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

IBILCE

Mateus Oliveira Queiroz Costa

Densitometria nuclear de eritrócitos de *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) como ferramenta para avaliar efeitos da urbanização em anuros

São José do Rio Preto
2023

Mateus Oliveira Queiroz Costa

Densitometria nuclear de eritrócitos de *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) como ferramenta para avaliar efeitos da urbanização em anuros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel, junto ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Dra Lilian Franco Belussi
Supervisor: Prof Dr Classius de Oliveira

São José do Rio Preto
2023

C837d

Costa, Mateus Oliveira Queiroz

Densitometria nuclear de eritrócitos de Leptodactylus podicipinus (Anura: Leptodactylidae) como ferramenta para avaliar efeitos da urbanização em anuros / Mateus Oliveira Queiroz Costa. -- São José do Rio Preto, 2023

22 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Lilian Franco Belussi

1. Urbanização. 2. Densidade óptica integrada. 3. Anura. 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.

Mateus Oliveira Queiroz Costa

Densitometria nuclear de eritrócitos de *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) como ferramenta para avaliar efeitos da urbanização em anuros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel, junto ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profª. Drª Lilian Franco Belussi
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

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

Prof. Me. Bruno Serra de Lacerda Valverde
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Rodrigo Zieri
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

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

São José do Rio Preto
07 de dezembro de 2023

RESUMO

A urbanização é um fenômeno causado por seres humanos que altera drasticamente o ambiente em que os animais vivem, podendo resultar em mudanças morfológicas e fisiológicas. O presente estudo tem como objetivo verificar se há alterações nos eritrócitos de *Leptodactylus podicipinus* que vivem em áreas urbanas com alta influência antrópica. Para isso, foi coletado o sangue de 20 machos adultos de *L. podicipinus*, uma espécie com rostro-cloacal de aproximadamente 33 a 45 mm, apresentando peso médio de 4,35 + 0,60g no ambiente referência e peso médio de 2,64 + 0,29g no ambiente urbano. O ambiente de referência escolhido foi a região do Passo do Lontra da Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com baixa influência antrópica, enquanto o ambiente urbano escolhido foi a cidade de Campo Grande, no Mato Grosso do Sul. As imagens de esfregaços sanguíneos foram analisadas no microscópio em conjunto com o aplicativo ImageJ para determinar a densidade óptica integrada e o volume nuclear dos eritrócitos dos exemplares coletados, possibilitando verificar se há ou não alterações nos parâmetros dos eritrócitos devido a influência da urbanização neste aspecto. Os resultados indicam que o volume nuclear é semelhante entre os exemplares de ambos os ambientes, porém há diferença notável na densidade óptica integrada nuclear entre eles, com os espécimes do ambiente urbano apresentando menores densidades nucleares ($P<0,0001$). Isso indica que houveram alterações na estrutura nuclear associada ao ciclo celular eritrocitário, as quais podem estar relacionadas às ações antropogênicas do ambiente, corroborando com a hipótese de que a urbanização afeta os anuros ali presentes. Essas alterações nos eritrócitos podem comprometer a fisiologia desses animais e podem ser utilizadas como bioindicadores ambientais.

Palavras-chave: urbanização; densidade óptica integrada; anura.

ABSTRACT

Urbanization is a phenomenon caused by human beings that drastically changes the environment where animals live, resulting in morphological and physiological changes. The present study seeks to verify if anthropogenic actions have a negative effect on erythrocytes of frogs that live in urban areas. For that, blood was collected from 20 specimens of *L. podicipinus*, a species with a cloacal-rostrum of approximately 33 to 45 mm, weighting at around 4,35 + 0,60g in the reference area and 2,64 + 0,29g in the urban area. The reference zone chosen was the a region of the Passo do Lontra da Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, with low anthropic influence, while the urban area chosen was an avenue inside the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. The images of blood smear were analyzed on the microscope together with the application ImageJ to determine the integrated optic density and the nuclear volume of erythrocytes from collected specimens, making it possible to verify if there are changes in the parameters of those erythrocytes due to the influence of urbanization. Results indicate that the nuclear volume is similar between specimens from both areas, but there is a notable difference in the integrated optic density of their nucleus, with specimens from the urban area showing lower nuclear densities (*P<0,0001*). This indicates that changes occurred in the nuclear structure associated with the erythrocyte cycle, which could be due to the anthropogenic actions of the area they are living in, corroborating with the hypothesis that urbanization affects the anurans living there. These changes in erythrocytes could compromise the physiology of these animals and can be used as environmental bioindicators.

Keywords: urbanization; integrated optic density; anura.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Foto dos eritrócitos de um dos exemplares de *L. podicipinus* coletados no ambiente referência (BEP). Coloração: MGGW. Barra: 5um.

Figura 2: Foto dos eritrócitos de um dos exemplares de *L. podicipinus* coletados no ambiente urbano (CG). Coloração: MGGW. Barra: 5um.

Figura 3: Histograma demonstrando a distribuição dos dados e comparando o volume nuclear dos exemplares coletados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP).

Figura 4: Histograma demonstrando a distribuição dos dados e comparando a densidade óptica integrada entre os exemplares coletados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP).

