistência ambiental e metabólitos tóxicos, a contaminação ambiental por fipronil representa um risco para vários organismos não alvo (Simon-Delso *et al.*, 2015; Van Der Sluijs *et al.*, 2015). Aliado a esses fatores, o crescente uso deste composto tem gerado preocupações sobre suas consequências sobre ecossistemas e seus componentes, uma vez que tem levado a contaminação de solos e ambientes aquáticos vinculados a agricultura, levando a exposição de diversos organismos que habitam esses locais (Van Der Sluijs *et al.*, 2015). Com relação aos vertebrados que são afetados por esse composto, o impacto pode se dar de forma direta por contato ou indiretamente por influência na rede trófica

(Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015). O fipronil é considerado altamente tóxico para organismos aquáticos, com destaque para peixes (Tingle *et al.*, 2003; Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015). Atualmente, poucos estudos foram realizados avaliando a toxicidade desse inseticida sobre anfíbios, e levando-se em conta o quadro de declínio populacional que esses se encontram e as características do fipronil citadas acima, é de extrema importância a investigação dos seus efeitos sobre esses animais.

1.5. Células sanguíneas e melanomacrófagos hepáticos como biomarcadores

Biomarcadores são tipicamente definidos como medidas quantitativas das mudanças em um sistema biológico, atuando como alerta prévio de um efeito iminente ou espelhando respostas de exposições a um ou mais xenobióticos (Lam; Gray, 2003; Burlibaça; Gavrila, 2011). Essas alterações podem ocorrer em parâmetros estruturais e funcionais a nível celular, bioquímico, molecular e fisiológico, sendo avaliados em moléculas, fluidos corporais, células, tecidos e órgãos (Lam; Gray, 2003; Barni *et al.*, 2007; Burlibaça; Gavrila, 2011). Os biomarcadores podem ser classificados de duas formas: os biomarcadores de exposição que são alterações biológicas indicativas de exposição a xenobióticos, podendo não estar diretamente associadas com danos tóxicos no organismo alvo; e os biomarcadores de efeito, referentes às alterações que ocorrem no organismo causadas diretamente pela exposição a um xenobióticos (Lam; Gray, 2003).

Nesse sentido, significativas correlações têm sido realizadas entre a contaminação, tanto ambiental quanto em laboratório, e alterações em células sanguíneas de peixes, anfíbios e répteis (Brani *et al.*, 2007). Devido a esse fato, nas últimas décadas têm ocorrido um crescente interesse nos efeitos genotóxicos causados por poluentes ambientais (Burlibaça; Gavrila, 2011), com destaque para os anfíbios como modelo animal por apresentarem o seu sangue como um tecido muito plástico e indicativo de *stress* ambiental (Barni *et al.*, 2007), acarretando no desenvolvimento de inúmeras técnicas que visam a sua investigação, como o teste de aberração cromossômica, o teste de troca de cromátides irmãs (SCE); o teste cometa; e o teste de micronúcleo, sendo que os dois últimos são os mais utilizados para a detecção de efeito genotóxico causado por contaminantes no ambiente devido a sua facilidade de realização, por serem rápidos e por sua alta sensibilidade (Burlibaça; Gavrila, 2011).

Assim, análises de amostras sanguíneas têm sido utilizadas como biomarcadores subletal de efeitos genotóxicos eritrocitários (Lajmanovich *et al.*, 2014; Natale *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2019; Gregório *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2019), onde

inúmeros trabalhos *in situ* e *ex situ* vêm demonstrando o potencial que ambientes perturbados pela agricultura e a exposição a pesticidas tem em causar danos genotóxicos em anuros, tanto em estágio larval quanto em adultos (Babini *et al.*, 2016; Pollo *et al.*, 2016; Cruz-Esquivel *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2017; Natale *et al.*, 2018; Benvindo-Souza *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2019; Gregório *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2019), sendo que investigação do núcleo de hemácias visando o teste de micronúcleo e a busca de anomalias nucleares, como células binucleadas, anucleadas, com BUD, com núcleo reniforme e apoptótico têm sido muito utilizada para análise dos efeitos de xenobióticos, que acabam induzindo o aumento na frequência dessas anormalidades e consequente dano ao DNA (Lajmanovich *et al.*, 2014; Natale *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2019; Gregório *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2019; De Arcaute *et al.*, 2014; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014).

De forma semelhante, o fígado é um órgão considerado como biomarcador para xenobióticos, pois apresenta um papel fundamental na biotransformação desses compostos, envolvendo tanto os hepatócitos quanto as células de Kupffer que atuam por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Fenoglio *et al.*, 2005). As células de Kupffer em vertebrados ectotérmicos apresentam melanina em seus citoplasmas, sendo conhecidos também como melanomacrófagos, e são localizadas nas paredes endoteliais dos sinusóides hepáticos estando em contato direto com a corrente sanguínea, apresentando intenso envolvimento no processo de detoxificação devido a uma combinação de biotransformação enzimática e uma ação neutralizadora realizada pela melanina (Fenoglio *et al.*, 2005). Dessa forma, vários trabalhos têm demonstrado o papel dos melanomacrófagos em atuarem como biomarcadores de contaminação por agrotóxicos em anfíbios anuros tanto em fase larval quanto em adultos (Çakici, 2015; Perez-Iglesias *et al.*, 2016; 2019; Assis *et al.*, 2021; Bach *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2021).

2- OBJETIVOS

2.1.Geral

Investigar os efeitos histopatológicos do fipronil sobre a tireoide e suas repercussões sobre o desenvolvimento larval, a morfologia do sistema esquelético e a genotoxicidade eritrocitária de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* até a metamorfose.

2.2.Específicos

Avaliar os efeitos do fipronil sobre (1) a sobrevivência, (2) o tempo de metamorfose, (3) os fatores biométricos (massa corporal, tamanho do corpo e índice hepatossomático), (4) o comprimento dos principais ossos longos, (5) a ossificação do sistema esquelético, (6) a genotoxicidade eritrocitária e (7) os melanomacrófagos hepáticos de *L. fuscus* e *S. fuscovarius*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Coleta e aclimação

Foram coletados girinos de duas espécies de anuro, *Leptodactylus fuscus* (n = 48; Figura 1A) e *Scinax fuscovarius* (n = 48; Figura 1B), (ICMBio 18573-2) durante o mês de novembro de 2019 na estação chuvosa na região em São José do Rio Preto – SP (20°52'09''S 49°19'04''W). A coleta foi realizada no período da manhã por meio de busca ativa, onde os espécimes foram alocados em sacos plásticos preenchidos com água da poça e encaminhados ao Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE). Visando a aclimação, os animais foram mantidos em bandejas plásticas (38,5 x 28,5 x 12 cm), preenchidas com 50% de água da poça e 50% de água sem cloro durante 24 horas, e em seguida nas mesmas bandejas preenchidas somente com água sem cloro a temperatura ambiente ($27,5 \pm 0,5$ C°) e com iluminação natural (12 horas luz; 12 horas escuro) por mais 48 horas. Todos os procedimentos realizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (n°. 219/2020 – CEUA – IBILCE/UNESP).

Figura 1 – Exemplares de *L. fuscus* (A) e *S. fuscovarius* (B) evidenciando características morfológicas de cada espécie



3.2.Preparo da solução mãe de Fipronil e concentrações experimentais

Para o experimento foi utilizado o formulado comercial Regent[®] 800WG, que apresenta em sua composição 80% do ingrediente ativo fipronil. Visando a obtenção das devidas concentrações de fipronil para serem utilizadas durante os experimentos, foi preparada uma solução mãe de fipronil, mediante a diluição de 100mg de Regent[®] 800WG em dois litros de água sem cloro com auxílio de um agitador magnético, ficando essa na concentração de 40mg/L. Após a diluição, a solução foi armazenada em frascos âmbar embrulhados com papel laminado para evitar a exposição a luz e guardada em local refrigerado.

Para a escolha das concentrações utilizadas no presente trabalho, tomamos por base os trabalhos mais recentes que investigaram os efeitos do fipronil sobre anfíbios anuros, com modificações (Margarido *et al.*, 2013; Gripp *et al.*, 2017; Boscolo *et al.*, 2017; Rutkoski *et al.*, 2021), e definimos três concentrações: uma baixa (0,04mg/L); uma média (0,08mg/L, referente ao dobro da baixa); e uma alta (0,4mg/L, 10 vezes o valor da baixa). Com essas concentrações foi possível inferir sobre os efeitos do fipronil em uma ampla faixa das concentrações.

Para o preparo das soluções utilizadas nos grupos experimentais, foi utilizada a fórmula de diluição de concentrações específicas ($C_i.V_i = C_f.V_f$), que visou identificar o volume inicial (V_i) de solução mãe a ser adicionada a cada grupo experimental completando o volume final (V_f) de quatro litros por caixa dos tratamentos. Para esse cálculo, a concentração inicial (C_i) foi a da solução mãe e as concentrações finais (C_f) foram as concentrações definidas para cada tratamento (0,04mg/L; 0,08mg/L e 0,4mg/L).

3.3.Experimento com Fipronil (Regent[®] 800WG)

Os animais no estágio 28 Gosner (1960) foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (C0: controle, sem exposição ao fipronil; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil), constituídos por três caixas (três réplicas por grupo experimental), que foram preenchidas com quatro litros de água sem cloro (controle) e solução de fipronil (tratamentos) a temperatura ambiente, mantendo-se a proporção de um animal por litro, resultando em 12 animais por grupo experimental. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente ($27,5 \pm 0,5$ C°) e com iluminação natural (12 horas luz; 12 horas escuro), sendo as trocas de água e reagente, aferimento da temperatura e alimentação (com ração comercial para peixes carnívoros) realizadas a cada 48 horas.

Ao longo do experimento, os animais que atingiram o estágio 42 Gosner foram transferidos, cada um, para uma caixa plástica (um animal por caixa) contendo 100mL de água sem cloro para o grupo controle e 100mL de solução de fipronil nas devidas concentrações para cada grupo tratado. Essa transferência foi necessária pois nesse estágio os animais iniciam a transição para o ambiente terrestre, e um recipiente com grande volume de água poderia levá-los a óbito por afogamento, comprometendo assim as futuras análises.

Ao atingirem o estágio 46 Gosner, os animais foram eutanasiados em benzocaína 5g/L, pesados em balança analítica de precisão (*Bel Engineering Mark 500*, classe II) e tiveram sua região ventral aberta para a retirada de sangue (com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha não heparinizada) e do fígado. Posteriormente, os demais órgãos da região ventral e a pele foram removidos e os espécimes foram fixados em formol 10% (não tamponado) durante 48 horas e armazenados em álcool 70%, sendo então desidratados em série alcoólica e encaminhados para o processo de diafanização adaptado de Taylor (1985) onde, com o auxílio da enzima pancreatina tiveram a maior parte de seus tecidos moles digeridos (i.e músculos), possibilitando a visualização dos ossos e cartilagens que foram corados por *Alizarin Red* (ossos) e *Alcian Blue* (cartilagens).

Após esse processo, os animais foram mantidos em glicerina 100%, e então observados em estereomicroscópio (Leica MZ16) tendo imagens capturadas, com auxílio de uma câmera acoplada (Leica DFC295), do corpo e do esqueleto axial e apendicular.

3.4. Análises

3.4.1. Análise de desenvolvimento e mortalidade

A análise do desenvolvimento englobou a avaliação do tempo de metamorfose, tamanho e massa corporal, e valor do índice hepatossomático. Para o tempo de metamorfose, foram analisados dois estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner (1960), estágios 42 (caracterizado por animais que apresentam ambos os membros locomotores, dianteiros e traseiros já formados, a cauda ainda presente e aparato bucal não diferenciado, similar ao da fase larval) e 46 (caracterizado pela total reabsorção da cauda e completa diferenciação do aparato bucal, como de um indivíduo adulto), onde foi registrado o número de dias que cada animal levou para os atingir. Foi avaliado também o número de dias decorridos entre os dois estágios analisados.

O cálculo do índice hepatossomático, segundo Brusle; Anadon (1996), foi realizado a partir da relação entre a massa do fígado (pesado após ser removido, em balança analítica de precisão (*Bel Engineering Mark 500*, classe II)) e a massa corpórea dos animais (aferida logo após a eutanásia) multiplicada por 100. Para a mensuração do comprimento corpóreo, a partir da imagem dos animais diafanizados em vista dorsal, com auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi medido da região distal do crânio até a porção distal da cintura pélvica, seguindo a linha sagital medial (Figura 2A).

Para a análise de mortalidade, durante o experimento foram registrados os números de indivíduos mortos em cada grupo para determinar a porcentagem de óbitos por grupo experimental. Os animais mortos foram fixados em formol 10% e incluídos no material testemunho do Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE).

3.4.2. Análise do sistema esquelético

Para essa análise, composta pela morfometria dos ossos longos e pela ossificação, foi mantido como padrão os apêndices do lado esquerdo do corpo. A partir das imagens capturadas do esqueleto apendicular, com auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi realizada a mensuração do comprimento dos maiores ossos longos que compõem os apêndices locomotores anterior (úmero e radioulnar) e posterior (fêmur, tibiofibula, calcâneo e astrágalo), indo da metáfise proximal até a metáfise distal seguindo a linha sagital medial da peça óssea (Figura 2B). Ademais, foi avaliado o comprimento do apêndice em si, no qual o valor empregado foi obtido por meio da somatória do valor do comprimento dos ossos longos que os compõem.

