

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**BIOMARCADORES HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS:
FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS PARA ESTUDOS DE
IMPACTOS AMBIENTAIS DA ATIVIDADE AGRÍCOLA EM
ANUROS**

Autora: Rhayane Alves de Assis
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos
Coorientadores: Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes e
Dra. Lilian Franco-Belussi

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2020

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**BIOMARCADORES HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS:
FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS PARA ESTUDOS DE
IMPACTOS AMBIENTAIS DA ATIVIDADE AGRÍCOLA EM
ANUROS**

Autora: Rhayane Alves de Assis

Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

Coorientadores: Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes e
Dra. Lilian Franco-Belussi

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de Concentração: Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

AAS848 Assis, Rhayane Alves de
b Biomarcadores hepáticos e sanguíneos: Ferramentas
morfológicas para estudos de impactos ambientais da
atividade agrícola em anuros. / Rhayane Alves de
Assis; orientadora Lia Raquel de Souza Santos; co-
orientadora Lilian Franco-Belussi. -- Rio Verde,
2020.
77 p.

Dissertação (em Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2020.

1. Agricultura. 2. Anfíbios. 3. Anormalidades
eritrocitárias nucleares. 4. Melanomacrófagos. 5.
Micronúcleo. I. Santos, Lia Raquel de Souza ,
orient. II. Franco-Belussi, Lilian , co-orient. III.
Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- Tese Artigo Científico
 Dissertação Capítulo de Livro
 Monografia – Especialização Livro
 TCC - Graduação Trabalho Apresentado em Evento
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____

Nome Completo do Autor: Rhayane Alves de Assis

Matrícula: 2018102310840070

Título do Trabalho: Biomarcadores hepáticos e sanguíneos: Ferramentas morfológicas para estudos de impactos ambientais da atividade agrícola em anuros.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 11/03/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

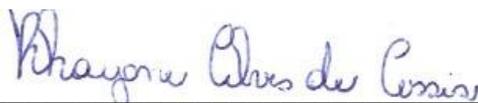
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 11/03/2020.
Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**BIOMARCADORES HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS:
FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS PARA ESTUDOS DE
IMPACTOS AMBIENTAIS DA ATIVIDADE AGRÍCOLA EM
ANUROS**

Autora: Rhayane Alves de Assis
Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos Borges

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 07 de fevereiro de 2020.



Prof.^a Dr.^a Maria Andréia Corrêa
Mendonça
Avaliadora interna
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Rodrigo Zieri
Avaliador externo
IFSP / Barretos



Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

Dedicatória

À minha família pelo apoio incondicional à minha caminhada em busca dos meus sonhos. Aos professores que me mostraram a beleza do conhecimento científico. Aos amigos que deixam toda a trajetória mais leve.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aparecida de Fátima Alves Nogueira e Almiro Nogueira de Assis, à minha irmã Yasmin Alves de Assis e à toda minha família por terem me ensinado desde cedo a importância do estudo e por todo o apoio sem o qual não seria possível que eu chegasse tão longe.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Raquel de Souza Santos, por ser a inspiração para que eu siga a carreira acadêmica, por ter me mostrado o caminho e me ensinado com toda a paciência e dedicação, pela amizade, pelo exemplo de profissionalismo e, principalmente, pela confiança e pelo incentivo para seguir em frente.

À professora Dra. Lilian Franco-Belussi, minha coorientadora, por ter sido sempre muito prestativa e atenciosa, pela confiança e pela importante contribuição para a escrita deste estudo.

Ao professor Dr. Rinneu Elias Borges, um exemplo de professor e pesquisador, pela amizade, ajuda nas coletas, pelas ideias e sugestões sempre muito bem-vindas e por não medir esforços para ajudar sempre que precisei.

Aos professores que passaram pela minha vida, em especial aos do curso de Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano, professor Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes, professor Dr. Fábio Henrique Dyszy e professora Dra. Maria Andreia Corrêa Mendonça, pelos ensinamentos e por terem contribuído para despertar o meu amor pela biologia.

Ao pesquisador, doutorando e grande amigo, Me. Wadson Rodrigues Rezende, pela enorme contribuição em todas as etapas deste estudo, sem a qual, certamente, tudo seria muito mais difícil e pela paciência para me ajudar nos procedimentos metodológicos.

Aos amigos pesquisadores Me. Marcelino Benvindo-Souza, Nathan Pereira Lima Amorim e Cirley Gomes Araújo dos Santos por terem contribuído muito para a realização deste trabalho, desde as coletas até a escrita, agradeço imensamente.