Figura 5: Volume nuclear dos exemplares capturados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP). As linhas da caixa representam o primeiro e o terceiro quartil, e a linha dentro da caixa são as medianas. O *violin* mostra a distribuição dos dados e os pontos dos outliers. Não houve diferenças significativas entre os locais de coleta.

Figura 6: Densidade óptica integrada (DOI) dos exemplares capturados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP). As linhas da caixa representam o primeiro e o terceiro quartil, e a linha dentro da caixa são as medianas. O *violin* mostra a distribuição dos dados e os pontos dos outliers. Houve diferenças significativas entre os locais de coleta, com os animais do local urbano apresentando menores valores.

LISTA DE ABREVIATURAS

DOI Densidade Óptica Integrada

CG Campo Grande (Ambiente urbano)

BEP Base de Estudos do Pantanal (Ambiente referência)

MGGW May-Grunwald-Giemsa-Wrigth

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8

2. OBJETIVO 9

3. MATERIAIS E MÉTODOS 9

3.1. Modelo animal e locais de coleta 9

3.2. Amostragem de sangue 13

3.3. Densitometria óptica integrada (DOI) e Volume nuclear 13

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 15

5. CONCLUSÃO 19

6. REFERÊNCIAS 20

1. INTRODUÇÃO

A urbanização é um processo de ocupação territorial em que há crescimento do espaço urbano sobre o espaço rural ali existente, ampliando a influência do ser humano sobre o habitat natural dos animais. Ela altera drasticamente o ambiente, podendo causar a fragmentação de populações, dificuldades na reprodução, redução na riqueza e na distribuição geográfica de espécies. Observa-se, também, efeitos diretamente na morfologia dos animais presentes em habitats que houveram antropização, bem como diferenças na taxa de crescimento e desenvolvimento. Locais altamente antropizados podem promover, também, mais competição entre os animais ali presentes por recursos (JENNETTE *et al.*, 2018).

Espécies que necessitam de lagos para seu ciclo de vida, por exemplo, podem apresentar diferenças de tamanho tanto em estágio de desenvolvimento quanto na fase adulta quando comparados a indivíduos da mesma espécie em locais com baixa antropização (JENNETTE *et al.*, 2018).

Os eritrócitos nucleados, foco deste estudo, são células de importantíssima função: transporte de gases pela corrente sanguínea dos anuros. A presença de núcleo nos eritrócitos possibilita um fácil acesso à grandes quantidades de DNA, facilitando o estudo de DNA dos anfíbios. Os efeitos resultantes da urbanização podem provocar alterações nos eritrócitos de anuros, como alteração no tamanho e formato da célula, devido principalmente a xenobióticos originados de metais pesados e esgoto presente na água (ZHELEV *et al.*, 2017). Mudanças no tamanho e formato dos eritrócitos podem reduzir a permeabilidade de coagulação, dificultando o processo de hemostasia (TUTWILER *et al*., 2018).

A espécie analisada foi a *Leptodactylus podicipinus*, representada por rãs de médio porte com pele de tom amarronzado na porção dorsal e mais clara com pontos brancos na porção ventral (BORDIN, 2021). Realizam o forrageamento e são considerados como predadores oportunistas, ou seja, sua dieta é composta principalmente por insetos encontrados no ambiente (SEBA *et al*., 2020). Esses animais depositam seus ovos em ninhos de espuma formados pelos seus genitores, onde ficam protegidos por predadores até eclodirem (SILVA, 2009). São encontradas majoritariamente no Centro-Oeste, podendo também serem encontradas em estados do Norte, alguns estados do Nordeste e alguns estados do Sudeste do Brasil. Podem

ser encontradas também em outros países da América do Sul como Paraguai, Uruguai, Bolívia e Argentina.

A utilização da densitometria nuclear para a quantificação de DNA é bastante precisa (OGIESLKA *et al.*, 2001), portanto o presente estudo faz uso dessas análises da densidade óptica integrada (DOI) e de volume nuclear dos eritrócitos de espécimes de *L. podicipinus* coletados em locais com diferentes níveis de urbanização para verificar se há algum efeito direto nas células destes animais.

2. OBJETIVO

O objetivo foi utilizar a densidade óptica integrada e o volume nuclear de eritrócitos em *L. podicipinus* para os efeitos nos eritrócitos de espécimes de um ambiente urbano altamente antropizado em relação aos eritrócitos de espécimes de um ambiente referência com pouca influência antrópica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados animais previamente coletados no projeto de pós-doutorado da orientadora, intitulado "Aplicação de marcadores morfológicos para avaliação de estressores ambientais em anuros", edital PROPe 13/2022. Todas as coletas foram realizadas com a licença de coleta e manutenção de anfíbios em laboratório (SISBIO/IBAMA 63297-1) e toda a manipulação e eutanásia dos animais seguiram as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – (CEUA 997/2018).