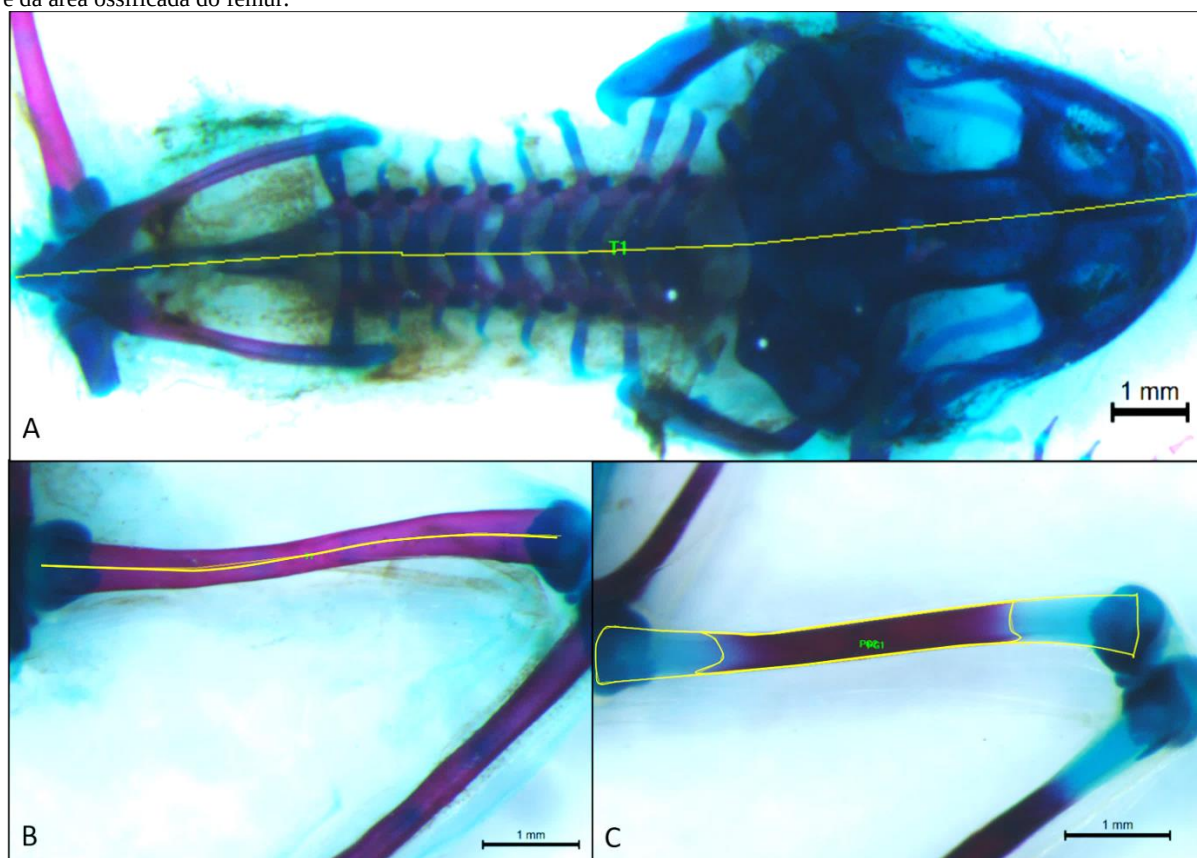
Visando a investigação da ossificação dos ossos dos apêndices locomotores (anterior: úmero e radioulnar; e posterior: fêmur, tibiofibula, calcâneo e astrágalo) e do esqueleto axial (coluna vertebral e cintura pélvica), foi realizada uma análise quantitativa referente a porcentagem de tecido mineralizado e/ou ossificado; e uma análise qualitativa a partir de categorias preestabelecidas. Essa metodologia é uma nova ferramenta que visa auxiliar na análise da ossificação e está detalhada a seguir:

Protocolo para análise da ossificação

Com as imagens capturadas dos animais diafanizados, utilizando o programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi mensurada a área total de cada osso e região analisada, e a área referente as

porções mineralizadas e/ou ossificadas (corada por *Alizarin Red*; Figura 2C). Todas as medições foram realizadas com os ossos em vista ventral, sendo que na coluna vertebral, as mensurações englobaram as áreas dos corpos vertebrais e dos três primeiros processos transversais, que representam a maior área em relação à coluna. Com esses valores, foi calculada a área relativa de ossificação (análise quantitativa) visando averiguar a variação da porcentagem de área mineralizada e/ou ossificada por peça óssea e região avaliadas nos animais estudados. O cálculo foi realizado a partir da relação entre a área ossificada/mineralizada e a área total da peça óssea ou região analisada multiplicada por 100.

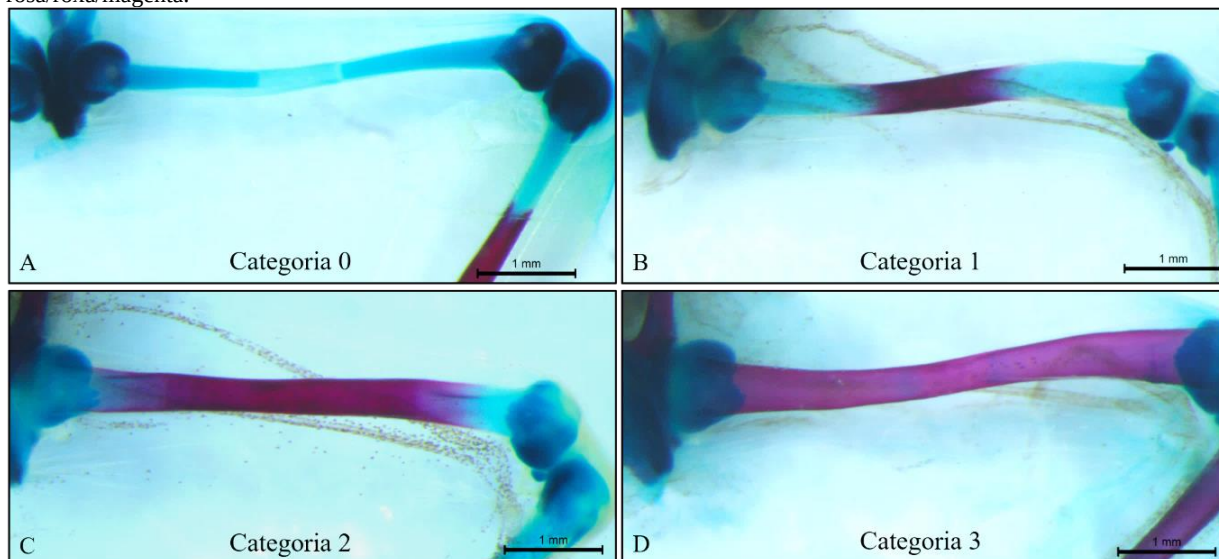
Figura 2 – Esqueleto diafanizado de *L. fuscus* demonstrando as medidas realizadas nos ossos longos, bem como a área de ossificação. A: mensuração do comprimento corporal dos animais seguindo a linha sagital medial do corpo; B: mensuração do comprimento do fêmur, da metáfise proximal até a distal seguindo a linha sagital medial dos ossos; C: mensuração da área total e da área ossificada do fêmur.



Com os valores obtidos da área relativa de ossificação foram definidas quatro categorias, visando estabelecer o grau de ossificação (análise qualitativa), sendo investigada a variação da frequência dessas nos animais estudados. Assim, cada osso e região analisadas foram classificados em uma das seguintes categorias de acordo com o grau de ossificação: categoria 0 - valor igual a 0%, representando ausência total de mineralização e/ou ossificação (Figura 3A); categoria 1 - valor maior que 0% e menor ou igual a 50%, representando uma mineralização e/ou ossificação de inicial a intermediária (Figura 3B); categoria 2 - valor maior que 50% e menor que 100%, representando uma mineralização e/ou ossificação de

intermediária a avançada (Figura 3C); categoria 3 - valor igual a 100%, representando uma mineralização e/ou ossificação total (Figura 3D).

Figura 3 – Fêmur de *L. fuscus* demonstrando o grau de ossificação. A: categoria 0 indicando ausência de região mineralizada. B, C e D: categorias 1, 2, 3 respectivamente, demonstrando níveis crescentes de ossificação representada pela região rosa/roxa/magenta.



3.4.3. Genotoxicidade eritrocitária

Com o sangue retirado da cavidade abdominal foram confeccionadas lâminas de esfregaço que foram fixadas em metanol a 4°C por 20 minutos seguida da coloração em uma solução de Giemsa 7,5% durante 15 minutos. A avaliação de anormalidades nucleares foi feita perante análise de 1000 eritrócitos por animal em microscópio de luz (Leica DM4000 B), com objetiva de 100x. O preparo e análise foi realizado de acordo com o protocolo seguido por Gregório *et al.* (2019). Foram contabilizados eritrócitos contendo núcleos normais, binucleados, anucleados, reniformes, apoptóticos, com BUD e com micronúcleo, sendo considerada na análise também a somatória de todas as anormalidades nucleares encontradas.

3.4.4. Quantificação da área de melanina hepática

Após a remoção, o fígado foi fixado em Metacarn (60% metanol, 30% ácido acético, 10% clorofórmio) por três horas à 4°C, sendo em seguida encaminhado para o processo de desidratação em série alcoólica. Após a desidratação, os órgãos foram incluídos em historesina (*Leica historesin embedding kit*) e foram seccionados (espessura de 2µm) com auxílio de um micrótomo rotativo (Leica RM2255).

As lâminas confeccionadas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e tiveram imagens capturadas em microscópio de luz (Leica DM 4000B) em objetiva de 20x. Foram analisados 25 campos histológicos aleatórios por animal através do programa *Image Pro-Plus* Versão 6.0 onde foi realizada a quantificação da área de melanina nos melanomacrófagos por diferença de intensidade de coloração. A metodologia aqui aplicada foi baseada nos protocolos estabelecidos por De Souza Santos *et al.* (2014) e Fanali *et al.* (2018).

3.4.5. Análise dos dados

Todos os dados foram analisados pelo *software* R versão 3.1.1 (*R Development Core Team*, 2010) com nível de confiança de 95%, sendo considerados significativos os valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$). Para avaliar se os dados obtidos nas análises da área de melanina hepática, biométricas e de morfometria óssea (variáveis resposta) eram influenciados pelos tratamentos (variável preditora com 4 níveis) foram utilizados modelos lineares. Os pressupostos de homogeneidade de variância e distribuição dos resíduos foram testados pelo método gráfico com o pacote *sjplot* (Lüdecke, 2016). Para a análise da variação do tempo de metamorfose (variável resposta), foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição *Poisson*. Já para a análise quantitativa da ossificação (variável resposta) foi utilizada um modelo linear generalizado com distribuição *Beta* e para a análise qualitativa foi utilizado um modelo linear generalizado para dados ordinais (*Cumulative link models*). Para a avaliação dos dados obtidos na análise de mortalidade, foi utilizado uma regressão logística e para a análise da genotoxicidade eritrocitária (variável resposta) foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição binomial. A condução das análises, bem como a escolha dos modelos foi de acordo com Da Silva *et al.* (2022).

4- RESULTADOS

A exposição ao fipronil (Regent® 800WG) provocou alterações no tempo de metamorfose; sobrevivência; morfometria óssea; no grau de ossificação e na área de melanina hepática em *Scinax fuscovarius* e *Leptodactylus fuscus*. Esses resultados foram agrupados e descritos em 2 manuscritos: 1) Influência da exposição ao Fipronil sobre o desenvolvimento larvário de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* com enfoque para o sistema esquelético. 2) Efeito da exposição ao Fipronil sobre a sobrevivência, melanina hepática e genotoxicidade eritrocitária em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* durante o desenvolvimento larvário.

Resultados

- Resultados dos fatores relacionados ao desenvolvimento.

Manuscrito 1: Influência da exposição ao Fipronil sobre o desenvolvimento larvário de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* com enfoque para o sistema esquelético.

-Resultados de toxicidade

Manuscrito 2: Efeito da exposição ao Fipronil sobre a sobrevivência, melanina hepática e genotoxicidade eritrocitária em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* durante o desenvolvimento larvário.

Resultados dos fatores relacionados ao desenvolvimento

Manuscrito 1: Influência da exposição ao Fipronil sobre o desenvolvimento larvário de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* com enfoque para o sistema esquelético.

Influência da exposição ao Fipronil sobre o desenvolvimento larvário de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* com enfoque para o sistema esquelético.

Gabriel da Cunha Canevari¹, Bruno Serra de Lacerda Valverde¹, Lilian Franco-Belussi³, Classius de Oliveira²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS. Central de Campo Grande. Centro. 79002970 - Campo Grande, MS – Brasil Telefone: (67) 33457391.

Resumo: A metamorfose em anuros é um processo onde os animais estão extremamente sensíveis, e distúrbios, como os causados por contaminantes, podem levar a alterações fisiológicas e morfológicas irreversíveis. O fipronil é um inseticida que vem gerando muitas preocupações por seus impactos sobre a biodiversidade, uma vez que seu uso vem aumentando muito nos últimos anos. Entre os principais fenômenos durante a metamorfose, há um destaque para a formação e remodelação do sistema esquelético. Assim, devido ao crescente uso do fipronil e ao fato de que a contaminação por esse poderia levar a distúrbios na metamorfose e efeitos deletérios em vários órgãos e sistemas, como o sistema esquelético, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do fipronil sobre o desenvolvimento durante a metamorfose, com destaque para o sistema esquelético. Para isso, 48 girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* no estágio 28 Gosner foram separados em quatro grupos experimentais (C0: 0,00mg/L; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil). Ao atingirem o estágio 46 Gosner, foram eutanasiados e, sendo em seguida diafanizados para a análise do sistema esquelético. A exposição ao fipronil levou à uma alteração no tempo de metamorfose e a um atraso no processo de ossificação, não influenciando a massa corpórea e o índice hepatossomático em ambas as espécies, entretanto, levou a uma diminuição no tamanho corporal e no comprimento de alguns ossos do apêndice locomotor posterior de *L. fuscus*. Dessa forma, baseado nos resultados observados, concluímos que o fipronil apresenta um potencial em alterar o tempo de metamorfose de anuros e acarreta em um atraso no processo de ossificação.

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

INTRODUÇÃO

O fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) compõe uma nova classe de inseticidas (Agrofit, 2022; Gupta; Anadón, 2018) e o seu crescente uso tem gerado preocupações sobre suas consequências sobre ecossistemas e seus componentes, uma vez que tem levado a contaminação de solos e ambientes aquáticos vinculados a agricultura, acarretando na exposição de diversos organismos que habitam esses locais (Van Der Sluijs *et al.*, 2015). Esse composto é considerado como altamente tóxico para organismos aquáticos, com destaque para peixes (Tingle *et al.*, 2003; Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015), entretanto até o presente momento, poucos estudos foram realizados avaliando a toxicidade desse inseticida sobre anuros (Reynaud *et al.*, 2012; Margarido *et al.*, 2013; Gripp *et al.*, 2017; Boscolo *et al.*, 2017; Rutkoski *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021; Saka; Tada, 2021; Freitas *et al.*, 2022).

Esses animais são considerados como excelentes bioindicadores por apresentarem uma alta gama de características que os tornam devidamente sensíveis às alterações ambientais, como a pele semi permeável altamente vascularizada e ovos sem casca que permitem o contato direto com poluentes; e um ciclo de vida bifásico que faz com que esses animais sejam dependentes tanto do meio aquático quanto terrestre, possibilitando a exposição a estressores em ambos os ambientes (Dunson; Wyman; Corbett, 1992; Qin; Xu, 2006; Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Zamora-Camacho, 2019). Ademais os girinos de anuros estão em contato constante com a água que circunda totalmente seus corpos, facilitando a exposição a contaminantes pela pele e principalmente pelas brânquias (Barni *et al.*, 2007). Além disso, é nesse momento que passam pelo processo de metamorfose, sofrendo um alto número de alterações em um curto período de tempo (Brande-Lavridsen; Christensen-Dalsgaard; Korsgaard, 2010). Assim, nesse estágio da vida esses animais apresentam um potencial ainda maior para serem utilizados como bioindicadores.

A metamorfose é um marcante e emblemático processo, caracterizado como um fenômeno pós-embrionário que marca a transição da fase larval para a adulta (Shi, 2000; Tata, 2006). Esse processo é desencadeado, regido e altamente dependente da ação dos hormônios tireoidianos, T4 (3,5,3',5'- Tetraiodotironina ou Tiroxina) e a sua forma metabolizada e mais ativa T3 (3,5,3'- Triiodotironina), que atuam em praticamente todas as células, tecidos e órgãos desses animais durante o seu desenvolvimento (Shi, 2000; Brown, 2005; Tata, 2006; Brown; Cai, 2007). Três principais tipos de mudanças ocorrem durante a metamorfose, sendo todas desencadeadas e mediadas pelos hormônios tireoidianos: a reabsorção ou regressão de estruturas úteis para a fase larval, mas não para a fase adulta; a remodelação de células, tecidos

e órgãos comuns a ambas as fases de vida; e o surgimento e desenvolvimento de novas estruturas que não tem uso para a fase larval, mas sim para o adulto (desenvolvimento *De novo*) (Shi, 2000; Brown, 2005; Tata, 2006; Brown; Cai, 2007).

Durante a metamorfose, o sistema esquelético dos anuros passam por severos processos de remodelação e de desenvolvimento *De novo* (Shi, 2000; Brown; Cai, 2007; Smirnov; Vassilieva, 2014), e assim como as demais estruturas do corpo, sofrem uma alta influência dos hormônios tireoidianos, que desencadeiam os processos de remodelação e formação, como os ossos dos apêndices locomotores (Smirnov; Vassilieva, 2014). Outro fenômeno de extrema importância que é regido pelos hormônios tireoidianos no desenvolvimento do sistema esquelético é o processo de ossificação, que pode ocorrer de forma intramembranosa ou endocondral, e é responsável pela deposição mineral na matriz extracelular (Miura; Hanaoka; Togashi, 2008; Smirnov; Vassilieva, 2014).