Aos demais amigos do Laboratório de Biologia Animal (LABAN), em especial, Carolina Emília, Marco Antônio, Leissa, Itamar, Hércules, Gianieily, Elaine, Nayara, Bruno, Tainã, Alisson, Seixas e Antonio pela amizade, companheirismo e por toda a ajuda nos momentos difíceis.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde por ter me acolhido desde a graduação e me dado a oportunidade de cursar o mestrado e por ter fornecido os recursos necessários para a realização deste estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação e todos os docentes que contribuíram imensamente para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que me permitiu concluir o mestrado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Rhayane Alves de Assis, natural de Quirinópolis, Goiás, nascida em 1994, filha de Aparecida de Fátima Alves Nogueira e Almiro Nogueira de Assis. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Independência em Quirinópolis no ano de 2012 e iniciou sua formação acadêmica no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano (IFGoiano) na cidade de Rio Verde, Goiás, no ano de 2013. Durante a graduação foi bolsista CAPES no Programa de Iniciação à Docência (PIBID) e estudante voluntária de Iniciação Científica (PIVIC) no Laboratório de Biologia Animal. Finalizou a graduação no ano de 2017 e ingressou no mestrado em Biodiversidade e Conservação no IFGoiano campus Rio Verde no ano de 2018 o qual concluiu no ano de 2020.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES.....	XIII
RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. CAPÍTULO I - UTILIZAÇÃO DE DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS SANGUÍNEOS E HEPÁTICOS EM <i>Leptodactylus fuscus</i> (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COLETADOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
3.1 INTRODUÇÃO.....	14
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.3 RESULTADOS.....	19
3.4 DISCUSSÃO.....	23
3.5 CONCLUSÃO.....	28
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
4. CAPÍTULO II - EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO A ÁREAS AGRÍCOLAS SOBRE ANUROS: HÁ MUDANÇAS APÓS CESSAR A EXPOSIÇÃO?.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
4.1 INTRODUÇÃO.....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.3 RESULTADOS.....	42
4.4 DISCUSSÃO.....	48
4.5 CONCLUSÃO.....	54
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
5. CONCLUSÃO GERAL.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I - UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS SANGUÍNEOS E HEPÁTICOS EM *Leptodactylus fuscus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COLETADOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS

	Página
Tabela 1. Concentração dos contaminantes carbamatos, organoclorados e organofosforados na plantação de soja e no Parque Nacional das Emas (PNE).....	19
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água avaliados <i>in situ</i> nos ambientes de coleta de <i>Leptodactylus fuscus</i>	20
Tabela 3. Média de Micronúcleo(MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de <i>Leptodactylus fuscus</i> coletados na área protegida e em área de plantação de soja.....	22

CAPÍTULO II – EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO A ÁREAS AGRÍCOLAS SOBRE ANUROS: HÁ MUDANÇAS APÓS CESSAR A EXPOSIÇÃO?

	Página
Tabela 1. Média de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de <i>Physalaemus nattereri</i> coletados em área de plantação de soja e eutanasiados em seguida (Soja/exposição) e em animais mantidos em laboratório (Soja/laboratório).....	43
Tabela 2. Média de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de <i>Physalaemus nattereri</i> coletados em área de plantação de cana-de-açúcar e eutanasiados em seguida (Cana-de-açúcar/exposição) e em animais mantidos em laboratório (Cana-de-açúcar/laboratório).....	45
Tabela 3. Média da área ocupada pelos melanomacrófagos (25 campos histológicos/animal) no tecido hepático de <i>Physalaemus nattereri</i> coletados em área de plantações agrícolas e eutanasiados em seguida (Soja/exposição e Cana-de-	

açúcar/exposição) e em animais mantidos em laboratório por 30 dias (Soja/laboratório e Cana-de-açúcar/laboratório).....47

Tabela 4. Concentração dos contaminantes carbamatos, organoclorados e organofosforados nas plantações de soja e cana-de-açúcar.....47

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água avaliados *in situ* nos ambientes de coleta dos espécimes de *Physalaemus nattereri*.....48

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I - UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS SANGUÍNEOS E HEPÁTICOS EM *Leptodactylus fuscus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COLETADOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS

	Página
Figura 1. Eritrócitos de <i>Leptodactylus fuscus</i> (aumento de 100x). A: micronúcleo, B: célula binucleada, C: broto nuclear, D: célula anucleada, E: núcleo lobado, F: núcleo entalhado, G: núcleo reniforme (seta), H: núcleo segmentado.....	20
Figura 2. Frequência de micronúcleo nos animais coletados no Parque Nacional das Emas (PNE) e na área de plantio de soja. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco representa diferença significativa de acordo com o teste <i>T de student</i>	21
Figura 3. Frequência de todas as anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) para animais da área controle (PNE: Parque Nacional das Emas) e da soja. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste <i>T de student</i>	21
Figura 4. Frequências isoladas das anormalidades eritrocitárias nucleares nos animais coletados na área protegida (PNE: Parque Nacional das Emas) e na plantação de soja. A: diferença significativa (asterisco) em relação a núcleos lobados de acordo com o teste <i>U de Mann Whitney</i> . B: diferença significativa (asterisco) em relação a núcleos reniformes de acordo com o teste <i>T de student</i> . Os círculos representam a média e as barras verticais o desvio padrão.....	22
Figura 5. Fotomicrografia do tecido hepático de <i>Leptodactylus fuscus</i> mostrando a quantidade e ocupação de melanomacrófagos no fígado. A: Animal coletado no Parque Nacional das Emas (PNE), B: Animal coletado na área de plantação de soja. É possível observar menor área pigmentada nos animais da área agrícola. As barras indicam 25 μ m. Coloração: HE.....	23
Figura 6. Área ocupada pelos melanomacrófagos hepáticos em <i>Leptodactylus fuscus</i> coletados na plantação de soja em comparação ao ambiente controle (PNE: Parque	

Nacional das Emas). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa na área de melanomacrófagos de acordo com o teste *T de student*.....23

CAPÍTULO II – EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO A ÁREAS AGRÍCOLAS SOBRE ANUROS: HÁ MUDANÇAS APÓS CESSAR A EXPOSIÇÃO?

Página

Figura 1. Eritrócitos de *Physalaemus nattereri* (aumento de 100x). A: micronúcleo, B: célula binucleada, C: broto nuclear, D: célula anucleada, E: núcleo lobado, F: núcleo entalhado, G: núcleo reniforme, H: núcleo segmentado.....43

Figura 2. Frequência de micronúcleo nos animais coletados na área de plantação de soja e eutanasiados logo em seguida (Soja/exposição) e nos animais mantidos em laboratório por 30 dias (Soja/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco representa diferença significativa de acordo com o teste *T de Student*.....43

Figura 3. Frequência de micronúcleos dos animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição” e dos animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.....44

Figura 4. Frequência de todas as anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) avaliadas nos animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição” e nos animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *T de Student*.....44

Figura 5. Área de melanomacrófagos hepáticos em *Physalaemus nattereri* coletados na soja. Comparação entre animais expostos (Soja/exposição) e animais que ficaram livres de exposição (Soja/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.....45

Figura 6. Fotomicrografia hepática de *Physalaemus nattereri* mostrando a área ocupada pelos melanomacrófagos. A: Animais do grupo “Soja/exposição”; B: Animais do grupo “Soja/laboratório”. É possível observar maior área pigmentada nos animais que passaram pelo período livre de exposição. As barras indicam 25 µm.....46

Figura 7. Área de melanomacrófagos hepáticos em *Physalaemus nattereri* coletados na plantação de cana-de-açúcar. Comparação entre animais que não passaram pelo período livre de exposição (Cana-de-açúcar/exposição) e animais que passaram pelo período livre de exposição por 30 dias em laboratório (Cana-de-açúcar/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.....46

Figura 8. Fotomicrografia hepática de *Physalaemus nattereri* mostrando a área ocupada pelos melanomacrófagos. A: Animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição”; B: Animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. É possível observar maior área pigmentada nos animais que passaram pelo período livre de exposição. As barras indicam 25 μm47

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

MN: Micronúcleo
AENs: Anormalidades Eritrocitárias Nucleares
DNA: Ácido desoxirribonucleico
UV: Ultravioleta
PNE: Parque Nacional das Emas
Km: Quilômetro
mm: Milímetros
ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
IFGoiano: Instituto Federal Goiano
mp: Megapixels
µm: Micrômetros
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
pH: Potencial Hidrogeniônico
LQ: Limite de Quantificação
VMP: Valor Máximo Permitido
NR: Não Há Recomendação
HE: Hematoxilina-Eosina
°C: Graus Celsius
µS: Microsiemens
ppm: Partes por Milhão
psu: *Practical Salinity Unit*
h: Horas
BN: Binucleada
BR: Broto
AN: Anucleada
LB: Lobado
EN: Entalhado
RE: Reniforme
SEG: Segmentado

RESUMO GERAL

ASSIS, RHAYANE ALVES DE. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio verde – Fevereiro de 2020. **Biomarcadores hepáticos e sanguíneos: Ferramentas morfológicas para estudos de impactos ambientais da atividade agrícola em anuros.** Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientadores: Alessandro Ribeiro de Morais e Lilian Franco-Belussi.