3.1 Modelo animal e locais de coleta

A espécie escolhida foi *L. podicipinus* por apresentar ampla distribuição e ocorrer em abundância na cidade. Além disso, é um espécie de porte pequeno e de fácil identificação de suas características diagnósticas, como rostro-cloacal de aproximadamente 33 a 45 mm, membros anteriores menores do que os membros posteriores e coloração amarronzada na porção dorsal com pontos brancos na porção ventral (BORDIN, 2021). Quando maturos sexualmente, os machos podem ser identificados pela presença dos calos nupciais e saco vocal bastante desenvolvido.

Por fazer parte de ambos os tipos de ambientes, esta espécie é um bom modelo para esse tipo de estudo que visa compará-los.

Figura 1: Visão dorsal de um espécime de *L. podicipinus*.

Fonte: A. P. Lima, s.d.

Figura 2: Visão ventral de um espécime de *L. podicipinus*.

Fonte: A. P. Lima, s.d.

Foram avaliados 20 machos de *L. podicipinus* coletados durante a estação reprodutiva (Setembro/2018 a Janeiro/2019) em um ambiente de referência, sendo esse a região do Passo do Lontra da Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (19º34'37"S; 57º00'42"W), Corumbá, MS (N=10) com peso médio de 4,35 + 0,60g e tamanho de 3,77 + 0,29cm e em um ambiente urbanizado sendo esse uma avenida dentro da cidade de Campo Grande, MS (N=10) com peso médio de 2,64 + 0,29g e tamanho de 2,89 + 0,58cm. Todos os animais coletados eram adultos e estavam em atividade reprodutiva. O local de referência foi escolhido por apresentar baixa interferência antrópica.

Figura 3: Vista de cima da Base de Estudos do Pantanal da UFMS.

Fonte: BEP, s.d.

Figura 4: Vista de cima da cidade de Campo Grande, MS.

Fonte: Silas Ismael, 2021.

3.2 Amostragem de sangue

Os animais foram transportados para o laboratório onde permaneceram em aclimatação por 12h antes das análises. Os animais foram anestesiados com aplicação tópica de xilocaína 5%. O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas e agulhas com EDTA 3% (RANZANI-PAIVA *et al.,* 2013) para a confecção de extensões sanguíneas. As extensões foram coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wrigth (MGGW) pelo método de Rosenfeld modificado (TAVARES-DIAS *et al*., 2003)

3.3 Densitometria óptica integrada (DOI) e Volume nuclear

A análise das lâminas foi feita utilizando um microscópio com um aumento de 1000x em conjunto com o aplicativo Leica Application Suite v4.8. No total, foram capturadas 10 imagens por espécime e considerados de 10 núcleos por imagem,

totalizando 100 núcleos analisados por animal. A densitometria óptica nuclear foi analisada utilizando o software ImageJ 1.53a (Hardie *et al.*, 2002). Para cada núcleo, foi considerado a área (μm^2), o perímetro (µm), o diâmetro de Feret, o IntDen, o RawIntDen e o Round. Utilizando o ImageJ, as imagens foram configuradas para 8-bits para que o threshold possa ser ajustado adequadamente para que apenas os núcleos fiquem visíveis. O valor total da densidade integrada de cada imagem é delimitado, sendo utilizado posteriormente para calcular a diferença em relação à densidade integrada de cada núcleo, utilizando a seguinte equação:

$$IOD = \sum_{i=1}^{n} -\log_{10}\left(\frac{IF_i}{IB_i}\right)$$

onde n = número total de pixels no núcleo, IF_i = intensidade de pixels do "foreground" (nuclear), IB_i = intensidade de pixels do "background" (área limpa) (HARDIE, 2002).

O volume nuclear é fornecido diretamente pelo ImageJ, não sendo necessário que seja calculado. Porém pode ser calculado utilizando a fórmula $V_n = (4/3\ \pi\ r^3)$, onde V_n = volume nuclear e r = raio do núcleo (LEÃO et *al*., 2020).