Assim, levando em conta a crescente preocupação que o uso do fipronil tem acarretado sobre a biodiversidade e a escassez de estudos avaliando o efeito desse composto sobre anfíbios anuros, que se apresentam altamente sensíveis durante o estágio larval e metamórficos, onde uma das alterações mais marcantes é a formação e remodelação do sistema esquelético, o presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da contaminação por fipronil sobre o desenvolvimento geral e do sistema esquelético em duas espécies nativas de anuros.

MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental

Foram coletados girinos de duas espécies de anuro, *Leptodactylus fuscus* (n = 48) e *Scinax fuscovarius* (n = 48), durante a estação chuvosa na região em São José do Rio Preto – SP (20°52'09''S 49°19'04''W). Visando a aclimação, os animais foram mantidos em laboratório em bandejas plásticas (38,5 x 28,5 x 12 cm), preenchidas com 50% de água do ambiente de coleta e 50% de água sem cloro durante 24 horas, e em seguida nas mesmas bandejas preenchidas somente com água sem cloro a temperatura ambiente por mais 48 horas.

Experimento com Fipronil (Regent® 800 WG)

Os animais no estágio 28 Gosner (1960) foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (C0: controle; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil),

cada um dividido em três caixas que foram preenchidas com quatro litros de água sem cloro (controle) e solução de fipronil (tratamentos) a temperatura ambiente, mantendo-se a proporção de um animal por litro, resultando em 12 animais por grupo. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente ($27,5 \pm 0,5$ C°) e com iluminação natural (12 horas luz; 12 horas escuro), sendo as trocas de água e reagente, aferimento da temperatura e alimentação (com ração comercial para peixes carnívoros) realizadas a cada 48 horas.

Ao longo do experimento, os animais que atingiram o estágio 42 Gosner foram transferidos, cada um, para uma caixa plástica (um animal por caixa) contendo 100mL de água sem cloro para o grupo controle e 100mL de solução de fipronil para cada grupo tratado, em suas respectivas concentrações. Essa transferência foi necessária pois nesse estágio os animais iniciam a transição para o ambiente terrestre, e um recipiente com grande volume de água poderia levá-los a óbito por afogamento.

Ao atingirem o estágio 46 Gosner, os animais foram eutanasiados em benzocaína 5g/L, pesados em balança analítica de precisão (*Bel Engineering Mark 500*, classe II) e tiveram sua região ventral aberta para retirada do fígado. Posteriormente os espécimes foram fixados em formol 10% (não tamponado) durante 48 horas e armazenados em álcool 70%, sendo então desidratados em série alcoólica e encaminhados para o processo de diafanização adaptado de Taylor (1985), onde com o auxílio da enzima pancreatina tiveram a maior parte de seus tecidos moles digeridos (i.e músculos) (para facilitar essa etapa, os órgãos da região ventral e a pele foram removidos), possibilitando a visualização dos ossos e cartilagens que foram corados por *Alizarin Red* (ossos) e *Alcian Blue* (cartilagens). Após esse processo, os animais foram mantidos em glicerina 100%, e então observados em estereomicroscópio (Leica MZ16) tendo imagens capturadas, com auxílio de uma câmera acoplada (Leica DFC295), do corpo e do esqueleto axial e apendicular.

Análise do Desenvolvimento

A análise do desenvolvimento englobou a avaliação do tempo de metamorfose, tamanho e massa corporal, e valor do índice hepatossomático. Para o tempo de metamorfose, foram analisados dois estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner (1960), estágios 42 (caracterizado por os animais apresentarem ambos os membros locomotores, dianteiros e traseiros já formados, a cauda ainda presente e aparato bucal não diferenciado, similar ao da fase larval) e 46 (caracterizado pela total reabsorção da cauda e completa diferenciação do aparato bucal, como de um indivíduo adulto), onde foi registrado o número de dias que cada

animal levou para os atingir. Foi avaliado também o número de dias decorridos entre os dois estágios analisados.

O cálculo do índice hepatossomático, segundo Brusle; Anadon (1996), foi realizado a partir da relação entre a massa do fígado (pesado após ser removido, em balança analítica de precisão (*Bel Engineering Mark 500*, classe II)) e a massa corpórea dos animais (aferida logo após a eutanásia) multiplicada por 100. Para a mensuração do comprimento corpóreo, a partir da imagem dos animais diafanizados em vista dorsal, com auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi medido o comprimento da região distal do crânio até a porção distal da cintura pélvica, seguindo a linha sagital medial.

Análise do Sistema esquelético

Para essa análise, composta pela morfometria dos ossos longos e da ossificação, foi mantido como padrão os apêndices do lado esquerdo do corpo. A partir das imagens capturadas do esqueleto apendicular, com auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi realizada a mensuração do comprimento dos maiores ossos longos que compõem os apêndices locomotores anterior (úmero e radioulnar) e posterior (fêmur, tibiofibula, calcâneo e astrágalo), indo da metáfise proximal até a metáfise distal seguindo a linha sagital medial da peça óssea. Ademais, foi avaliado o comprimento do apêndice em si, no qual o valor empregado foi obtido por meio da somatória do valor do comprimento dos ossos longos que os compõem.

Visando a investigação da ossificação dos ossos dos apêndices locomotores (anterior: úmero e radioulnar; e posterior: fêmur, tibiofibula, calcâneo e astrágalo) e do esqueleto axial (coluna vertebral e cintura pélvica), foi realizada uma análise quantitativa referente a porcentagem de tecido mineralizado e/ou ossificado; e uma análise qualitativa a partir de categorias preestabelecidas, descritas a seguir:

Com as imagens capturadas dos animais diafanizados, utilizando o programa *Image Pro-Plus 6.0*, foi mensurada a área total de cada osso e região analisada, e a área referente as porções mineralizadas e/ou ossificadas (corada por *Alizarin Red*). Todas as medições foram realizadas com os ossos em vista ventral, sendo que na coluna vertebral, as mensurações englobaram as áreas dos corpos vertebrais e dos três primeiros processos transversais, que representam a maior área em relação à coluna. Com esses valores, foi calculada a área relativa de ossificação (análise quantitativa) visando averiguar a variação da porcentagem de área mineralizada e/ou ossificada nos animais estudados. O cálculo foi realizado a partir da relação

entre a área ossificada/mineralizada e a área total da peça óssea ou região analisada multiplicada por 100.

Com os valores obtidos da área relativa de ossificação foram definidas quatro categorias, visando estabelecer o grau de ossificação (análise quantitativa), sendo investigada a variação da frequência dessas nos animais estudados. Assim, cada osso e região analisadas foram classificados em uma das seguintes categorias: categoria 0: valor igual a 0%, representando ausência total de mineralização e/ou ossificação; categoria 1: valor maior que 0% e menor ou igual a 50%, representando uma mineralização e/ou ossificação de inicial a intermediária; categoria 2: valor maior que 50% e menor que 100%, representando uma mineralização e/ou ossificação de intermediária a avançada; categoria 3: valor igual a 100%, representando uma mineralização e/ou ossificação total.

Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados pelo *software* R versão 3.1.1 (*R Development Core Team*, 2010) com nível de confiança de 95%, sendo considerados significativos os valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$). Para avaliar se os dados obtidos nas análises biométricas e de morfometria óssea (variáveis resposta) eram influenciados pelos tratamentos (variável preditora com 4 níveis) foram utilizados modelos lineares. Os pressupostos de homogeneidade de variância e distribuição dos resíduos foram testados pelo método gráfico com o pacote *sjplot* (Lüdecke, 2016). Para a análise da variação do tempo de metamorfose (variável resposta), foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição *Poisson*. Já para a análise quantitativa da ossificação (variável resposta) foi utilizada um modelo linear generalizado com distribuição *Beta* e para a análise qualitativa foi utilizado um modelo linear generalizado para dados ordinais (*Cumulative link models*).

RESULTADOS

Desenvolvimento

Em *Leptodactylus fuscus*, os espécimes expostos as três concentrações testadas apresentaram um atraso no tempo decorrido para atingirem o estágio 42 Gosner quando comparados ao grupo C0 (C0: $15,5 \pm 3,2$ dias; C1: $22,9 \pm 4,6$ dias - $P < 0,01$; C2: $21,7 \pm 3,7$ dias - $P < 0,01$; C3: $20,5 \pm 3,4$ dias - $P = 0,0213$). Com relação ao tempo demandado para

atingirem o estágio 46 Gosner, apenas os animais expostos a C1 apresentaram atraso em relação a C0 (C0: $20,1 \pm 3,2$ dias; C1: $26,5 \pm 5,2$ dias - $P = 0,0220$). Não foram observadas alterações significativas no intervalo de tempo entre o estágio 42 e 46 Gosner (Figura 4B).

Em relação aos dados biométricos, a massa corporal, não houveram alterações significativas, assim como o valor do índice hepatossomático, entretanto, com relação ao comprimento do corpo, os animais expostos a C3 apresentaram uma diminuição significativa em comparação ao grupo C0 (C0: $14,9 \pm 0,4$ mm; C3: $13,7 \pm 0,7$ mm - $P < 0,01$), não havendo alterações nas demais concentrações (Tabela 1).

Em *Scinax fuscovarius*, os espécimes expostos a C2 apresentaram um adiantamento no tempo decorrido para atingirem o estágio 42 Gosner em comparação a C0 (C0: $24,2 \pm 7,7$ dias; C2: $20 \pm 7,3$ dias - $P = 0,0493$), não tendo sido observadas alterações significativas nas demais concentrações avaliadas. Não foram observadas alterações significativas em nenhuma das concentrações avaliadas em relação ao tempo demandado para os animais atingirem o estágio 46 Gosner, assim como o intervalo entre os estágios analisados (Figura 4A). Não foram observadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros biométricos e concentrações analisadas (Tabela 1).

Figura 4 – Tempo, em dias, decorrido para atingir os estágios 42 e 46 Gosner em cada grupo experimental. (A) – *S. fuscovarius*; e (B) – *L. fuscus*. As letras (a ; b) indicam variação estatisticamente significativa entre os animais do tratamento com o controle.

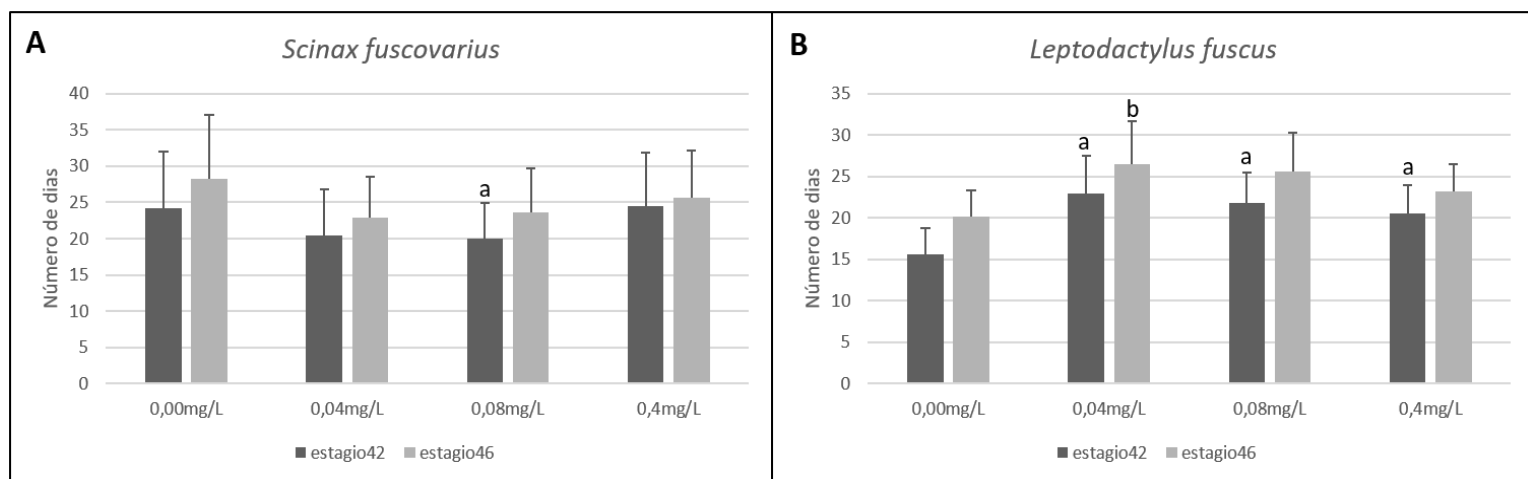


Tabela 1 – Índices biométricos avaliados por espécie e grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: tratamento referente a concentração de 0,08mg/L; C3: tratamento referente a concentração de 0,4mg/L; HIS: índice hepatossomático. *: diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle da mesma espécie ($P < 0,05$).

Espécie	Grupo	Massa corpórea	HIS	Tamanho corporal
<i>S.fuscovarius</i>	C0	$0,34 \pm 0,15$ mg	$2,88 \pm 0,53$ %	$14,54 \pm 2,02$ mm
	C1	$0,25 \pm 0,12$ mg	$3,38 \pm 0,74$ %	$13,36 \pm 1,79$ mm
	C2	$0,21 \pm 0,11$ mg	$3,33 \pm 0,41$ %	$12,85 \pm 1,93$ mm
	C3	$0,20 \pm 0,08$ mg	$2,62 \pm 0,23$ %	$12,47 \pm 1,48$ mm
<i>L.fuscus</i>	C0	$0,35 \pm 0,03$ mg	$5,22 \pm 0,68$ %	$14,90 \pm 0,44$ mm
	C1	$0,31 \pm 0,07$ mg	$4,44 \pm 1,16$ %	$14,23 \pm 0,79$ mm
	C2	$0,31 \pm 0,04$ mg	$4,84 \pm 0,65$ %	$14,39 \pm 0,65$ mm
	C3	$0,29 \pm 0,05$ mg	$4,55 \pm 1,09$ %	$13,76 \pm 0,73$ mm *

Sistema esquelético

Em *L. fuscus*, com relação à morfometria, houve uma diminuição significativa no comprimento do fêmur (C0: $5,4 \pm 0,2$ mm; C3: $4,9 \pm 0,3$ mm - $P = 0,0212$), do calcâneo (C0: $2,9 \pm 0,1$ mm; C3: $2,7 \pm 0,1$ mm - $P = 0,0320$) e do astrágalo (C0: $2,7 \pm 0,1$ mm; C3: $2,5 \pm 0,1$ mm - $P = 0,0211$) apenas nos animais expostos a C3, não tendo sido observadas alterações significativas no comprimento da tibiofibula e nos ossos do apêndice anterior. Quando avaliado o comprimento dos apêndices em si, não foram observadas alterações significativas (Tabela 2).

Com relação a análise da área relativa de ossificação (quantitativa), o apêndice locomotor posterior apresentou uma diminuição significativa na porcentagem de ossificação do fêmur (C0: $98,7 \pm 2,7\%$; C1: $59,3 \pm 23,3\%$ - $P < 0,01$; C2: $60,6 \pm 20,7\%$ - $P < 0,01$; C3 $50,6 \pm 20,2\%$ - $P < 0,01$), da tibiofibula (C0: $97,3 \pm 4,1\%$; C1: $46,9 \pm 20,3\%$ - $P < 0,01$; C2 $51,8 \pm 17,9\%$ - $P < 0,01$; C3: $37,3 \pm 12,5\%$ - $P < 0,01$), do calcâneo (C0: $96,1 \pm 3,8\%$; C1: $20 \pm 22,5\%$ - $P < 0,01$; C2: $21,9 \pm 27,3\%$ - $P < 0,01$; C3: $6,6 \pm 8,3\%$ - $P < 0,01$) e do astrágalo (C0: $94 \pm 8,1\%$; C1: $13,4 \pm 17,6\%$ - $P < 0,01$; C2: $18 \pm 28,7\%$ - $P < 0,01$; C3: $4,6 \pm 6,1\%$ - $P < 0,01$) em animais expostos as três concentrações quando comparados a C0 (Tabela 3; Figura 8).