O crescimento de áreas agrícolas em todo o mundo gera não apenas preocupações ambientais como também acerca da saúde dos organismos não-alvo que habitam locais próximos a estas áreas. Contaminantes de origem agrícola, em especial pesticidas e fertilizantes, contaminam o solo e podem atingir corpos d'água através de aplicação direta ou escoamento. Assim, animais dependentes de habitats terrestres e aquáticos podem ser prejudicados. Desta forma, os anfíbios são bioindicadores de qualidade ambiental, devido a seu ciclo de vida dependente de ambientes aquáticos e terrestres, além de sua sensibilidade à contaminação uma vez que apresentam permeabilidade cutânea. Além disso, há especial interesse na avaliação destes animais devido ao declínio populacional observado para o grupo. Técnicas como o teste de micronúcleo (MN) e outras anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) e a análise de melanomacrófagos hepáticos são ferramentas para avaliação das alterações causadas por agentes xenobióticos. Neste sentido, este estudo apresenta dois capítulos, onde no primeiro é realizada uma investigação dos efeitos do manejo do plantio de soja sobre a frequência de MN e outras AENs, e a área ocupada por melanomacrófagos hepáticos no anuro *Leptodactylus fuscus* em comparação com uma área preservada (Unidade de Conservação). Foram encontradas diferenças significativas entre as áreas para ambas as

avaliações, com animais da área agrícola apresentando maior frequência de danos genotóxicos (MN e AENs) e menor área ocupada por melanomacrófagos. No segundo capítulo é apresentada uma avaliação da possibilidade de diminuição de danos causados pelo manejo de áreas agrícolas de soja e cana-de-açúcar em anuros da espécie *Physalaemus nattereri* após estes animais ficarem livres da exposição a estas áreas. O teste de MN e outras AENs e a análise de melanomacrófagos também demonstraram diferenças significativas entre animais expostos às áreas agrícolas e animais que passaram por um período livre de exposição. Houve redução da frequência de MN e AENs e aumento na área ocupada por melanomacrófagos em animais após o período sem exposição. Assim, este trabalho traz mais evidências de que o manejo de áreas agrícolas pode causar danos em anfíbios e demonstra que, caso a exposição cesse, estes danos podem ser reduzidos.

PALAVRAS-CHAVE: Agricultura, Anfíbios, Anormalidades eritrocitárias nucleares, Melanomacrófagos, Micronúcleo.

GENERAL ABSTRACT

ASSIS, RHAYANE ALVES DE. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio verde – Fevereiro de 2020. **Hepatic and blood biomarkers: Morphological tools for studies of environmental impacts of agricultural activity in anurans.** Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientadores: Alessandro Ribeiro de Moraes e Lilian Franco-Belussi.

The growth of agricultural areas around the world not only raises environmental concerns, but also about the health of non-target organisms that inhabit nearby locations those areas. Contaminants of agricultural origin, in especial, pesticides and fertilizers, contaminate the soil and can reach bodies of water through direct application or runoff. Therefore, animals dependent on terrestrial and aquatic habitats can be harmed. In this way, amphibians are bioindicators of environmental quality, due to their life cycle dependent on aquatic and terrestrial environments, in addition to their sensitivity to contamination, since it presents skin permeability. In addition, there is a special interest in the evaluation of these animals due to the population decline observed for the group. Techniques such as the micronucleus (MN) test and other erythrocyte nuclear abnormalities (ENAs) and the analysis of hepatic melanomacrophages are tools for assessing changes caused by xenobiotic agents. In this sense, this study presents two chapters, where the first investigates the effects of soybean management on the frequency of MN and other ENAs, and the area occupied by anuran liver melanomacrophages *Leptodactylus fuscus* compared to a preserved area (Unit Conservation). Significant differences were finding between the areas for the analyzes, with animals from the agricultural area with a higher frequency of genotoxic damage (MN and ENAs) and a smaller area occupied by

melanomacrophages. The second chapter presents an assessment of the possibility of reducing damage caused by the management of agricultural areas of soy and sugar cane in anurans of the species *Physalaemus nattereri* after these animals are free from exposure to these areas. The MN test and other ENAs and the analysis of melanomacrophages also demonstrated significant differences between animals exposed to agricultural areas and animals that have undergone a exposure free period. There was a reduction in the frequency of MN and ENAs and an increase in the area occupied by melanomacrophages in animals after the period without exposure. Thus, this work brings more evidence that the management of agricultural areas can cause damage to amphibians and shows that, if the exposure ceases, these damages can be reduced.