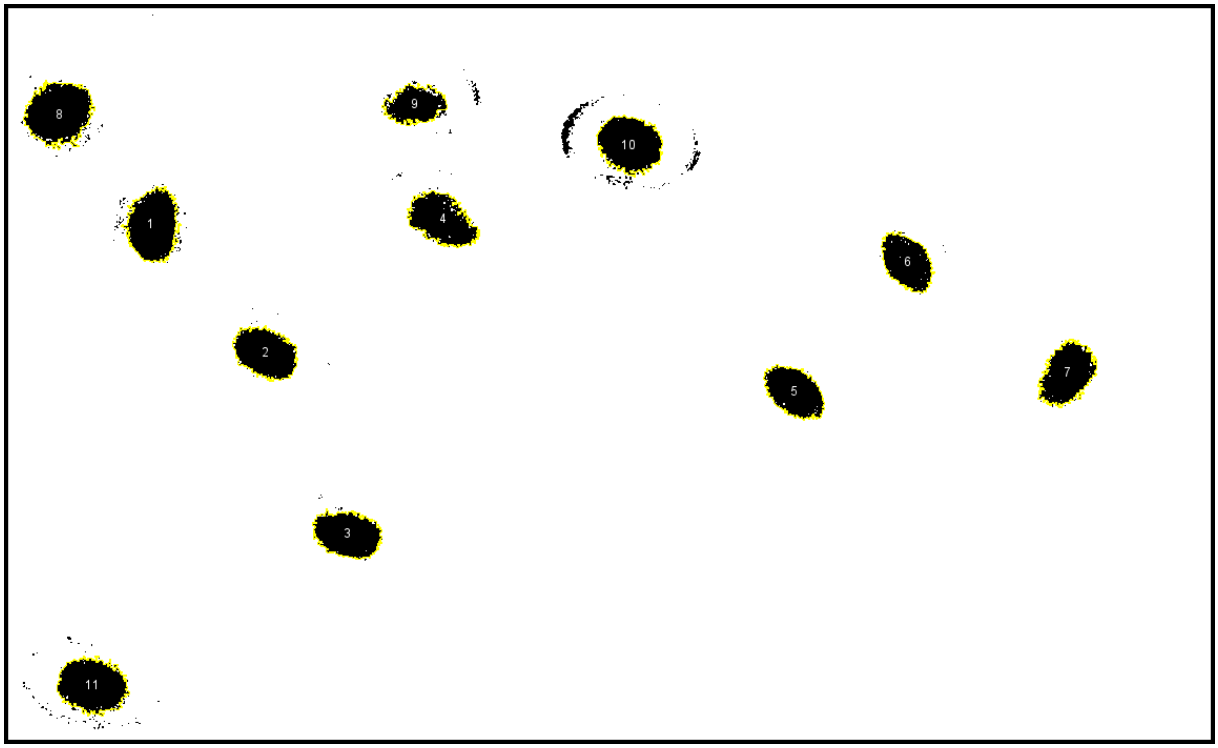

Figura 5: Ilustração demonstrando a aplicação da análise dos núcleos selecionados utilizando o software ImageJ em uma das lâminas de esfregaço.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Espécime	Núcleo	Área	Perim	Feret	IntDen	IndTotal	ValorNuclear	Log10	Round
2	LP 1	1	0,02	8,06	2,05	6,18	275554,03	2,24275E-05	4,65	0,55
3	LP 1	2	0,04	8,05	2,11	9,67	275554,03	3,50929E-05	4,45	0,51
4	LP 1	3	0,01	9,28	2,12	3,76	275554,03	1,36452E-05	4,87	0,62
5	LP 1	4	0,01	7,76	2,1	2,96	275554,03	1,0742E-05	4,97	0,67
6	LP 1	5	0,02	9,56	2,24	5,37	275554,03	1,9488E-05	4,71	0,27
7	LP 1	6	0,02	9,98	2,17	5,91	275554,03	2,14477E-05	4,67	0,92
8	LP 1	7	0,02	8,89	2,03	4,3	275554,03	1,56049E-05	4,81	0,89
9	LP 1	8	0,06	10,58	2,31	16,39	275554,03	5,94802E-05	4,23	0,81
10	LP 1	9	0,03	6,85	1,83	6,99	275554,03	2,53671E-05	4,60	0,75

Figura 6: Tabela montada no Microsoft Excel utilizando os dados coletados a partir da lâmina de esfregaço da figura acima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os eritrócitos de *L. podicipinus* são células elípticas, achatadas e nucleadas (Figura 7). A partir das análises de densitometria óptica do núcleo dessas células em *L. podicipinus*, nota-se que houve diferença entre os animais coletados em ambiente urbano (CG; Figura 9 e Figura 11), onde esses animais apresentam dois picos diferentes de densidade enquanto os exemplares coletados no ambiente referência (BEP) apresentam apenas um pico. A presença desses dois picos observados no histograma pode estar relacionado à presença de duas populações de células distintas que podem estar em fases de maturação distintas. Além disso, também foi observada diferenças entre os locais de coleta, com os animais do urbano apresentando menores densidades nucleares ($P<0,0001$). Isso pode ser indícios de que há danos na compactação do material genético desses animais, causando possíveis efeitos deletérios.

Utilizando a densitometria nuclear para analisar a densidade de compactação da cromatina, podemos inferir que os animais da área urbana apresentam DNA menos compactado nos seus eritrócitos. Uma menor compactação do DNA pode estar relacionada, provavelmente, à fragmentação do material genético devido a ações de xenobióticos. Assim, esse resultado demonstra que os animais da área urbana estão sujeitos a diferentes efeitos de xenobióticos.

Já o volume nuclear de ambos não apresenta diferenças significativas ($P= 0,74$; Figura 8) e na distribuição dos dados se apresentam relativamente similar, com apenas um pico no histograma (Figura 8) e no ViolinPlot (Figura 11). O tamanho do

núcleo dos eritrócitos está relacionado com as condições ambientais e o tamanho do genoma em vertebrados (GREGORY, 2001), sendo que núcleos maiores têm maiores sínteses protéicas para suportar o metabolismo de células maiores (GREGORY, 2001).

Isso demonstra que o aumento da urbanização traz efeitos que podem ser negativos para o meio ambiente e para os animais que vivem nele, alterando ou até destruindo seu habitat natural, forçando-os a se adaptarem ao novo ambiente. Além de alterações no comportamento dos animais (BRAS, 2018), as mudanças antropogênicas causam alterações na morfologia do corpo (JENNETTE *et al.*, 2018) e nos parâmetros de suas células sanguíneas (ZHELEV *et al.*, 2018).