Dos ossos que compõem o apêndice locomotor anterior, o úmero apresentou uma diminuição significativa da porcentagem de ossificação nas três concentrações de fipronil avaliadas (C0: $88 \pm 11,8\%$; C1: $44,5 \pm 18,3\%$ - $P < 0,01$; C2: $51,4 \pm 24,2\%$ - $P < 0,01$; C3: $34,5 \pm 21,4\%$ - $P < 0,01$), enquanto o radioulnar apresentou uma diminuição apenas nos animais expostos a C3 em comparação a C0 (C0: $96,3 \pm 5\%$; C3: $34,4 \pm 43,3\%$ - $P = 0,0117$). Com

relação ao esqueleto axial, ambas as regiões da coluna vertebral (C0: $96,6 \pm 3,2\%$; C1: $87,4 \pm 5,1\%$ – $P < 0,01$; C2: $89,8 \pm 4,5\%$ – $P < 0,01$; C3: $86,5 \pm 4,4\%$ – $P < 0,01$) e da cintura pélvica (C0: $79,3 \pm 11,6\%$; C1: $38,7 \pm 16,3\%$ – $P < 0,01$; C2: $48,1 \pm 17,6\%$ – $P < 0,01$; C3: $31,9 \pm 14,6\%$ – $P < 0,01$) apresentaram diminuição na porcentagem de ossificação em animais expostos as três concentrações de fipronil avaliadas quando comparadas a C0 (Tabela 3; Figura 8).

Na análise do grau de ossificação (qualitativa), houve um aumento significativo na frequência das categorias 2, 1 e 0 em todos os ossos do apêndice locomotor posterior em animais expostos às três concentrações testadas quando comparados a C0, havendo aumento das categorias 2 e 1 no fêmur (C1: $P < 0,01$; C2: $P = 0,0138$; C3: $P < 0,01$), da categoria 1 na tibiofibula (C1: $P < 0,01$; C2: $P < 0,01$; C3: $P < 0,01$), das categorias 1 e 0 no calcâneo (C1: $P < 0,01$; C2: $P < 0,01$; C3: $P < 0,01$), e astrágalo (C1: $P < 0,01$; C2: $P < 0,01$; C3: $P < 0,01$). Com relação os ossos do apêndice locomotor anterior, houve aumento na frequência das categorias 1 e 0 quando comparados a C0, sendo que o úmero apresentou um aumento significativo na frequência da categoria 1 em animais expostos a C1 ($P = 0,0345$) e C3 ($P = 0,0101$), enquanto o radioulnar apresentou aumento significativo na frequência da categoria 0 apenas em animais expostos a C3 ($P = 0,0130$). Ambas as regiões analisadas que compõem o esqueleto axial não apresentaram alterações significativas (Figura 5).

Em *S. fuscovarius*, com relação à morfometria, não foram observadas alterações significativas tanto no comprimento dos ossos de ambos os apêndices quanto no comprimento dos apêndices em si (Tabela 2).

Com relação a análise de área relativa do osso (quantitativa), o apêndice locomotor posterior apresentou uma diminuição significativa na porcentagem de ossificação apenas na tibiofibula dos animais expostos a C3 quando comparados a C0 (C0: $97,3 \pm 4,1\%$; C3: $37,3 \pm 12,5\%$ – $P = 0,0281$), não havendo alterações significativas nos demais ossos que o compõem. Não houve alteração significativa nos ossos do apêndice locomotor anterior e nas regiões do esqueleto axial (Tabela 3; Figura 7).

Na análise do grau de ossificação (qualitativa), houve um aumento significativo na frequência da categoria 0 em todos os ossos analisados do apêndice locomotor posterior quando comparados a C0, sendo que no fêmur ($P = 0,0194$), no calcâneo ($P = 0,0360$) e no astrágalo ($P = 0,0367$) houve aumento apenas em animais expostos a C2, enquanto a tibiofibula apresentou um aumento apenas em animais expostos C3 ($P = 0,0136$). Não houveram alterações significativas na frequência das categorias nos ossos que compõem o apêndice locomotor anterior e nas regiões do esqueleto axial (Figura 6).

Tabela 2 – Comprimento dos apêndices locomotores e dos ossos longos analisados por espécie e grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: tratamento referente a concentração de 0,08mg/L; C3: tratamento referente a concentração de 0,4mg/L. *: diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle da mesma espécie ($P < 0,05$).

Espécie	Grupo	Úmero	Radioulnar	Apêndice locomotor anterior	Fêmur	Tibiofibula	Calcâneo	Astrágalo	Apêndice locomotor posterior
<i>S. fuscovarius</i>	C0	2,87 ± 0,35mm	2,03 ± 0,33mm	4,9 ± 0,72mm	6,08 ± 1,18mm	6,92 ± 1,33mm	3,61 ± 0,77mm	3,15 ± 0,61mm	16,61 ± 3,28mm
	C1	2,65 ± 0,41mm	1,86 ± 0,34mm	4,51 ± 0,75mm	5,49 ± 1,01mm	6,23 ± 1,10mm	3,41 ± 0,62mm	2,93 ± 0,50mm	15,14 ± 2,72mm
	C2	2,48 ± 0,39mm	1,72 ± 0,27mm	4,2 ± 0,66mm	5,02 ± 0,98mm	5,58 ± 1,11mm	3,09 ± 0,53mm	2,67 ± 0,42mm	13,7 ± 2,62mm
	C3	2,38 ± 0,32mm	1,65 ± 0,23mm	4,04 ± 0,54mm	4,84 ± 0,91mm	5,33 ± 0,91mm	2,99 ± 0,52mm	2,59 ± 0,39mm	13,17 ± 2,37mm
<i>L. fuscus</i>	C0	2,79 ± 0,13mm	1,87 ± 0,08mm	4,66 ± 0,18mm	5,4 ± 0,23mm	6,02 ± 0,29mm	2,97 ± 0,13mm	2,76 ± 0,15mm	14,4 ± 0,62mm
	C1	2,77 ± 0,20mm	1,77 ± 0,17mm	4,54 ± 0,35mm	5,15 ± 0,45mm	5,79 ± 0,69mm	2,8 ± 0,26mm	2,62 ± 0,24mm	13,75 ± 1,40mm
	C2	2,74 ± 0,17mm	1,83 ± 0,08mm	4,57 ± 0,24mm	5,19 ± 0,21mm	5,75 ± 0,27mm	2,84 ± 0,13mm	2,68 ± 0,13mm	13,8 ± 0,57mm
	C3	2,68 ± 0,12mm	1,73 ± 0,11mm	4,42 ± 0,17mm	4,94 ± 0,31mm*	5,67 ± 0,37mm	2,72 ± 0,16mm*	2,5 ± 0,17mm*	13,34 ± 0,82mm

Tabela 3: Porcentagens da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por espécie e grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: tratamento referente a concentração de 0,08mg/L; C3: tratamento referente a concentração de 0,4mg/L. *: diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle da mesma espécie ($P < 0,05$).

Espécie	Grupo	Apêndice locomotor anterior				Apêndice locomotor posterior				Esqueleto axial		
		Úmero	Radioulnar	Fêmur	Tíbiofibula	Calcâneo	Astrágalo	Coluna vertebral	Cintura pélvica			
<i>S. fuscovarius</i>	C0	46,71 ± 46,08%	44 ± 48,16%	65,18 ± 38,87%	67,83 ± 33,90%	45,85 ± 36,35%	43,57 ± 38,33%	65,55 ± 43,16%	45,34 ± 40,19%			
	C1	27,84 ± 36,10%	31,53 ± 43,12%	55,48 ± 27,02%	61,21 ± 29,62%	32,04 ± 21,66%	29,2 ± 20,26%	43,79 ± 36,65%	16,98 ± 26,16%			
	C2	26,78 ± 41,19%	27,6 ± 41,62%	22,87 ± 36,13%	26,25 ± 35,58%	15,14 ± 31,70%	12,68 ± 31,29%	33,93 ± 40,30%	13,8 ± 29,65%			
	C3	18,51 ± 25,39%	18,38 ± 28,99%	28,85 ± 30,44%	12,21 ± 27,32%*	4,13 ± 9,24%	2,77 ± 6,19%	54,04 ± 35,25%	10,26 ± 22,95%			
<i>L. fuscus</i>	C0	88 ± 11,86%	96,3 ± 5,09%	98,75 ± 2,71%	97,31 ± 4,14%	96,1 ± 3,85%	94,06 ± 8,17%	96,65 ± 3,21%	79,38 ± 11,62%			
	C1	44,51 ± 18,34%*	48,96 ± 31,55%	59,39 ± 23,39%*	46,97 ± 20,35%*	20,07 ± 22,55%*	13,42 ± 17,69%*	87,43 ± 5,12%*	38,78 ± 16,31%*			
	C2	51,4 ± 24,23%*	51,18 ± 34,10%	60,67 ± 20,76%*	51,81 ± 17,98%*	21,95 ± 27,37%*	18,04 ± 28,71%*	89,88 ± 4,55%*	48,14 ± 17,63%*			
	C3	34,53 ± 21,41%*	34,48 ± 43,33%*	50,67 ± 20,27%*	37,3 ± 12,57%*	6,68 ± 8,39%*	4,63 ± 6,12%*	86,51 ± 4,46%*	31,99 ± 14,64%*			

Figura 5 – Categorias de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por grupo experimental dos exemplares de *L. fuscus*. A: referente ao apêndice locomotor anterior. B: referente ao apêndice locomotor posterior. C: referente ao esqueleto axial. *: demonstra diferenças significativas entre o controle e os tratados de um mesmo osso ou região.

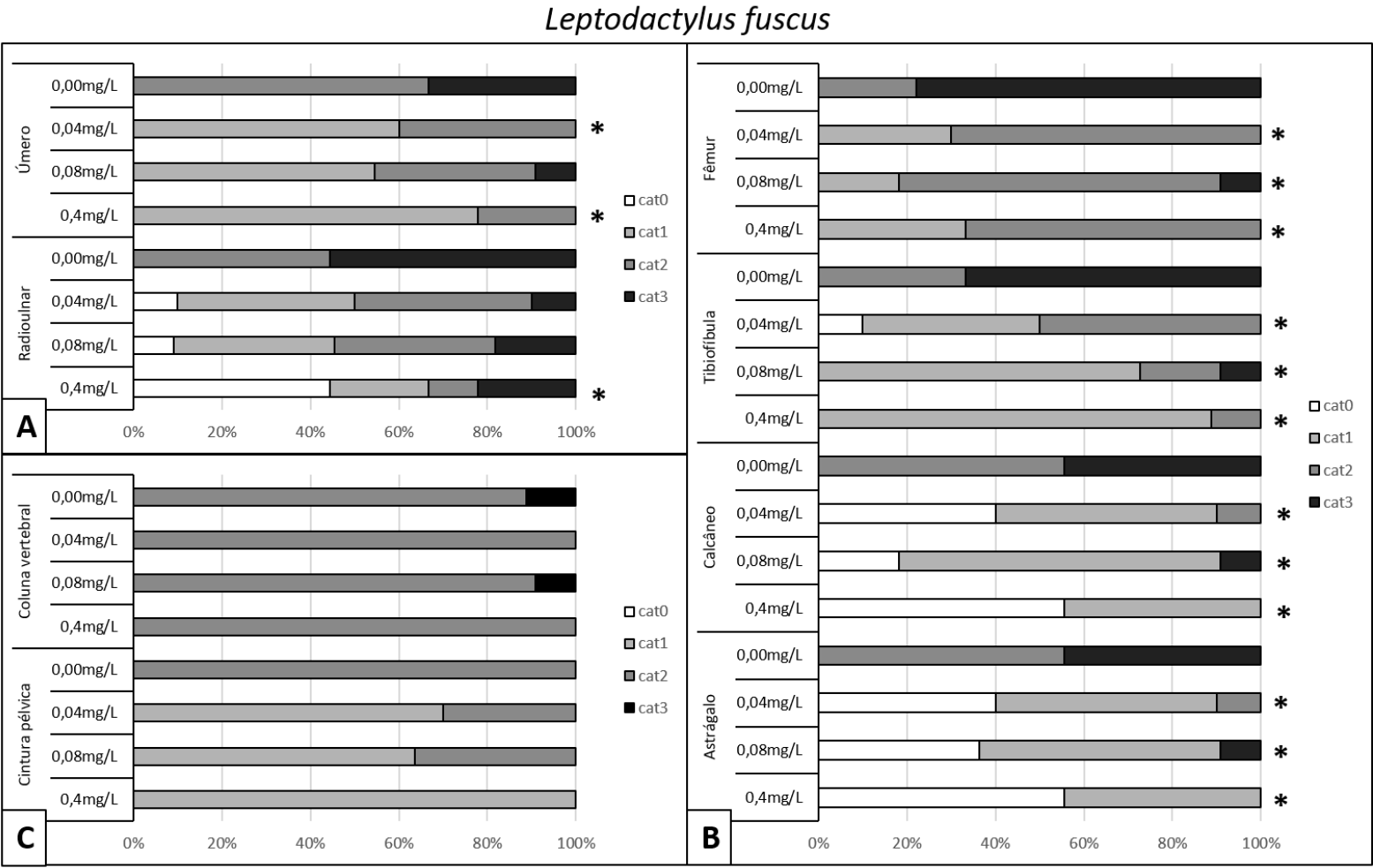


Figura 6 - Categorias de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas por grupo experimental dos exemplares de *S. fuscovarius*. A: referente ao apêndice locomotor anterior. B: referente ao apêndice locomotor posterior. C: referente ao esqueleto axial. *: demonstra diferenças significativas entre o controle e os tratados de um mesmo osso ou região.