KEY WORDS: Agriculture; Amphibians; Erythrocyte nuclear abnormalities; Melanomacrophages; Micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura tem um papel fundamental na economia mundial, principalmente em países tropicais (Cruz-Esquivel et al., 2017). Estima-se que as áreas agrícolas cubram cerca de 38% da superfície da terra (Ramankutty et al., 2008; Foley et al., 2011; Babini et al., 2016), e sua expansão é considerada a principal causa de perturbação e fragmentação de habitats naturais (Babini et al., 2016) gerando impactos ambientais sem precedentes (Borges et al., 2019a). No Brasil, o crescimento do setor agrícola está relacionado à destruição generalizada dos ecossistemas, em especial o Cerrado (Gonçalves et al., 2017). Além da destruição de habitats, a contaminação por pesticidas é outro fator que impacta a vida selvagem em um cenário de intenso crescimento agrícola (Bernabò et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Borges et al., 2019a,b; Carvalho et al., 2019; Santos et al., 2019; Lopez-Gonzalez et al., 2019). Devido à extensa área plantada no país, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Pignati et al., 2017). Entre os efeitos já observados em organismos não-alvo que habitam áreas agrícolas, danos genotóxicos (Babini et al., 2016; Borges et al., 2019b) e histopatológicos (Rohr et al., 2008; Ghisi et al., 2017) são relatados.

Biomarcadores podem ser utilizados para avaliar as alterações induzidas por agentes xenobióticos em diversos grupos animais. O teste de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs), por exemplo, vem sendo utilizado ao longo dos anos para verificar a existência de danos ao DNA resultantes de impactos ambientais (Benvindo-Souza et al., 2020). Este teste é considerado uma forma simples, sensível e confiável de avaliação rápida de dano genético (Fenech, 2000; Cruz-Esquivel et al., 2017). Micronúcleos estão presentes nas células em frequência crescente quando o animal é exposto a algum agente tóxico que é capaz de causar fragmentação cromossômica (Garaj-Vrhovac et al., 2008; Bosch et al., 2011; Pollo et al., 2017). Uma vez que os

contaminantes se distribuem nos organismos pelo sangue (WHO, 1995; Fanali et al., 2018), neste tecido pode haver a indução de MN nas células (Fanali et al., 2018). Juntamente com a análise de MN, é apontada a existência de outras AENs como núcleos lobados, células binucleadas e núcleos entalhados que também foram relacionadas à genotoxicidade e mutagenicidade de xenobióticos (Pollo et al., 2015). Desta forma, os efeitos genotóxicos de contaminantes de origem agrícola como os pesticidas (Mesak et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2019) e os fertilizantes (Correia et al., 2017) já foram avaliados através do uso deste teste.

Melanomacrófagos também são utilizados como biomarcadores de contaminação nos órgãos hematopoiéticos, como o fígado, de vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) (Franco-Belussi et al., 2013; Santos et al., 2014; Fanali et al., 2018). Isto se deve ao fato de que estas células produzem e armazenam a melanina, a qual tem função de absorção e neutralização de agentes tóxicos (Zuasti et al., 1989; Fanali et al., 2018), estando relacionadas à desintoxicação bactericida e à imunidade inata (Franco-Belussi et al., 2013). Alterações na área ocupada pelos melanomacrófagos devido à exposição a contaminantes agrícolas também já foram evidenciadas (Çakici et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Huespe et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2019).

Entre os organismos bioindicadores de qualidade ambiental nos quais estas avaliações podem ser executadas, os anfíbios se apresentam como um dos principais grupos. Estes animais demonstram sensibilidade a contaminantes ambientais e são comumente encontrados em áreas agrícolas, o que faz com que a exposição a pesticidas seja considerada uma das causas do declínio populacional observado para o grupo (Gonçalves et al., 2015; Perez-Iglesias et al., 2016; Benvindo-Souza et al., 2020). Neste sentido, em países como o Brasil, onde a expansão de cultivos agrícolas como da soja e da cana-de-açúcar é uma realidade (Pignati et al., 2017), a necessidade de dados sistemáticos sobre os efeitos da contaminação na fauna de anfíbios anuros já foi apontada (Borges et al., 2019b).