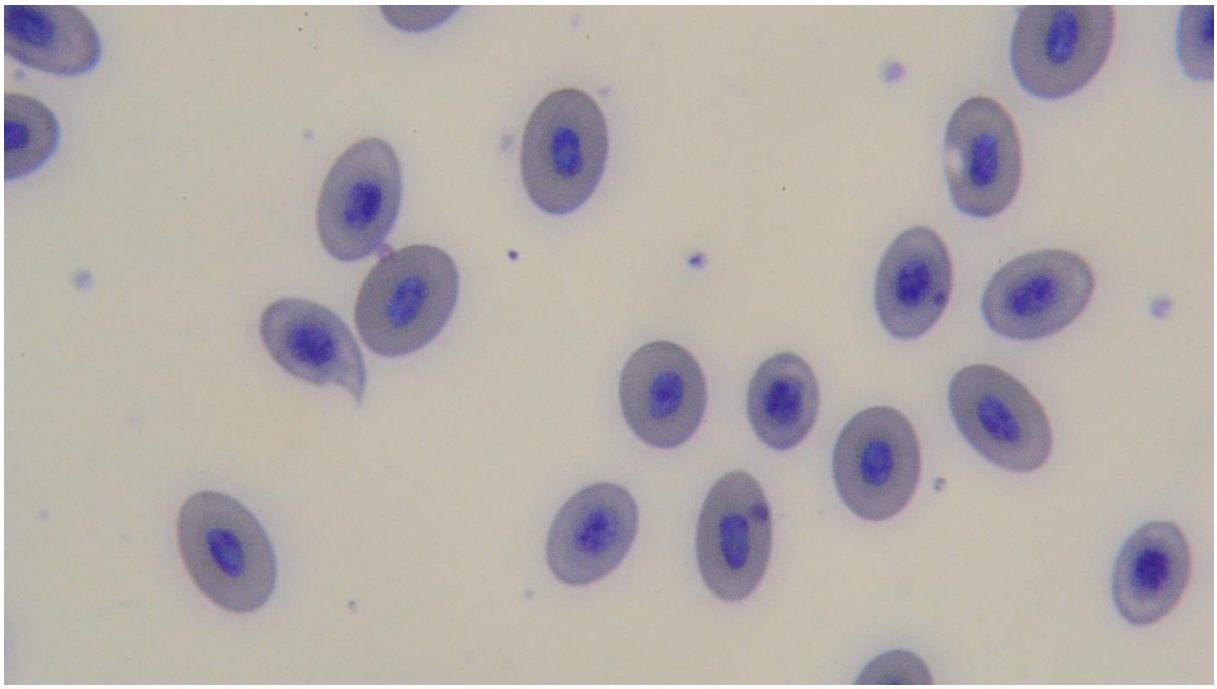

Figura 7: Foto dos eritrócitos de um dos exemplares de *L. podicipinus* coletados no ambiente referência (BEP). Coloração: MGGW. Barra: 5µm.