Scinax fuscovarius

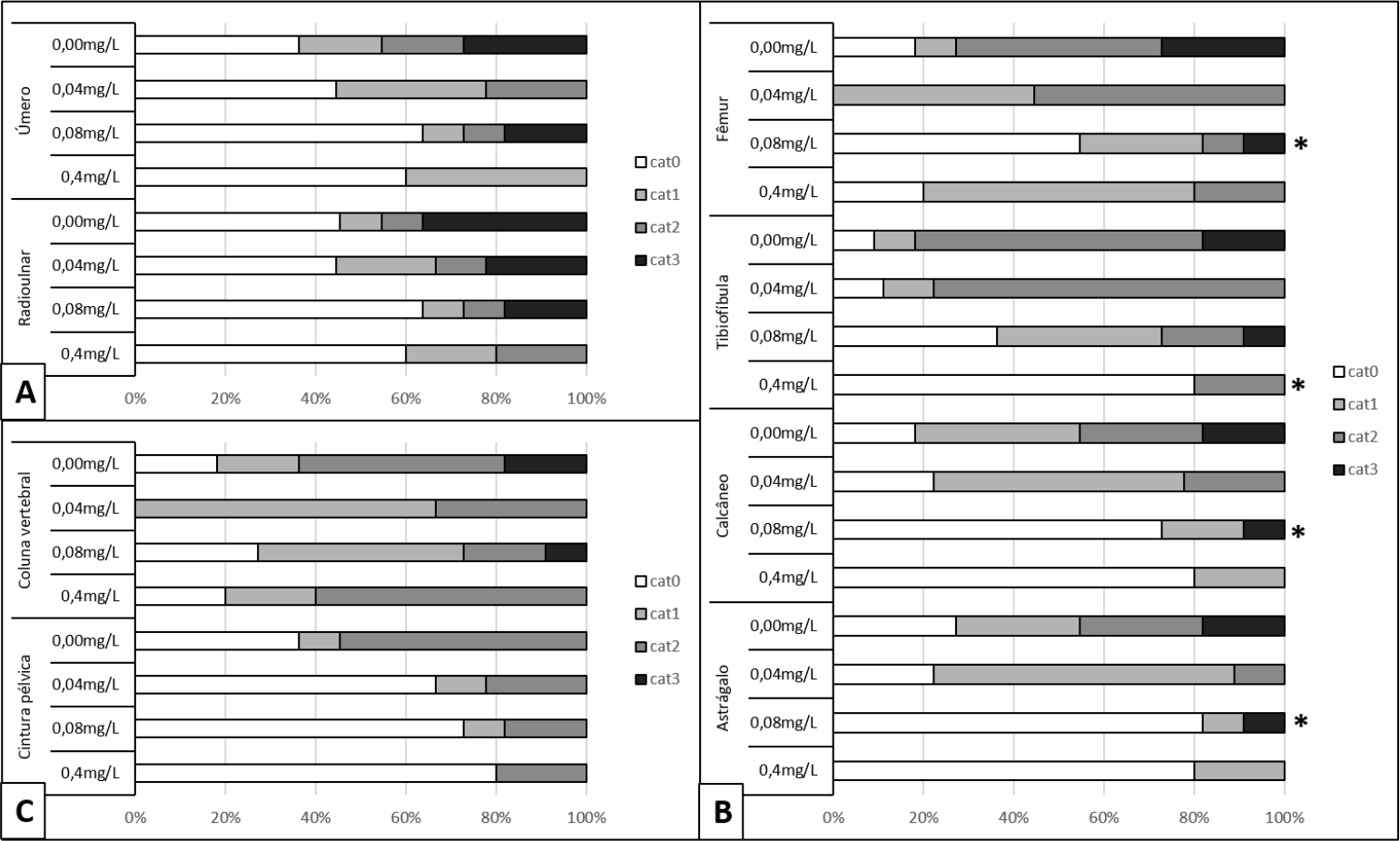


Figura 7 – Variação média da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas, dos indivíduos da espécie *S. fuscovarius*, por grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: concentração de 0,08mg/L; C3: concentração de 0,4mg/L. *: indica diminuição na área ossifica. Barras: 1mm.

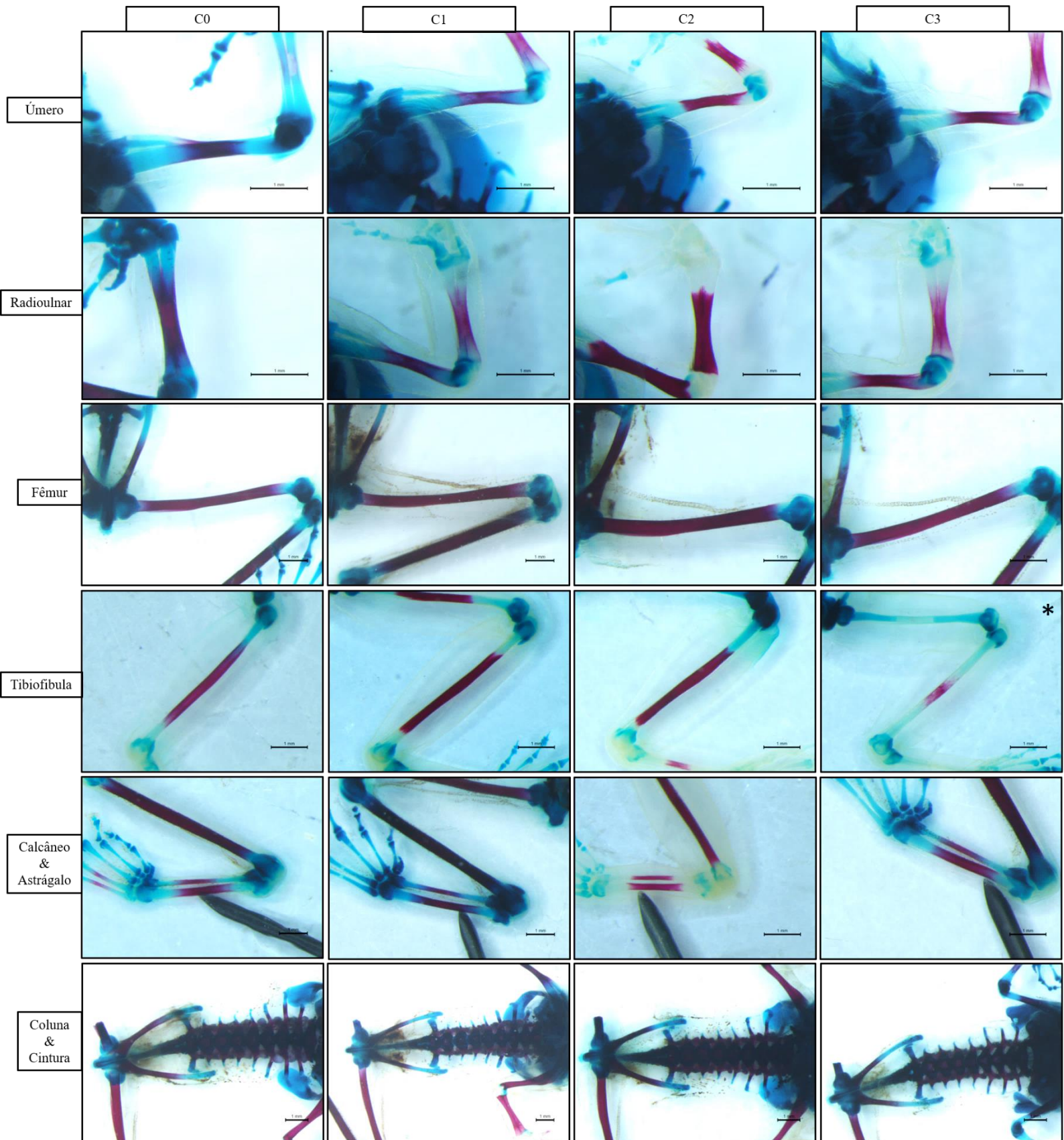
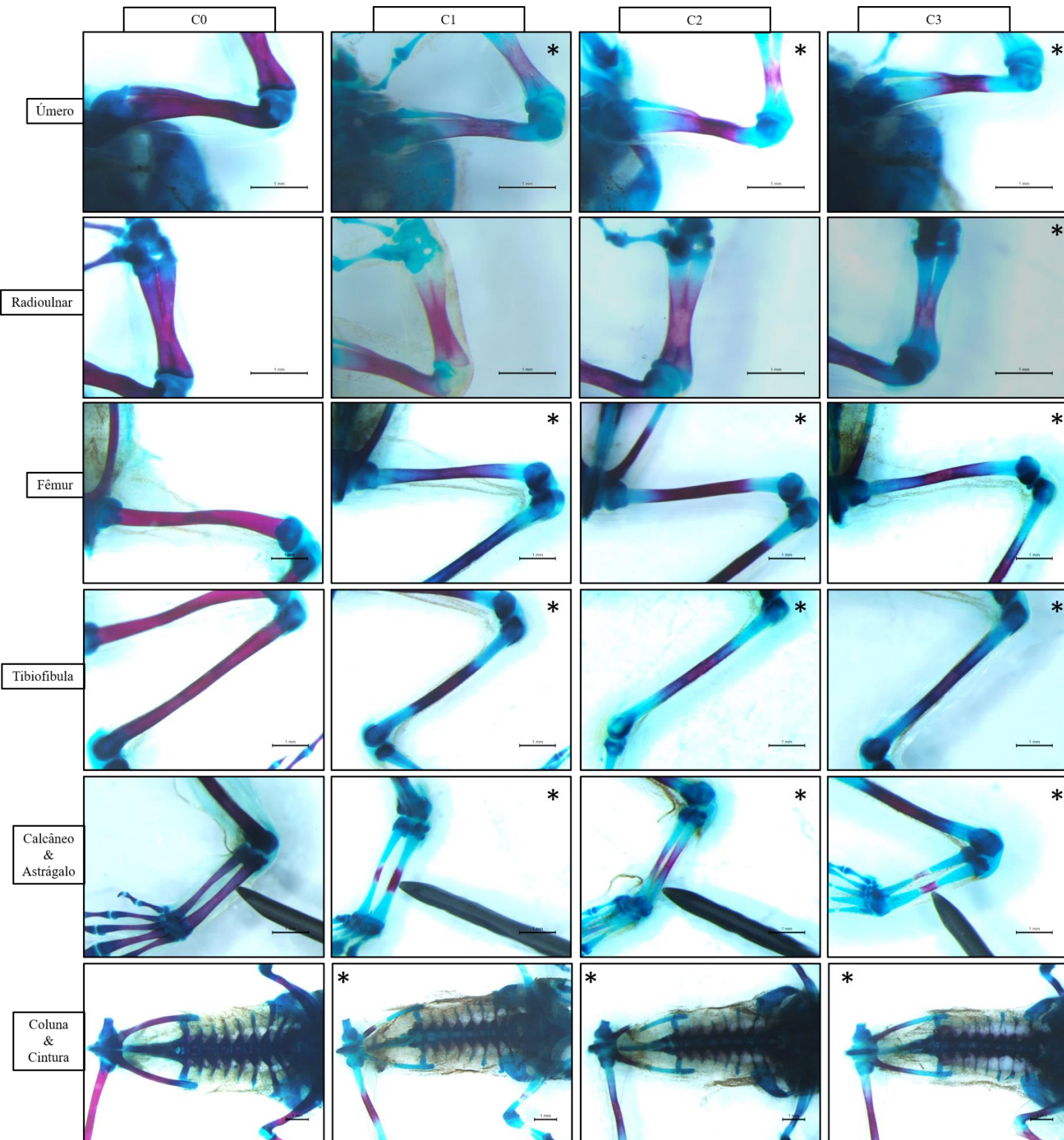


Figura 8 – Variação média da área relativa de ossificação dos ossos longos e regiões analisadas, dos indivíduos da espécie *L. fuscus*, por grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: concentração de 0,08mg/L; C3: concentração de 0,4mg/L. *: indica diminuição na área ossifica. Barras: 1mm.



DISCUSSÃO

A exposição ao fipronil levou a alterações no período da metamorfose em ambas as espécies, acarretando um atraso em *Leptodactylus fuscus* e a um adiantamento em *Scinax fuscovarius*. Durante o processo de metamorfose, os anuros passam por mudanças em um curto período de tempo, o que pode torná-los extremamente sensíveis a contaminação por xenobióticos, podendo sofrer alterações fisiológicas, comportamentais e morfológicas de caráter irreversível (Brande-Lavridsen; Christensen-Dalsgaard; Korsgaard, 2010).

Alterações no período de metamorfose já foram observadas em girinos de anuros expostos a fipronil. Boscolo *et al.* (2017) observaram que girinos de *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) expostos a 0,5mg/L e 1,5mg/L de fipronil durante sete dias apresentaram um adiantamento dose-dependente no período de metamorfose analisado (dos estágios 36 ao 40 Gosner). Em contrapartida, Saka; Tada (2021) ao expor girinos de *Silurana tropicalis* (Pipidae) a 0,015mg/L e 0,15mg/L de fipronil por 26-28 dias, não observaram nenhuma alteração no período de metamorfose analisado (prometamorfose tardio e início do clímax).

Quando comparados aos nossos resultados, observamos uma certa semelhança, uma vez que similar aos resultados observados por Boscolo *et al.* (2017), girinos de *S. fuscovarius* expostos a 0,08mg/L de fipronil mostraram um adiantamento no tempo para atingirem o estágio 42 Gosner, e semelhante aos resultados observados por Saka; Tada (2021), girinos de *S. fuscovarius* expostos a 0,04mg/L e 0,4mg/L não apresentaram alteração no tempo para atingir o estágio 42 Gosner, e girinos de ambas as espécies expostos a 0,08mg/L e 0,4mg/L não apresentaram alteração no tempo para atingir o estágio 46 Gosner. Um fator diferente que observamos no presente trabalho, quando comparado aos trabalhos anteriores, foi que indivíduos de *L. fuscus* apresentaram um atraso para atingir o estágio 42 Gosner em todas as concentrações testadas, e o estágio 46 Gosner em girinos expostos a 0,04mg/L.

Entretanto, certas nuances nos fatores analisados nos dois trabalhos citados e no nosso podem ser destacadas, como as espécies avaliadas, o estágio de desenvolvimento investigado, o tempo de exposição e as concentrações de fipronil utilizadas. Comparando todas essas variáveis, podemos deduzir que o fipronil não apresenta um efeito uniforme sobre o tempo de metamorfose em girinos de anuros contaminados, podendo atrasar, adiantar ou se quer causar alteração no tempo de metamorfose desses animais.

Efeitos similares já foram relatados em outros agrotóxicos, como a atrazina, onde Brodeur *et al.* (2009), ao expor anuros da espécie *Rhinella arenarum* observaram que animais expostos a 0,1mg/L tiveram o tempo para alcançar o estágio 42 Gosner diminuído, não havendo,

entretanto, influência no tempo para completar a metamorfose. Em contrapartida, quando expostos a 1mg/L houve um adiantamento no tempo para chegar ao estágio 42 Gosner, assim como para completar a metamorfose. Já nos animais expostos a 5mg/L, a atrazina não afetou o tempo para os animais atingirem o estágio 42 Gosner, porém houve um atraso no tempo para completar a metamorfose.

Com relação aos fatores biométricos vinculados ao desenvolvimento, a exposição ao fipronil acarretou uma diminuição no tamanho corporal dos indivíduos da espécie *L. fuscus* expostos a maior concentração testada, e não gerou modificações nos valores da massa corpórea e do índice hepatossomático das duas espécies. Trabalhos avaliando a exposição de anuros ao fipronil são escassos, e avaliam em sua maioria fatores bioquímicos (Margarido *et al.*, 2013; Gripp *et al.*, 2017; Boscolo *et al.*, 2017; Rutkoski *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2022) ou fisiológicos (Reynaud *et al.*, 2012), sendo que até o presente momento, apenas dois trabalhos investigaram parâmetros morfológicos em anuros contaminados por fipronil foram publicados.

Saka; Tada (2021) observaram resultados semelhantes aos nossos, ao expor girinos de *S. tropicalis* (Pipidae) a 0,015mg/L e 0,15mg/L de fipronil durante um teste crônico, onde não observaram alterações no comprimento corporal e na massa corpórea dos animais expostos. Também corroborando nossos dados, Santos *et al.* (2021) ao expor girinos de *Lithobates catesbeianus* as mesmas três concentrações de fipronil utilizadas por nosso trabalho, avaliando as respostas a contaminação após quatro períodos (4, 8, 12 e 16 dias), não observaram alterações no comprimento corporal e no índice hepatossomático, porém em contrapartida, observaram que animais expostos a 0,04mg/L no intervalo de 4 dias apresentaram uma diminuição da massa corporal, entretanto, essa alteração não foi observada nos demais intervalos de tempo analisados, e assim como os próprios autores sugerem, essa alteração foi ocasional e não linear, sendo mais provável que essa diminuição da massa corporal tenha relação com propriedades intrínsecas de cada animal do que com a contaminação por fipronil.