Assim, este estudo avalia a genotoxicidade e histopatologia hepática das espécies de anuros *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) e *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) em regiões agrícolas do Cerrado brasileiro. Para isso, o trabalho é apresentado em dois capítulos, o primeiro teve como objetivo realizar uma investigação *in situ* sobre os efeitos de uma área de cultivo de soja, localizada no município de Rio Verde, Goiás, o qual é um dos principais consumidores de agrotóxicos do Brasil (Pignati et al., 2017) sobre a frequência de MN e AENs no sangue e a área de melanomacrófagos hepáticos de

L. fuscus quando comparados a animais de uma área preservada. Este tipo de estudo *in situ*, ou seja, no qual os animais foram coletados diretamente em áreas agrícolas, é importante para preencher lacunas de conhecimento com uma abordagem mais realista da toxicidade (Pollo et al., 2017). O segundo capítulo, por sua vez, é apresentado através de abordagem *in situ*, na qual, espécimes de *P. nattereri* foram coletados em áreas de soja e de cana-de-açúcar, sendo investigados os danos genotóxicos e alterações histopatológicas possivelmente causados por estas áreas nos indivíduos. Outra parte do estudo foi realizada *ex situ*, onde os animais foram mantidos em laboratório, livres da exposição a áreas agrícolas, para demonstrar pela primeira vez, se estes parâmetros podem ser alterados após o fim da exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 459.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E.A.S., Assis, R.A., Santos, C.G.A., Borges, R.E., Silva, D.M., Santos, L.R.S. 2020. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240: 124910.
- Bosch, B., Mañas, F., Nora, G., Aiassa, D. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3: 155-163.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Assis, R.A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., Oliveira, C. 2019a. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 2623–2634.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R.S., Assis, R.A., Oliveira, C. 2019b. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 22-28.
- Çakıcı, Ö. 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67: 237-243.
- Correia, J.E., Christofoletti, C.A., Ansoar-Rodríguez, Y., Guedes, T.A., Fontanetti, C.S. 2017. Comet Assay and Micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). *Chemosphere*, 173: 494-501
- Cruz-Esquivel, A., Vilorio-Rivas, J., Marrugo-Negrete, J. 2017. 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*, 24: 27392–27401.
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R., Oliveira, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237: 93-102.

- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 455: 81–95.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Balzer, C. 2011 Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478: 337–342.
- Franco-Belussi, L., Castrucci, A.M.D.L., Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7-a-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology*, 116: 316–324.
- Garaj-Vrhovac, V., Gajski, G., Ravlić, S. 2008. Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41: 473–476.
- Ghisi, N.C., Oliveira, E.C., Guiloski, I.C., Lima, S.B., Assis, H.C.S., Longui, S.J., Prioli, A.J. 2017. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. *Science of the Total Environment*, 609: 1208-1218.
- Gonçalves, M.W., Vieira, T.B., Maciel, N.M., Carvalho, W.F., Lima, L.S.F., Gambale, P.G., Cruz, A.D., Nomura, F., Bastos, R.P., Silva, D.M. 2015. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 3947-3954.
- Gonçalves, M.W., Campos, C.B.M., Batista, V.G., Cruz, A.D., Demarco-Junior, P., Bastos, R.P., Silva, D.M. 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere*, 182: 730-737.
- Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., Curi, L.M., Peltzer, P., Attademo, M.A., Villafane, N., Lajmanovich, R. 2016. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima glutation s-transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta Biológica Colombiana*, 22: 234-237.
- López-González, E.C., Siroski, P.A., Poletta, G.L. 2019. Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232: 337-344.
- Mesak, C., Mendes, B.O., Ferreira, R.O., Malafaia, G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 15235–15244.
- Oliveira, C.R., Fraceto, L.F., Rizzi, G.M., Salla, R.F., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M. 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 149: 304-313.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., Oliveira, C., Natale, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 9852–9861.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C. 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution*, 244: 733-746.
- Pignati, W.A., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C. 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, 22: 3281-3293.

- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 581.
- Pollo, F.E., Grenat, P.R., Salinas, Z.A., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 18179–18187.
- Ramankutty, N., Evan, A. T., Monfreda, C., Foley, J. A. 2008. Farming the planet: 1, geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles*, 22: 1–19.
- Rohr, J.R., Schotthoefer, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Schoff, P.K. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455: 1235.
- Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C. 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anatomical Records*, 297: 864-875.
- Santos, S.W., Gonzalez, P., Cormier, B., Mazzella, N., Bonnaud, B., Morin, S., Clérandeau, C., Morin, B., Cachot, J. 2019. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 216: 105291.
- WHO. World Health Organization IPCS. 1995. In: *Environmental Health Criteria 165 e Inorganic Lead*. Publish under the Joint Sponsorship of the United Nations Environment Programme, vol. 300. the International Labour Organization, and the World Health Organization.
- Zuasti, A., Jara, J.R., Ferre, C., Solano, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2: 93-99.