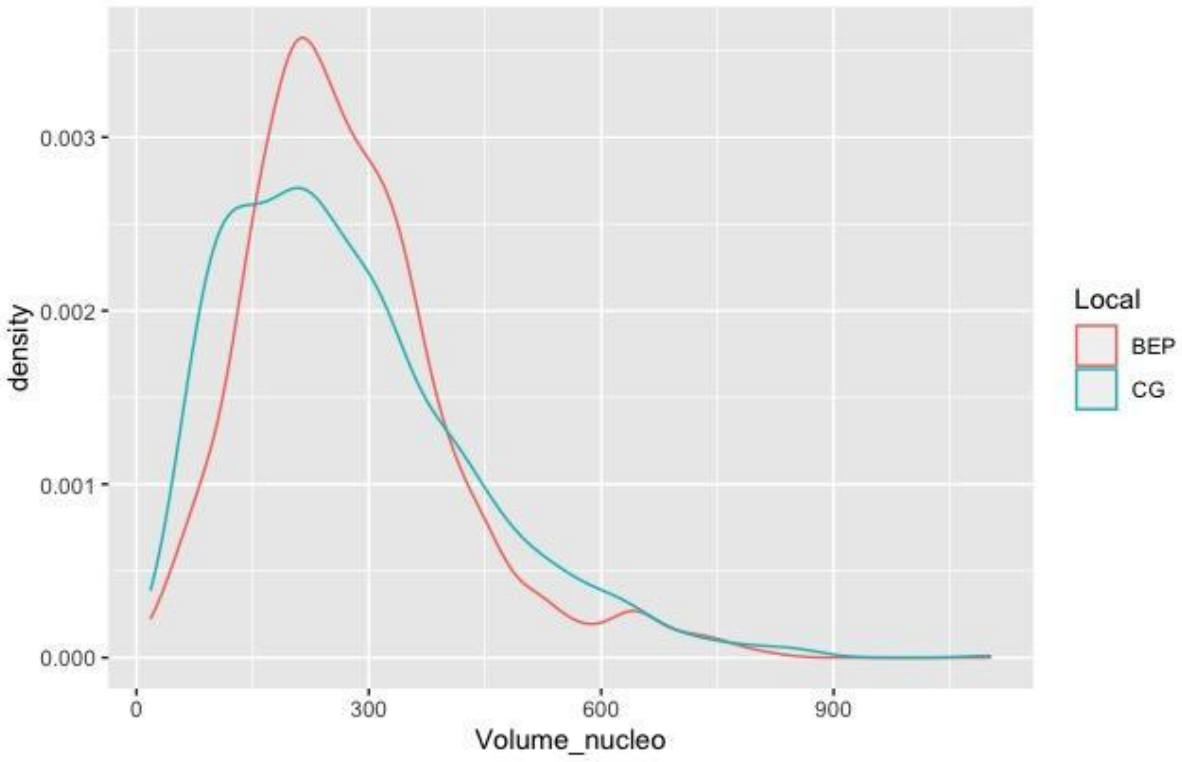

Figura 8: Histograma demonstrando a distribuição dos dados e comparando o volume nuclear dos exemplares coletados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP).

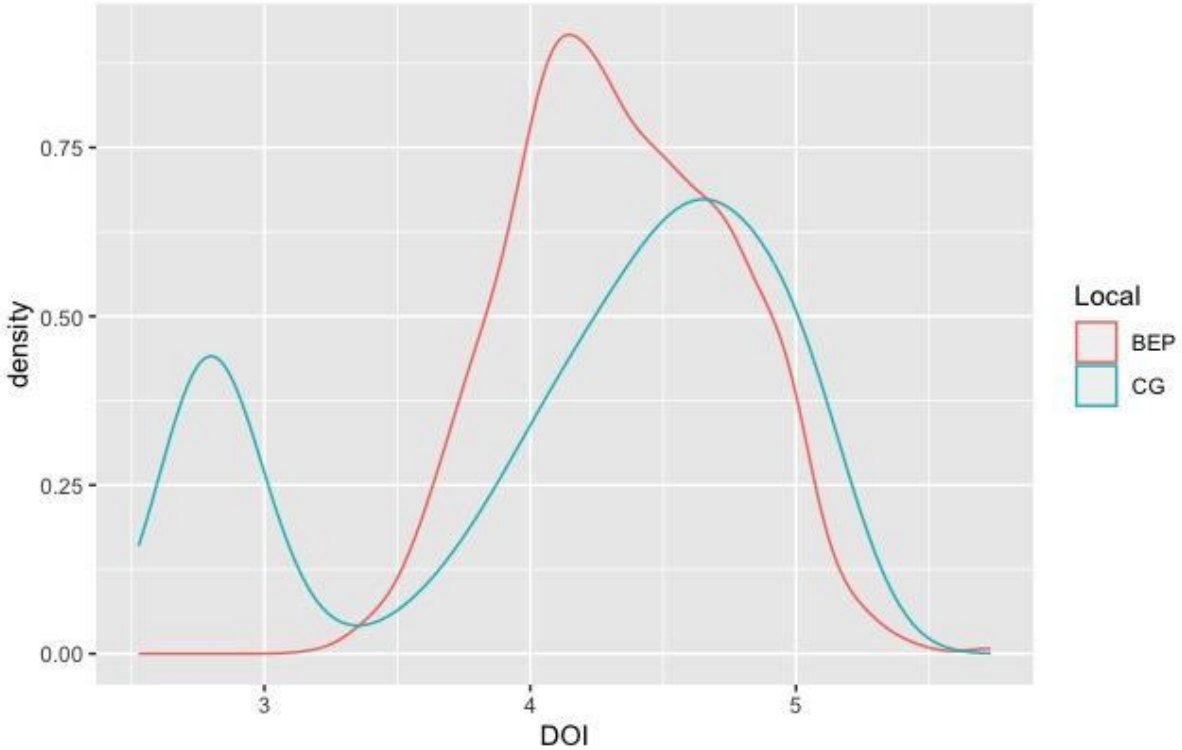

Figura 9: Histograma demonstrando a distribuição dos dados e comparando a densidade óptica integrada entre os exemplares coletados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP).