É importante ressaltar também que ambos os trabalhos citados investigaram os efeitos do fipronil até no máximo o início no clímax da metamorfose, onde os animais ainda não passaram por severas mudanças em sua morfologia e fisiologia, assim a diminuição no comprimento corporal apresentada por indivíduos de *L. fuscus* expostos a maior concentração avaliada em nosso trabalho podem estar relacionados a alterações nesse intervalo do clímax até a conclusão da metamorfose, que não foi investigada pelos trabalhos anteriores. Dessa forma, por mais que os resultados observados sejam similares, mais investigações dos efeitos do fipronil durante a metamorfose até animais pós-metamórficos são necessárias para uma melhor compreensão dos efeitos desse inseticida.

Com relação ao sistema esquelético, nenhum trabalho até o momento foi realizado investigando os efeitos do fipronil sobre os ossos, fazendo com que o nosso trabalho seja pioneiro nesse quesito. Assim, foram utilizados dados de outras espécies para ilustrar o padrão do desenvolvimento do sistema esquelético. Uma vez que *Xenopus laevis* e *L. catesbeianus* são as espécies modelo mais populares utilizadas em estudos que avaliam metamorfose e desenvolvimento (Brown, 2005; Brown; Cai, 2007), e ao fato de que *Xenopus tropicalis* também é muito utilizada em estudos de organogênese e desenvolvimento (Miura; Hanaoka; Togashi, 2008) essas três espécies foram usadas na comparação.

Durante o desenvolvimento do esqueleto axial, as vértebras pré-sacrais são as primeiras a sofrerem o processo de ossificação, seguido pelo sacro e pelas pós-sacrais (que se fundem e formam o uróstilo), seguindo um sentido ântero-posterior ao longo da coluna (Trueb; Hanken, 1992). As primeiras estruturas das vértebras que iniciam a ossificação são os arcos vertebrais, seguido pelos corpos das vértebras e por fim os processos transversais (Trueb; Hanken, 1992). As últimas partes do esqueleto a sofrerem ossificação são as cinturas e os apêndices (Trueb; Hanken, 1992). Com relação a cintura pélvica, o ílio começa sua ossificação pela porção posterior das hastes ilíacas (porção alongada do ílio), seguindo por todo o ílio e ísquio (Trueb; Hanken, 1992).

O apêndice locomotor posterior inicia sua ossificação primeiro que o apêndice locomotor anterior (Trueb; Hanken, 1992). Os ossos dos apêndices locomotores surgem e se desenvolvem ao longo da metamorfose dos brotos dos membros, que formam moldes de cartilagem dos ossos longos (Felisbino; Carvalho, 1999; Shi, 2000; Miura; Hanaoka; Togashi, 2008). Após os moldes de cartilagem serem formados, o processo de ossificação dos ossos longos ocorre por meio de um crescimento (hipertrofia) dos condrócitos no meio da diáfise, havendo uma diferenciação dos osteoblastos que mineralizam o pericôndrio e formam o primeiro centro de ossificação, conhecido como colar ósseo (Felisbino; Carvalho, 1999; Miura; Hanaoka; Togashi, 2008). Em seguida, por meio de ossificação intramembranosa do pericôndrio/periósteo, a ossificação ocorre para ambas as epífises, até que o osso cortical chegue até as metáfises (Felisbino; Carvalho, 1999; Miura; Hanaoka; Togashi, 2008). As epífises apresentam ossificação tardia, ocorrendo e concluindo após aproximadamente 2 anos do final da metamorfose, sendo a ossificação intramembranosa a principal forma de ossificação dos ossos longos (Felisbino; Carvalho, 1999,2001).

Baseado na ossificação normal descrita acima, em nosso trabalho, não observamos uma ossificação anormal, como sentido de ossificação invertido ou irregular, ou centros de ossificação em excesso, entretanto, observamos claramente que a exposição ao fipronil

acarretou um atraso no processo de ossificação em ambas as espécies investigadas. Em *L. fuscus* o fipronil causou uma redução na área mineralizada/ossificada de todos os ossos longos analisados e na região da coluna vertebral e cintura pélvica, aumentando a frequência de ossos que apresentam um grau de ossificação referente a um estado de desenvolvimento mais inicial. Além disso, foi observado uma diminuição no comprimento dos ossos longos do apêndice locomotor posterior. Já em *S. fuscovarius*, o fipronil levou à uma diminuição na área mineralizada/ossificada apenas da tibiofibula, havendo um aumento da frequência de grau de ossificação referente a um estado de desenvolvimento mais inicial apenas do fêmur, calcâneo e astrágalo, indicando que *S. fuscovarius* foi menos sensível a ação do fipronil na ossificação.

Entretanto, há uma segunda leitura para essa diferença entre as espécies. Anuros apresentam uma sequência de ossificação (referente à ordem e ao momento em que os ossos surgem e se ossificam em uma espécie) muito variável entre espécies e até mesmo dentro da mesma espécie (Rose, 2021). Dentro do controle de *L. fuscus* observamos uma sequência de ossificação padrão para todos os animais. Em contrapartida, o grupo controle de *S. fuscovarius* apresentou uma sequência de ossificação muito variável entre seus integrantes. Assim, essa variável sequência de ossificação que *S. fuscovarius* apresentou pode ter mascarado os efeitos do fipronil sobre a ossificação dos ossos e regiões analisadas, não sendo necessariamente essa menos sensível quando comparada a *L. fuscus*.

Embora o presente trabalho não tenha sido elaborado para investigar o mecanismo pelo qual o fipronil acarretou as alterações observadas, hipotetizamos que os efeitos observados em ambas as espécies analisadas podem ter sido causados por disfunções na tireoide. Trabalhos com roedores têm demonstrado um potencial que o fipronil apresenta em causar uma disfunção da tireoide, levando a uma diminuição nos níveis séricos de T3 e T4, associado ao aumento da degradação desses hormônios por ação enzimática do fígado (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012; Moser *et al.*, 2015; Ehsan *et al.*, 2016); e um potencial em causar danos morfológicos a própria glândula (Ferreira *et al.*, 2012; Ehsan *et al.*, 2016; Da Cunha *et al.*, 2017). Esses efeitos de diminuição nos níveis séricos dos hormônios tireoidianos também foram observados em *zebrafish* expostos à fipronil, sendo esse efeito transferidos para a prole (Xu *et al.*, 2019). Dessa forma, partindo da premissa de que a metamorfose e todos os seus fenômenos são altamente desencadeados e regidos pelos hormônios tireoidianos em anuros (Shi, 2000; Brown, 2005; Tata, 2006; Brown; Cai, 2007) e que a formação, remodelação e ossificação do sistema esquelético é altamente dependente de T4 e T3 (Brown; Cai, 2007; Smirnov; Vassilieva, 2014), hipotetizamos que a contaminação por fipronil pode ter levado a uma diminuição nos níveis séricos de T3 e T4 (muito provavelmente por ação enzimática do fígado que levou a degradação

desses compostos, como demonstrado pelos trabalhos com roedores e em *zebrafish*, e não por danos diretos na tireoide, uma vez que Saka; Tada (2021) observaram que girinos de *S. tropicalis* expostos a 0,15mg/L de fipronil não apresentaram dano morfológico na tireoide), acarretando em alterações sobre o tempo de metamorfose e atrasos no processo de ossificação.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados concluímos que a contaminação por fipronil tem o potencial de gerar alterações no tempo de metamorfose e atrasar o processo de ossificação durante esse fenômeno em indivíduos das espécies *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius*. Assim, este estudo traz pela primeira vez efeitos do fipronil sobre aspectos osteológicos de girinos durante a metamorfose e assim pode direcionar futuros estudos que visam avaliar efeitos do fipronil em anuros, tanto para estudos laboratoriais, quanto de campo.

Resultados toxicidade

Manuscrito 2: Efeito da exposição ao Fipronil sobre a sobrevivência, melanina hepática e genotoxicidade eritrocitária em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* durante o desenvolvimento larvário.

Efeito da exposição ao Fipronil sobre a sobrevivência, melanina hepática e genotoxicidade eritrocitária em *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* durante o desenvolvimento larvário.

Gabriel da Cunha Canevari¹, Bruno Serra de Lacerda Valverde¹, Lilian Franco-Belussi³, Classius De Oliveira^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS. Central de Campo Grande. Centro. 79002970 - Campo Grande, MS – Brasil. Telefone: (67) 33457391.

Resumo: Os anuros vêm sofrendo um declínio populacional nas últimas décadas e uma das principais causas atribuídas é a contaminação por agrotóxicos. O fipronil é um inseticida que vem gerando muitas preocupações por seus impactos sobre a biodiversidade, uma vez que seu uso vem aumentando muito nos últimos anos. Uma excelente forma de avaliar o impacto de contaminantes é o uso de biomarcadores, onde há um destaque para os componentes sanguíneos e melanomacrófagos hepáticos. Assim, devido ao crescente uso do fipronil e ao declínio que os anuros vêm sofrendo nos últimos anos, o objetivo do presente trabalho foi investigar as respostas tóxicas do fipronil sobre biomarcadores sanguíneos e hepáticos. Para isso, 48 girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Scinax fuscovarius* no estágio 28 Gosner foram separados em quatro grupos experimentais (C0: 0,00mg/L; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil). Ao atingirem o estágio 46 Gosner, foram eutanasiados e tiveram sangue e o fígado retirados para as análises toxicológicas. O fipronil não causou efeito genotóxico e levou a um aumento na área de melanina hepática em ambas as espécies, causando um efeito negativo sobre a sobrevivência de *S. fuscovarius*. Dessa forma, baseado nos resultados observados concluímos que o fipronil não apresenta efeito genotóxico nas espécies analisadas e gera respostas hepáticas aumentando a atividade dos melanomacrófagos.

Palavras-chave: Anuros, Mortalidade, Eritrócitos, Melanomacrófagos, Toxicidade.

INTRODUÇÃO

Desde de 1990 vem sendo colocado em pauta o fenômeno mundial de declínio populacional dos anfíbios (Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Wake; Koo, 2018), onde as principais causas atribuídas são a perda de seu hábitat natural que acaba sendo substituído por zonas agrícolas ou urbanas; e a poluição ambiental por xenobióticos orgânicos e inorgânicos (Hayes *et al.*, 2010; Blaustein *et al.*, 2011; Sumanasekara; Dissanayake; Seneviratne, 2015; Wake; Koo, 2018).

Esses animais apresentam uma alta gama de características que os tornam sensíveis às alterações ambientais, como a pele semipermeável altamente vascularizada e ovos sem casca que permitem o contato direto com poluentes; e um ciclo de vida bifásico que faz com que sejam dependentes tanto do meio aquático quanto terrestre, possibilitando a exposição em ambos os ambientes, sendo devido a essas características considerados excelentes bioindicadores (Dunson; Wyman; Corbett, 1992; Qin; Xu, 2006; Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Zamora-Camacho, 2019). Durante a fase larval, estão em contato constante com a água que circunda seus corpos, facilitando a exposição a contaminantes pela pele e principalmente pelas brânquias (Barni *et al.*, 2007). Além disso, é nesse momento que passam pelo processo de metamorfose, sofrendo um alto número de alterações e um curto período de tempo (Brandel-Lavridsen; Christensen-Dalsgaard; Korsgaard, 2010), apresentam um potencial ainda maior para atuar como bioindicadores.

Entre os diversos contaminantes que causam danos ambientais, há um destaque para o fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) cujo crescente uso tem gerado preocupações sobre suas consequências sobre ecossistemas e seus componentes, uma vez que tem levado a contaminação de solos e ambientes aquáticos vinculados à agricultura, acarretando na exposição de diversos organismos que habitam esses locais (Van Der Sluijs *et al.*, 2015). O fipronil é considerado como altamente tóxico para organismos aquáticos, com destaque para peixes (Tingle *et al.*, 2003; Gibbons; Morrissey; Mineau, 2015), porém poucos estudos foram realizados avaliando a toxicidade desse inseticida sobre anfíbios. Assim, levando-se em conta o quadro de declínio populacional que esses se encontram e as características do fipronil citadas acima é de extrema importância a investigação dos seus efeitos sobre esses animais.

Uma excelente ferramenta para avaliar o efeito de contaminantes em organismos são os biomarcadores, que atuando como alerta prévio de um efeito iminente ou espelhando respostas de exposições a um ou mais xenobióticos (Lam; Gray, 2003; Burlibaşa; Gavrilă, 2011), sendo

avaliados através de parâmetros estruturais e funcionais como moléculas, fluidos corporais, células, tecidos e órgãos (Lam; Gray, 2003; Barni *et al.*, 2007; Burlibaça; Gavrilă, 2011).

Nesse sentido, significativas correlações têm sido realizadas entre a contaminação, tanto ambiental quanto em laboratório, e alterações em células sanguíneas de peixes, anfíbios e répteis (Brani *et al.*, 2007), sendo desenvolvidas inúmeras técnicas que visam a sua investigação, onde o teste de micronúcleo é um dos mais utilizados por sua facilidade de realização, rapidez e alta sensibilidade (Burlibaça; Gavrilă, 2011).

Assim, análises de amostras sanguíneas têm sido utilizadas como biomarcadores de efeitos genotóxicos eritrocitários (Lajmanovich *et al.*, 2014; Natale *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2019; Gregório *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2019), onde inúmeros trabalhos vêm demonstrando o potencial que ambientes perturbados pela agricultura e a exposição a pesticidas tem em causar danos genotóxicos em anuros, tanto em estágio larval quanto em adultos (Babini *et al.*, 2016; Pollo *et al.*, 2016; Cruz-Esquivel *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2017; Natale *et al.*, 2018; Benvindo-Souza *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2019; Gregório *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2019).

De forma semelhante, o fígado apresenta uma alta atuação como biomarcador para xenobióticos, pois apresenta um papel fundamental na biotransformação desses compostos, envolvendo tanto os hepatócitos quanto as células de Kupffer que em vertebrados ectotérmicos apresentam melanina em seus citoplasmas, sendo conhecidos também como melanomacrófagos (Fenoglio *et al.*, 2005). Esses apresentam intenso envolvimento no processo de detoxificação advindo de uma combinação de biotransformação enzimática e ação neutralizadora realizada pela melanina (Fenoglio *et al.*, 2005). Dessa forma, vários trabalhos têm demonstrado o papel dos melanomacrófagos em atuarem como biomarcadores de contaminação por agrotóxicos em anfíbios anuros tanto em fase larval quanto em adultos (Çakici, 2015; Perez-Iglesias *et al.*; 2016;2019; Assis *et al.*, 2021; Bach *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2021).

Assim, levando em conta a crescente preocupação que o uso do fipronil tem acarretado sobre a biodiversidade, ao quadro de declínio populacional dos anuros e escassez de estudos avaliando o efeito desse composto sobre esses animais, que se apresentam altamente sensíveis durante o estágio larval e metamórfico, o objetivo do presente trabalho foi investigar a sobrevivência e utilizar a genotoxicidade eritrocitária e a quantificação de melanina hepática, dois excelentes biomarcadores, para avaliar os efeitos da contaminação por fipronil em animais de duas espécies nativas de anuros durante a fase larval e metamórfica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental

Foram coletados girinos de duas espécies de anuro, *Leptodactylus fuscus* (n = 48) e *Scinax fuscovarius* (n = 48), durante a estação chuvosa na região em São José do Rio Preto – SP (20°52'09''S 49°19'04''W). Visando a aclimatação, os animais foram mantidos em laboratório em bandejas plásticas (38,5 x 28,5 x 12 cm), preenchidas com 50% de água do ambiente de coleta e 50% de água sem cloro durante 24 horas, e em seguida nas mesmas bandejas preenchidas somente com água sem cloro a temperatura ambiente por mais 48 horas.