2. OBJETIVOS

Geral:

Analisar a possível influência de práticas agrícolas na ocorrência de dano genotóxico no tecido sanguíneo e de alterações histopatológicas no tecido hepático de anfíbios anuros adultos coletados em ambientes de plantações de soja e cana-de-açúcar. Comparar os dados destes animais com os de outros da mesma espécie coletada em área preservada. Avaliar a possibilidade de recuperação dos danos causados pelo manejo destas áreas nestes animais após o fim da exposição.

Especificamente, objetiva-se realizar a:

- Delimitação das áreas de coletas e identificação dos espécimes de anuros;
- Análise das células sanguíneas dos animais através do teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares, tais como: células anucleadas, binucleadas, com núcleo lobado e broto nuclear;
- Análise histológica do tecido hepático dos animais de ambos os ambientes a fim de quantificar a presença de melanomacrófagos;
- Comparação dos parâmetros sanguíneos e hepáticos entre *Leptodactylus fuscus* coletados em área de soja e em área preservada;
- Comparação dos parâmetros sanguíneos e hepáticos entre *Physalaemus nattereri* expostos a áreas de soja e cana-de-açúcar e animais após o fim da exposição a estas áreas.

3. CAPÍTULO I

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS SANGUÍNEOS E
HEPÁTICOS EM *Leptodactylus fuscus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)
COLETADOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS**

Utilização de biomarcadores morfológicos sanguíneos e hepáticos em *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) coletados em áreas agrícolas

RESUMO

Anfíbios são considerados bioindicadores de qualidade ambiental devido às suas características específicas, como a permeabilidade cutânea e ciclo de vida dependente do ambiente terrestre e aquático. Essas características os tornam susceptíveis a efeitos de xenobióticos nesses dois ambientes, o que contribui para o declínio populacional desses animais. O teste de anormalidades nucleares em eritrócitos é uma forma de avaliação genotóxica em diversos grupos animais. Da mesma forma, a análise dos melanomacrófagos é capaz de indicar alterações específicas na pigmentação hepática causadas por contaminantes em vertebrados ectotérmicos. Neste estudo, estas duas análises foram aplicadas em conjunto para uma avaliação *in situ* dos efeitos tóxicos do manejo de área agrícola em anuros da espécie *Leptodactylus fuscus*. Para o estudo, foram utilizados animais provenientes de uma unidade de conservação considerada como área controle. Foi encontrada frequência significativamente maior ($p < 0,05$) de micronúcleos, células com núcleo lobado e células com núcleo reniforme em animais da área agrícola. A análise combinada de todas as anormalidades eritrocitárias nucleares também demonstrou frequência maior destas em animais habitantes de ambiente agrícola ($p < 0,05$). Contudo, a avaliação de melanomacrófagos apontou redução significativa da área ocupada por estas células em animais de área agrícola ($p < 0,05$). Estes resultados são mais uma evidência da alta sensibilidade dos anuros a alterações ambientais, bem como da eficiência do teste de micronúcleo e alterações eritrocitárias nucleares e da análise de melanomacrófagos na avaliação dessas alterações. Assim, estudos futuros podem replicar estas análises para ampliar o conhecimento sobre o estado de saúde dos anuros que habitam áreas antropizadas, principalmente pela agricultura.

Palavras-chave: Anfíbios, Anormalidades eritrocitárias nucleares, Ecotoxicologia, Melanomacrófagos, Micronúcleo.

**Use of blood and hepatic morphological biomarkers in *Leptodactylus fuscus*
(Anura: Leptodactylidae) collected in agricultural areas**

ABSTRACT

Amphibians are considered bioindicators of environmental quality due to their specific characteristics, such as skin permeability and life cycle dependent on the terrestrial and aquatic environment. These characteristics make them susceptible to the effects of xenobiotics in these two environments, which contributes to the population decline of these animals. The test of the erythrocytes nuclear abnormalities is a form of genotoxic evaluation in several animal groups. Likewise, the analysis of melanomacrophages is able to indicate specific changes in liver pigmentation caused by contaminants in ectothermic vertebrates. In this study, these two analyzes were applied together for an *in situ* assessment of the toxic effects of agricultural area management on anurans of the species *Leptodactylus fuscus*. For the study, animals from a conservation unit considered as a control area were used. A significantly higher frequency ($p < 0.05$) of micronuclei, cells with a lobed nucleus and cells with a reniform nucleus was found in animals in the agricultural area. The combined analysis of all erythrocyte nuclear abnormalities also demonstrated a higher frequency of these in animals inhabiting an agricultural environment ($p < 0.05$). However, the evaluation of melanomacrophages showed a significant reduction in the area occupied by these cells in animals from the agricultural area ($p < 0.05$). These results are further evidence of the high sensitivity of anurans to environmental changes, as well as the efficiency of the micronucleus test and nuclear erythrocyte changes and the analysis of melanomacrophages in the evaluation of these changes. Thus, future studies can replicate these analyzes to expand knowledge about the health status of anurans that inhabit anthropized areas, mainly through agriculture.