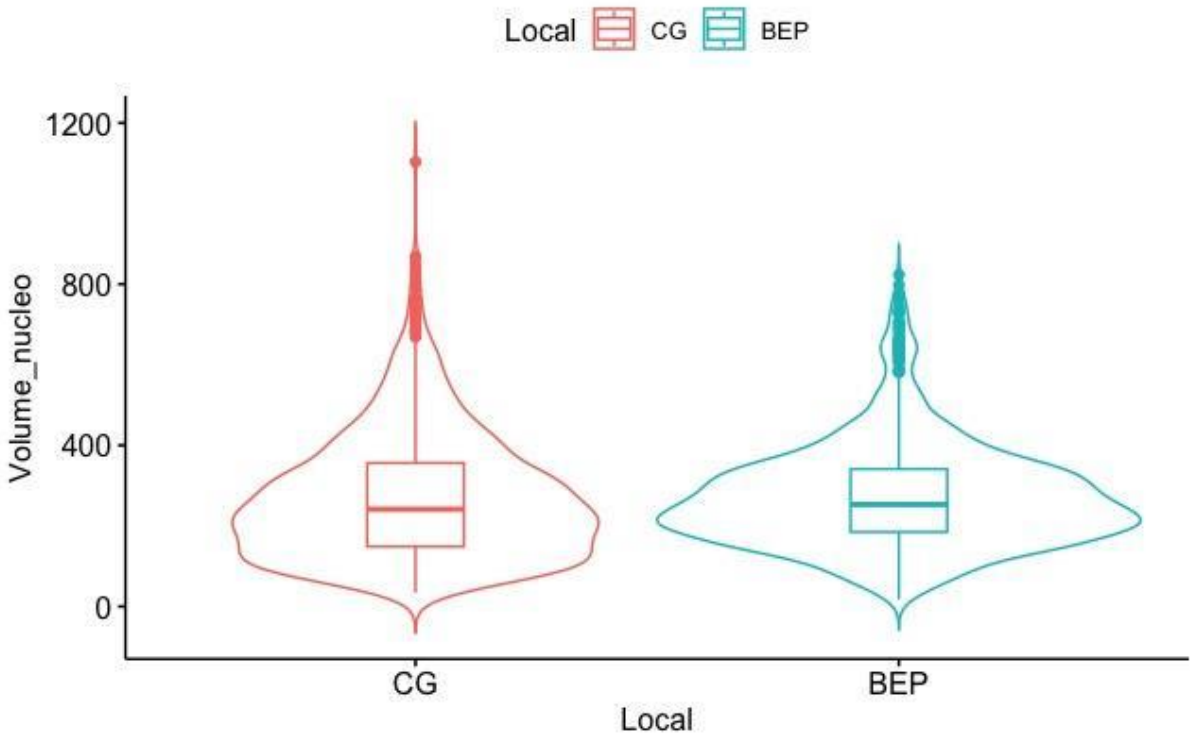

Figura 10: Volume nuclear dos exemplares capturados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP). As linhas da caixa representam o primeiro e o terceiro quartil, e a linha dentro da caixa são as medianas. O *violin* mostra a distribuição dos dados e os pontos dos outliers. Não houve diferenças significativas entre os locais de coleta.

.

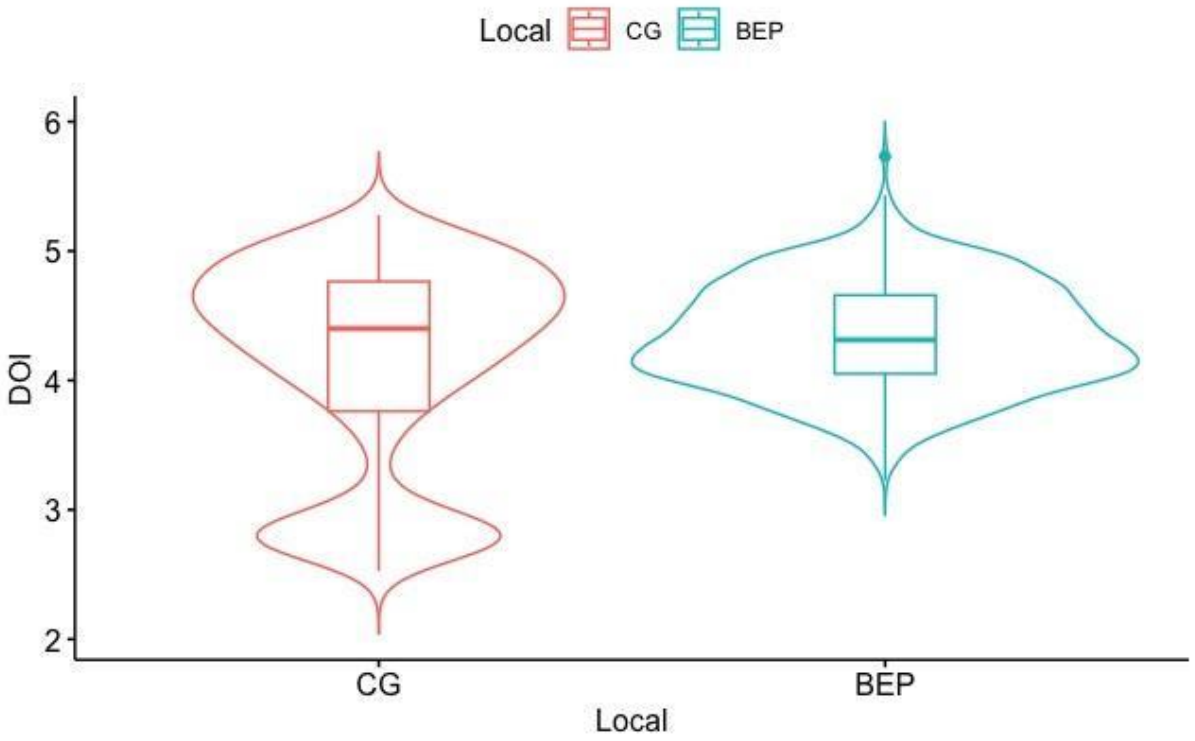

Figura 11: Densidade óptica integrada (DOI) dos exemplares capturados em ambiente urbano (CG) e ambiente referência (BEP). As linhas da caixa representam o primeiro e o terceiro quartil, e a linha dentro da caixa são as medianas. O *violin* mostra a distribuição dos dados e os pontos dos outliers. Houve diferenças significativas entre os locais de coleta, com os animais do local urbano apresentando menores valores.

5. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de análise da densidade óptica integrada, foi possível observar uma diferença nos eritrócitos dos animais analisados, sendo que os coletados no ambiente urbano apresentaram dois picos na DOI enquanto os coletados no ambiente referência apresentaram apenas um único pico. Já o volume nuclear não apresenta variação significativa. A diferença na DOI dos animais analisados sugere que o ambiente antropizado pode provocar alterações nos seres vivos e provavelmente foi a razão das falhas na compactação do material genético deles, tendo em vista que uma menor DOI indica que há menos material genético compactado no núcleo dos eritrócitos. Assim, a técnica de avaliação das características densitométricas dos núcleos de eritrócitos de anuros se mostrou como

uma técnica importante também para avaliar efeitos de ambiente urbano, podendo ser aplicada também no monitoramento ambiental.

6. REFERÊNCIAS

BORDIN, R. O. **Parâmetros reprodutivos de Leptodactylus podicipinus (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) em ambiente antropizado**. 2021. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/3954. Acesso em: 20 nov. 2023.

BRAS, S. X. **Efeitos da urbanização na personalidade animal: um experimento controlado em calangos *Tropidurus hispidus***. 2018. Dissertação de mestrado - Programa de pós-graduação em biodiversidade e conservação - Universidade Federal do Maranhão, 2018. Disponível em: https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/4012#preview-link0. Acesso em: 20 nov. 2023.

GREGORY, T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: Genome size and red blood cell size in vertebrates. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, p. 830–843, set. 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0457. Acesso em: 20 nov. 2023.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 2002. v. 50(6), p. 735-749. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/002215540205000601. Acesso em: 20 nov. 2023.

JENNETTE, M. A.; SNODGRASS, J. W.; FORESTER, D. C. Variation in age, body size, and reproductive traits among urban and rural amphibian populations. **Urban Ecosystems**, v. 22, p. 137-147, set. 2018.

LEÃO *et al*. Comparative liver morphology associated with the hepatosomatic index in five Neotropical anuran species. **Wiley**, v. 304(4), p. 860-871, out. 2020. Disponível em: https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.24540. Acesso em: 20 nov. 2023.

OGIELSKA, M.; KAZANA, K.; KIERZKOWSKI , P. DNA content in erythrocyte nuclei of water frogs from a pure Rana esculenta population in Dębki (Gdańsk district, Poland). **Zoosystematics and Evolution**, v. *77*(1), p. 65-70, abr. 2008.

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M . Métodos para análise hematológica em peixes. **EDUEM**, v. 1, 2013.

SEBA *et al*. Hábito alimentar de Leptodactylus podicipinus (Cope, 1862) no Pantanal Mato-Grossense. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11(3), p. 519-514, abr. 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341444731_Habito_alimentar_de_Leptodactylus_podicipinus_Cope_1862_no_Pantanal_Mato-Grossense. Acesso em: 20 nov. 2023.

SILVA, W. R. **Ecologia reprodutiva de duas espécies de *Leptodactylus* e a evolução de caracteres morfológicos, comportamentais e ecológicos no grupo de *L. pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae)**. 2009. Tese de doutorado - Universidade Federal de Uberlândia, 2009. Disponível em: https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/13255/1/aWagner.pdf. Acesso em: 20 nov. 2023.

TAVARES-DIAS, M.; RUAS, F. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19(1), n. 1, p. 208, mar. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/277238053_Caracteristicas_hematologicas_da_Tilapia_rendalli_Boulenger_1896_Osteichthyes_Cichlidae_capturada_em_Pesque-Pague_de_Franca_Sao_Paulo_Brasil. Acesso em: 20 nov. 2023.

TUTWILER *et al*. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. **Scientific Reports**, v. 8, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-018-35849-8. Acesso em: 20 nov. 2023.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F.. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 161–172, 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ea/a/Hdyz9RrHQQJH6F3gpKJHSkb/?format=pdf&lang=pt. Acesso em: 20 de nov. 2023.

ZHELEV, Z.; POPGEORGIEV, G.; IVANOV, I.; BOYADZHIEV, P. Changes of erythrocyte-metric parameters in *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Anura: Ranidae) inhabiting water bodies with different types of anthropogenic pollution in Southern Bulgaria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24(1), jul. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317648936_Changes_of_erythrocyte-metric_parameters_in_Pelophylax_ridibundus_Amphibia_Anura_Ranidae_inhabiting_water_bodies_with_different_types_of_anthropogenic_pollution_in_Southern_Bulgaria. Acesso em: 20 de nov. 2023.