Experimento com Fipronil (Regent® 800 WG)

Os animais no estágio 28 Gosner (1960) foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (C0: controle; C1: 0,04mg/L, C2: 0,08mg/L e C3: 0,4mg/L de fipronil), cada um dividido em três caixas que foram preenchidas com quatro litros de água sem cloro (controle) e solução de fipronil (tratamentos) a temperatura ambiente, mantendo-se a proporção de um animal por litro, resultando em 12 animais por grupo. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente (27,5±0,5 C) e com iluminação natural (12h luz; 12h escuro), sendo as trocas de água e reagente, aferimento da temperatura e alimentação (com ração comercial para peixes carnívoros) realizadas a cada 48 horas.

Ao chegar no estágio 42 Gosner, os animais foram transferidos, cada um, para uma caixa plástica (um animal por caixa) contendo 100mL de água sem cloro para o grupo controle e 100mL de solução de fipronil para cada grupo tratado, em suas respectivas concentrações. Essa transferência foi necessária pois neste estágio os animais iniciam a transição para o ambiente terrestre, e um recipiente com grande volume de água poderia levar os espécimes ao afogamento.

Ao atingirem o estágio 46 Gosner, os animais foram eutanasiados em benzocaína 5g/L, tiveram sua região ventral aberta para a retirada de sangue e do fígado, sendo então fixados em formol 10% durante 48 horas sendo armazenados em álcool 70%.

Mortalidade

Durante o experimento foram registrados os números de óbitos em cada grupo para determinar a porcentagem de mortalidade por grupo experimental. Os animais mortos foram fixados em formol 10% e incluídos no material testemunho do Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE).

Genotoxicidade eritrocitária

Com o sangue retirado da cavidade abdominal foram montadas lâminas de esfregaço que foram fixadas em metanol a 4°C por 20 minutos seguida da coloração em uma solução de Giemsa 7,5% durante 15 minutos. A avaliação de anormalidades nucleares foi feita perante análise de 1000 eritrócitos por animal em microscópio de luz (Leica DM4000 B), com objetiva de 100x. Os procedimentos realizados foram feitos de acordo com o protocolo seguido por Gregório *et al.* (2019).

Foram contabilizados eritrócitos contendo núcleos normais, binucleados, anucleados, reniformes, apoptóticos, com BUD e com micronúcleo (Figura 10), sendo considerada na análise também a somatória de todas as anormalidades nucleares encontradas.

Área de melanina hepática

Após a remoção, o fígado foi fixado em Metacarn (60% metanol, 30% ácido acético, 10% clorofórmio) por três horas à 4°C, sendo em seguida encaminhado para o processo de desidratação em série alcoólica. Em seguida, os órgãos foram incluídos em historesina (Leica *historesin embedding kit*) e foram seccionados (espessura de 2µm) com auxílio de um micrótomo rotativo (Leica RM2255).

As lâminas confeccionadas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e tiveram imagens capturadas em microscópio de luz (Leica DM 4000B) em objetiva de 20x. Foram analisados 25 campos histológicos aleatórios por animal através do programa *Image Pro-Plus* Versão 6.0 onde foi realizada a quantificação da área de melanina nos melanomacrófagos por diferença de intensidade de coloração. A metodologia aqui aplicada foi baseada nos protocolos estabelecidos por De Souza Santos *et al.* (2014) e Fanali *et al.* (2018).

Análises estatísticas

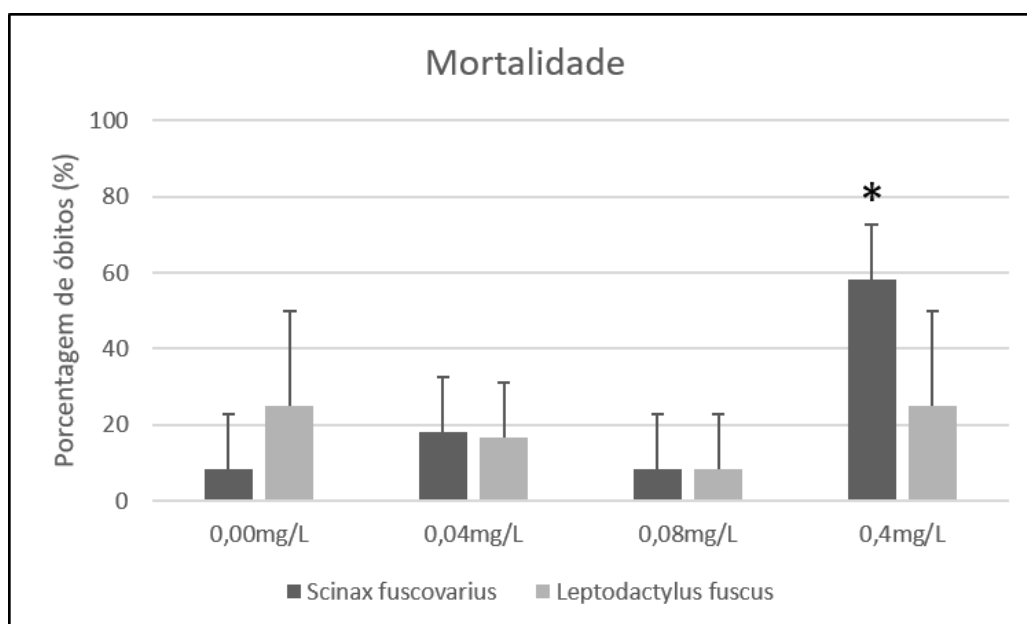
Todos os dados foram analisados pelo *software* R versão 3.1.1 (*R Development Core Team*, 2010) com nível de confiança de 95%, sendo considerados significativos os valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$). Para avaliar se os dados obtidos nas análises da área de melanina hepática (variável resposta) era influenciada pelos tratamentos (variável preditora com 4 níveis) foram utilizados modelos lineares. Os pressupostos de homogeneidade de variância e distribuição dos resíduos foram testados pelo método gráfico com o pacote *sjplot* (Lüdecke, 2016). Para a avaliação dos dados obtidos na análise de mortalidade, foi utilizado uma regressão logística e para a análise da genotoxicidade eritrocitária (variável resposta) foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição binomial.

RESULTADOS:

Mortalidade

A exposição às três concentrações de fipronil avaliadas não tiveram efeito significativo sobre a sobrevivência de *Leptodactylus fuscus*. Em contrapartida, em *Scinax fuscovarius*, animais expostos a C3 tiveram uma redução significativa em sua taxa de sobrevivência, havendo óbito de mais de 50% do grupo em relação a C0 ($P = 0,0101$), não tendo sido observado alterações significativas nas demais concentrações avaliadas (Figura 9).

Figura 9 – Porcentagens de óbitos por espécie e grupo experimental. *: diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle da mesma espécie ($P < 0,05$).



Genotoxicidade eritrocitária

Em *L. fuscus*, observamos uma diminuição significativa na frequência de eritrócitos anucleados nos animais expostos a C2 ($P < 0,01$) em relação a C0, não havendo alterações significativas nas demais concentrações e alterações nucleares analisadas. Quando analisada a somatória de todas as alterações, observamos uma diminuição significativa na frequência dessas nos animais expostos a C2 ($P = 0,0118$) e C3 ($P = 0,0214$) em relação a C0 (Tabela 4).

Em *S. fuscovarius*, observamos uma diminuição significativa na frequência de eritrócitos anucleados nos animais expostos a C1 ($P < 0,01$) e C3 ($P < 0,01$) em relação a C0, não havendo alterações significativas nas demais concentrações e alterações nucleares analisadas. Quando analisada a somatória de todas as alterações, observamos uma diminuição significativa na frequência dessas nos animais expostos a C1 ($P = 0,0184$) e C3 ($P = 0,0268$) em relação a C0 (Tabela 4).

Figura 10 – Anormalidades nucleares analisadas nos eritrócitos. A: eritrócito com micronúcleo (seta); B: BUD nuclear; C: eritrócito binucleado; D: eritrócito anucleado (seta); E: eritrócito com núcleo reniforme (seta); F: eritrócito apoptótico (seta).

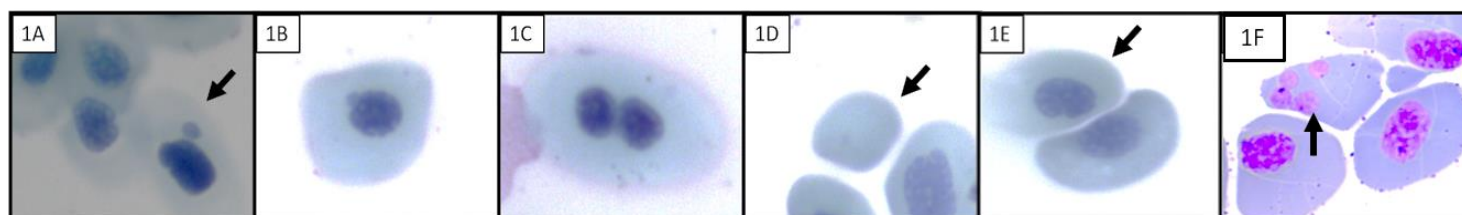


Tabela 4 – Frequência das anormalidades nucleares analisadas por espécie e grupo experimental. C0: grupo controle (0,00mg/L); C1: tratamento referente a concentração de 0,04mg/L; C2: concentração de 0,08mg/L; C3: concentração de 0,4mg/L. *: diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle da mesma espécie ($P < 0,05$).

Espécie	Grupo	Apoptótica	Micronúcleo	Binucleada	BUD	Reniforme	Anucleada	Total
<i>S. fuscovarius</i>	C0	0 ± 0	0 ± 0	0,09 ± 0,30	0,18 ± 0,40	0,36 ± 0,67	6,27 ± 4,24	6,9 ± 4,15
	C1	0 ± 0	0 ± 0	0,33 ± 0,70	0,33 ± 0,50	0,88 ± 1,16	2,22 ± 1,85*	3,77 ± 2,58*
	C2	0 ± 0	0,18 ± 0,60	0,09 ± 0,30	0 ± 0	0,54 ± 0,82	5 ± 5,51	5,81 ± 5,38
	C3	0 ± 0	0,20 ± 0,44	0,20 ± 0,44	0,20 ± 0,44	0,80 ± 1,30	1,8 ± 1,92*	3,20 ± 1,78*
<i>L. fuscus</i>	C0	0 ± 0	0,22 ± 0,44	0,55 ± 0,72	0,66 ± 1	1,22 ± 1,56	5,33 ± 4,74	8 ± 6,22
	C1	0 ± 0	0,20 ± 0,42	0,40 ± 0,69	0 ± 0	1,10 ± 0,99	4,90 ± 3,51	6,6 ± 3,53
	C2	0 ± 0	0 ± 0	0,27 ± 0,46	0,18 ± 0,40	1,63 ± 1,50	2,45 ± 2,54*	4,54 ± 2,91*
	C3	0 ± 0	0,11 ± 0,33	0 ± 0	0,11 ± 0,33	1 ± 1,32	3,33 ± 1,87	4,55 ± 1,94*

Área de melanina hepática

Em *L. fuscus*, observamos um aumento significativo na área de melanina hepática nos animais expostos a C2 e C3 em relação a C0 (C0: $239,1 \pm 145,3$; C2: $418,4 \pm 302,8$ – $P < 0,01$; C3: $365,7 \pm 228$ – $P < 0,01$; Figuras 11 e 12). Já em *S. fuscovarius*, houve, em relação a C0, uma diminuição significativa na área de melanomacrófagos hepáticos em animais expostos a C1 (C0: $127,8 \pm 107,1$; C1: $90,1 \pm 78,7$ – $P < 0,01$), e um aumento significativo em animais expostos a C3 (C0: $127,8 \pm 107,1$; C3: $134,5 \pm 64,1$ – $P = 0,0179$), não tendo sido observadas alterações nos animais expostos a C2 (Figuras 11 e 13).

Figura 11 – Área de melanina hepática por espécie e grupo experimental. As letras (a; b) indicam variação estatisticamente significativa entre os animais do tratamento com o controle.

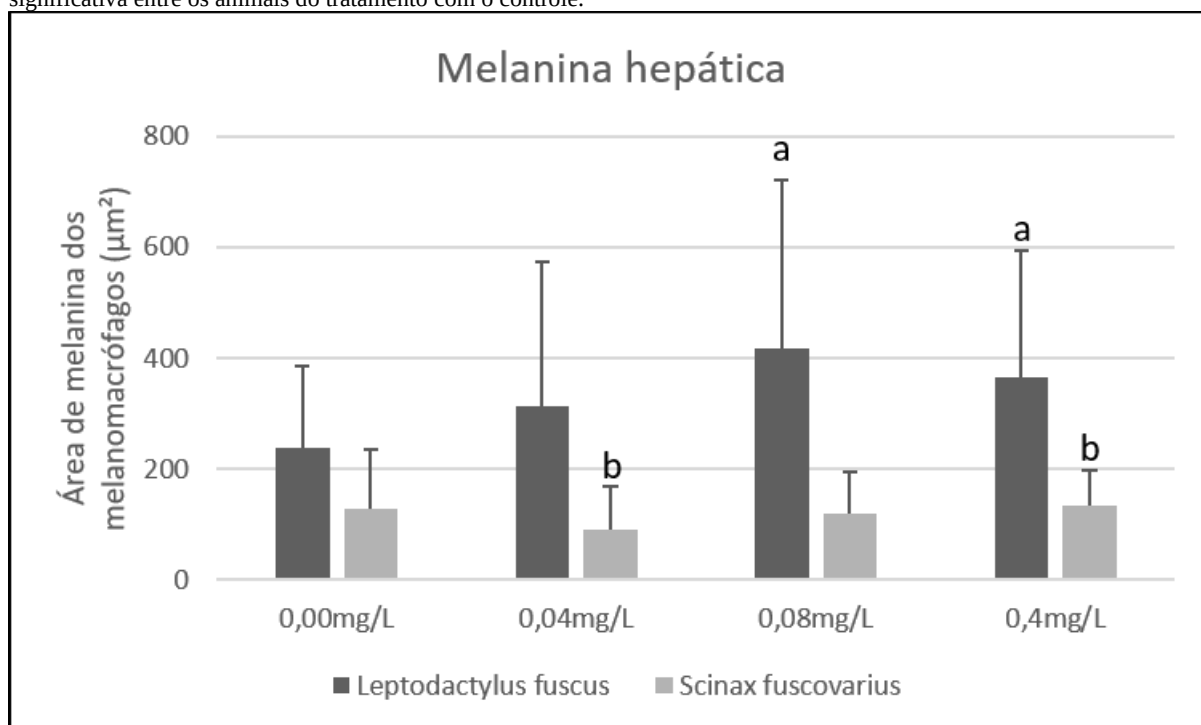


Figura 12 – Fotomicrografias do fígado de *L. fuscus* demonstrando a variação média da área pigmentar dos melanomacrófagos (seta). A: controle; B: 0,04mg/L de fipronil; C: 0,08mg/L de fipronil; D: 0,4mg/L de fipronil. Coloração Hematoxilina-Eosina. Barras: 25µm.

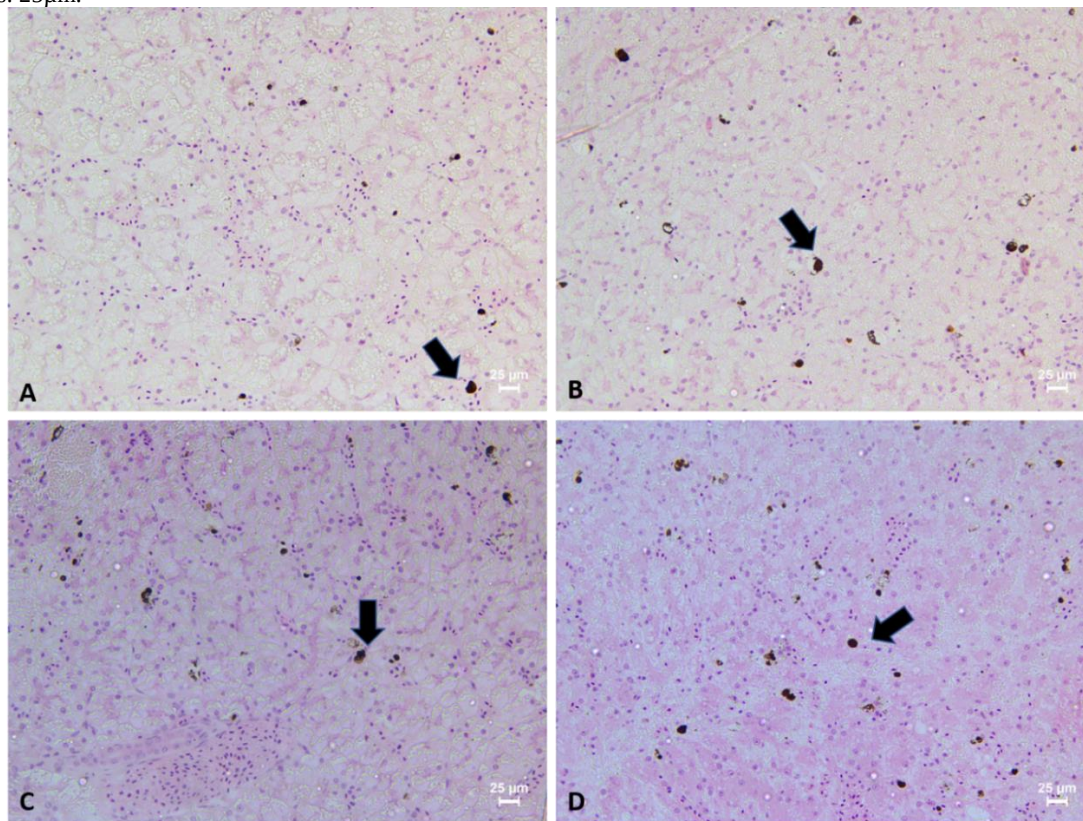
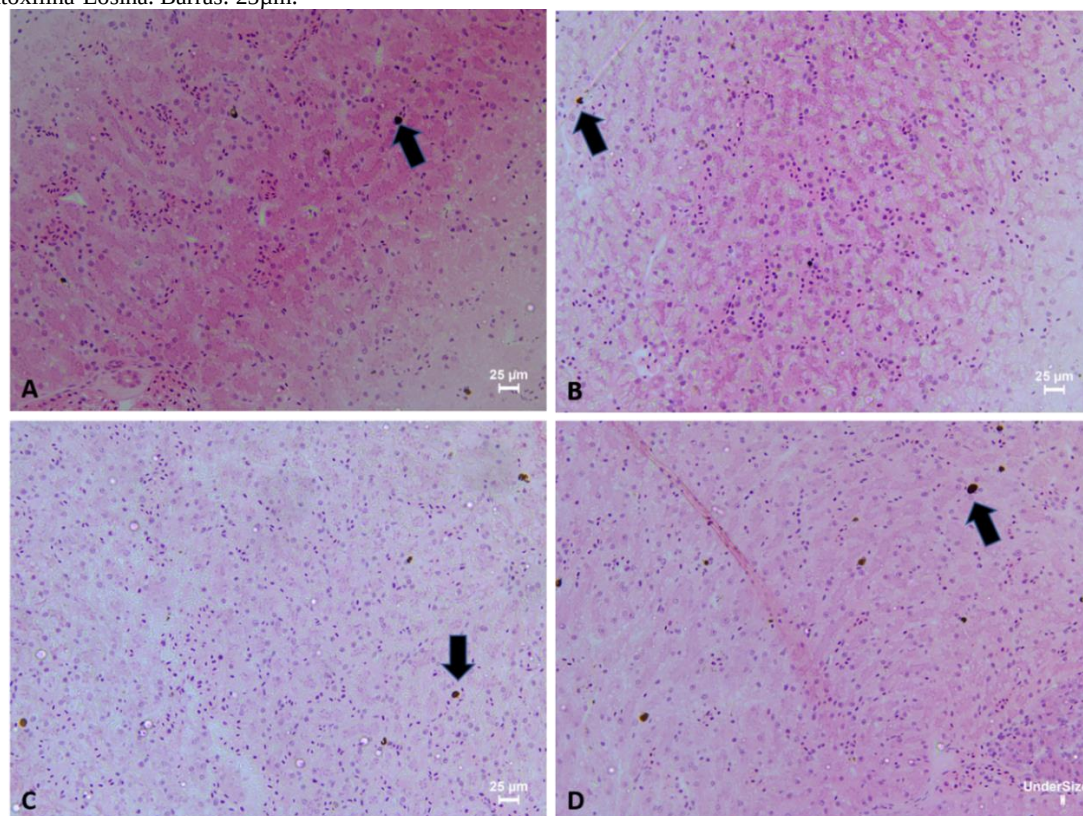


Figura 13 - Fotomicrografias do fígado de *S. fuscovarius* demonstrando a variação média da área pigmentar dos melanomacrófagos (seta). A: controle; B: 0,04mg/L de fipronil; C: 0,08mg/L de fipronil; D: 0,4mg/L de fipronil. Coloração Hematoxilina-Eosina. Barras: 25µm.



DISCUSSÃO

No presente trabalho observamos que a contaminação por fipronil não causou efeitos negativos na sobrevivência de indivíduos da espécie *Leptodactylus fuscus* em nenhuma das três concentrações testadas, assim como para indivíduos de *Scinax fuscovarius* expostos a menor concentração e a intermediária (0,04mg/L e 0,08mg/L), entretanto, indivíduos expostos a maior concentração (0,4mg/L) apresentaram um efeito negativo significativo sobre sua taxa de sobrevivência. A ação de xenobióticos em diferentes concentrações apresenta toxicidade para várias espécies de anuros, causando um efeito negativo em suas taxas de sobrevivência (Diana *et al.*, 2000; Brodeur *et al.*, 2009; Brunelli *et al.*, 2009; Brodeur *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2014; Hartman *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018).

Outros trabalhos que avaliaram a toxicidade do fipronil em anuros demonstraram resultados semelhantes aos observados em *L. fuscus* e *S. fuscovarius* (expostos a 0,04mg/L e 0,08mg/L), indicando uma baixa taxa de efeito letal causada pela contaminação por fipronil. Gripp *et al.* (2017) ao expor girinos de *Eupemphix nattereri* à 35µg/kg, 120µg/kg e 180µg/kg por 7 dias observaram que o fipronil não afetou a sobrevivência dos indivíduos. De forma similar, Freitas *et al.* (2022) notaram que a contaminação por 64µg/L de fipronil por 7 dias não causou efeitos letais em girinos de *L. fuscus* e *Lithobates catesbeianus*. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas nesses dois trabalhos são relativamente menores do que as que nós utilizamos, entretanto, resultados demonstrando a ausência de efeito negativo em girinos expostos a fipronil também já foram demonstrados em concentrações mais elevadas, como as utilizadas no presente trabalho. Boscolo *et al.* (2017) notaram que a contaminação por 0,5mg/L e 1,5mg/L de fipronil por 7 dias não causou efeitos letais em girinos de *Physalaemus nattereri*, já Santos *et al.* (2021) ao expor girinos de *L. catesbeianus* as mesmas concentrações utilizadas em nosso trabalho em quatro intervalos de tempo (4, 8, 12 e 16 horas), não observaram letalidade advinda da contaminação por fipronil, enquanto Saka; Tada (2021) em um teste crônico com girinos de *Silurana tropicalis* expostos a 0,015mg/L e 0,15mg/L de fipronil não observaram número de mortes significativos. Diante do exposto, parece que os principais efeitos do fipronil em anuros são subletais em baixas concentrações.

Em contrapartida, Saka; Tada (2021) em um teste agudo (quatro dias) com girinos de *S. tropicalis* observaram um efeito letal causado pela contaminação por fipronil que aumentou segundo a duração da exposição, mostrando um comportamento dose-dependente, entretanto, cabe ressaltar que as concentrações onde esses resultados foram observados eram muito mais elevadas do que as utilizadas em nosso trabalho e nos anteriores (LC50 de 3mg/L (24h); 2mg/L

(48h); 1,65mg/L (72h); 1,34mg/L (96h)). Outro resultado que difere dos observados pelos demais trabalhos, porém com concentrações similares, foi o observado por Rutkoski *et al.* (2021) onde ao expor girinos de *Physalaemus gracilis* a várias concentrações (0, 26, 50, 100, 500, e 1500µg/L) durante sete dias, notou que ocorreu um aumento significativo na taxa de mortalidade em indivíduos expostos a 100, 500, e 1500µg/L após cinco dias de contaminação.

Em nosso trabalho, observamos que *S. fuscovarius* apresentou um aumento na taxa de mortalidade quando exposta a maior concentração de fipronil (0,4mg/L), de forma similar aos girinos de *P. gracilis* no trabalho de Rutkoski *et al.* (2021), o que pode indicar que essas duas espécies são mais sensíveis à contaminação por esse composto, uma vez que a maioria dos trabalhos mostra que os indivíduos expostos não respondem de forma letal ao fipronil. Algo interessante de se notar é que os óbitos em *S. fuscovarius* ocorrem entre os estágios 42 e 46 Gosner, momento do clímax da metamorfose onde um grande número de mudanças morfológicas, fisiológicas e comportamentais ocorrem, o que pode acarretar em um aumento da sensibilidade à contaminação.

Com relação à genotoxicidade eritrocitária não observamos um aumento na frequência de micronúcleos, assim como das demais alterações nucleares. Trabalhos expondo peixes a fipronil mostram efeito genotóxico causado por esse inseticida. Uçar *et al.* (2021) ao contaminar peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss* a 0,05mg/L, 0,1mg/L e 0,2mg/L durante 4 dias observaram um aumento na frequência de micronúcleos de forma não dose-dependente. Ghaffar *et al.* (2021) notaram que indivíduos de *Labeo rohita*, contaminados com 0,12mg/L e 0,15mg/L de fipronil em três intervalos de tempo (3, 6 e 9 dias) tiveram um aumento na frequência de micronúcleos e de diversas outras anormalidades nucleares. Fredianelli *et al.* (2019) observaram um aumento significativo na frequência de anormalidades nucleares em indivíduos de *Rhamdia quelen* expostos a 0,3mg/L e 0,4mg/L de fipronil por 96 horas, não havendo aumento de micronúcleos. Por fim Ghisi *et al.* (2011) ao expor peixes da espécie *R. quelen* a 0,05, 0,10 e 0,23µg/L de fipronil em um teste crônico de 60 dias, observaram que a contaminação levou a um aumento no dano ao DNA a 0,10 e 0,23µg/L.

O que podemos observar nesses trabalhos é um efeito genotóxico mais severo em animais expostos em curtos períodos (testes de toxicidade agudos), sendo que em animais em contato por muito tempo com o contaminante, mostram resultados mais brandos, como os observados por Ghisi *et al.* (2011). Até o presente momento, apenas um trabalho foi publicado investigando os efeitos genotóxico do fipronil em anuros. Santos *et al.* (2021) demonstrou que girinos de *L. catesbeianus* expostos às mesmas concentrações utilizadas em nosso trabalho em quatro intervalos de tempo (4, 8, 12 e 16 horas) apresentaram um aumento na frequência de

anormalidades de forma dependente do tempo e da concentração, onde indivíduos expostos por 4 dias tiveram aumento apenas na menor concentração e na intermediária (0,04 e 0,08mg/L), após 8 dias tiveram aumento em todas as concentrações, em 12 dias, não tiveram aumento e em 16 dias, tiveram aumento na concentração intermediária e na maior (0,08 e 0,4mg/L).

Como os próprios autores apontam, esses resultados destacam a dinâmica de reciclagem dos eritrócitos com alterações em curtos intervalos de tempo, o que dificulta a observação de efeitos genotóxicos causados por fipronil durante exposição prolongada e em baixas concentrações (Santos *et al.*, 2021). Assim a ausência de efeito genotóxico que observamos em nosso trabalho, cuja exposição foi durante todo período de metamorfose (aproximadamente dois meses), pode se dar a essa dinâmica de reciclagem dos eritrócitos. Outra possibilidade repousa no fato de que, durante a metamorfose, os eritrócitos passam por um processo de remodelagem alterando a cadeia de hemoglobina, uma vez que as hemácias dos girinos não apresentam o mesmo desempenho que o dos adultos, sofrendo assim processos de apoptose para serem substituídas (Shi, 2000; Brown; Cai, 2007). Dessa forma, como o nosso experimento teve fim logo após o processo de metamorfose, os eritrócitos podem ter sofrido remodelação, não evidenciando alterações em seus núcleos.

Com relação aos melanomacrófagos hepáticos, observamos um aumento na área de melanina em indivíduos de *L. fuscus* expostos a 0,08mg/L e 0,4mg/L e em *S. fuscovarius* expostos a 0,4mg/L, sendo que nos animais expostos a menor concentração (0,04mg/L) ocorreu uma diminuição na área de melanomacrófagos. Assim como para a genotoxicidade, até o momento apenas um trabalho foi publicado avaliando o efeito do fipronil sobre os melanomacrófagos hepáticos.

Santos *et al.* (2021) ao expor girinos de *L. catesbeianus* as mesmas concentrações utilizadas em nosso trabalho em quatro intervalos de tempo (4, 8, 12 e 16 horas) observou que a melanina hepática foi responsiva a exposição por fipronil, apresentando uma queda após 4 dias e um aumento após 8 e 12 dias. Uma vez que o fígado apresenta um importante papel da detoxificação de xenobióticos, onde um dos principais agentes que atuam são os melanomacrófagos (Fenoglio *et al.*, 2005), o aumento na área de melanina hepática observada em nosso trabalho e por Santos *et al.* (2021) pode ilustrar uma resposta hepática a contaminação que desencadeou um aumento dessas células no intuito de tentar neutralizar o fipronil, uma vez que a melanina apresenta papel protetor contribuindo para a neutralização de radicais livres dos tecidos.

CONCLUSÃO

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

5- CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

REFERÊNCIAS

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

BRODEUR, J. C. et al. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 161-170, 2009.

BRODEUR, J. C. et al. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 92, p. 10-17, 2013.

BROWN, D. D. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. **Thyroid**, v. 15, n. 8, p. 815-821, 2005.

BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental biology**, v. 306, n. 1, p. 20, 2007.

BRUNELLI, E. et al. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic toxicology**, v. 91, n. 2, p. 135-142, 2009.

BRUSLE, J.; I ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: **Fish morphology**. Routledge, 2017. p. 77-93.

BURLIBAŞA, L.; GAVRILĂ, L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2011.

CRUZ-ESQUIVEL, Á.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sinú River, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27392-27401, 2017.

ÇAKICI, Ö. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 3, p. 237-243, 2015.

DA CUNHA, E. L. R. et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 9, 2017.

DA SILVA, F. R; GONÇALVES-SOUZA. T; PATERNO, G. B; PROVETE, D. B; VANCINE, M. H. 2022. Análises ecológicas no R. Nupeea: Recife, PE, Canal 6: São Paulo. 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0.

DE ARCAUTE, C. R. et al. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological indicators**, v. 45, p. 632-639, 2014.

DENVER, R. J. Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. **Current topics in developmental biology**, v. 103, p. 195-227, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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