Key words: Amphibians, Ecotoxicology, Melanomacrophage, Micronucleus, Nuclear erythrocyte abnormalities.

3.1 INTRODUÇÃO

Anfíbios desempenham um papel importante em comunidades aquáticas e terrestres, agindo como indicadores da sensibilidade da população a estresses causados por atividades antrópicas (Böll et al., 2013; Green et al., 2019). Além disso, também são importantes em agroecossistemas, uma vez que são considerados alguns dos principais predadores naturais de pragas agrícolas em todo o mundo (Arcaute et al., 2014). No entanto, os anfíbios são um dos táxons mais ameaçados do planeta devido ao rápido declínio pelo qual as populações destes animais estão passando (Stuart et al., 2004; Ficetola e Maiorano, 2016; Carvalho et al., 2019). Doenças (Vredenburg et al., 2010), modificações de habitat (Blaustein et al., 2011), espécies exóticas (Collins, 2010), radiação UV (Franco-Belussi et al., 2018) e o uso de pesticidas (Arcaute et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2016; Borges et al., 2019a; Carvalho et al., 2019, Benvindo-Souza et al., 2020) estão entre as causas deste declínio populacional.

Em consequência do aumento populacional humano, as práticas agrícolas crescem no mundo todo, levando consigo um aumento no consumo de agroquímicos (Köhler; Triebkorn, 2013; Bernabò et al., 2016). Nas últimas décadas, este crescimento levou à deterioração do solo, em especial devido à contaminação por pesticidas, o que gerou impactos sobre diversos ecossistemas (Caraffa et al., 2013; Cruz-Esquivel et al., 2017). Em relação aos habitats aquáticos, os produtos químicos usados nas práticas agrícolas podem gerar contaminação quando despejados direta ou indiretamente em corpos d'água (Lajmanovich et al., 2014). A presença destes compostos pode atingir os organismos não-alvo que habitam estes ambientes gerando alterações genéticas, bioquímicas, morfológicas e fisiológicas sub-letais (Köhler; Triebkorn, 2013; Pérez-Iglesias et al., 2019, Borges et al., 2019a). No caso dos anfíbios, seu ciclo de vida bifásico e sua pele permeável, fazem com que estes animais sejam particularmente sensíveis à contaminação e os tornam susceptíveis à maior absorção de xenobióticos (Quaranta et al., 2009; Bernabò et al., 2016). Devido a esta particularidade, nos últimos anos tem sido observado um aumento no número de estudos ecotoxicológicos com este grupo (Burlibaşa; Gavrilă, 2011; Fanali et al., 2018, Borges et al., 2019b).

O teste de micronúcleo foi desenvolvido para anfíbios há mais de 30 anos (Benvindo-Souza et al. 2020) no entanto, seu uso em estudos *in situ* é recente. Sua utilização foi consolidada por ser considerado um teste de simples acesso, com alta sensibilidade e confiabilidade, demonstrando seus resultados de forma rápida (Fenech, 2000; Cruz-Esquivel et al., 2017). Micronúcleos são fragmentos cromossômicos ou

cromossomos inteiros não incorporados ao núcleo da célula de um tecido em divisão (Udroiu et al., 2015) e quando estes fragmentos ocorrem em frequência crescente, sua presença é indicativo de dano genotóxico e resposta precoce de dano cromossômico (Garaj-Vrhovac et al., 2008; Bosch et al., 2011). Além do micronúcleo, outras anormalidades nucleares têm sido relacionadas aos processos de divisão e morte celular, genotoxicidade e mutagenicidade de xenobióticos (Pollo et al., 2015). Entre estas anormalidades, alguns autores destacam a presença de bolhas nucleares, núcleos lobados, células binucleadas e núcleos entalhados como indicativo de dano (Pollo et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2016; Mesak et al., 2018).

Além do micronúcleo e das anormalidades nucleares, há na literatura a utilização de outros biomarcadores morfológicos que podem indicar efeitos de contaminação (Paetow et al., 2012; Franco-Belussi et al., 2013; Santos et al., 2014), os melanomacrófagos, por responderem de modo eficiente à ação de xenobióticos (Franco-Belussi et al., 2016; Fanalli et al., 2018). Melanomacrófagos são células pigmentadas com atividade fagocítica encontradas em órgãos hematopoiéticos, como fígado e baço, de vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) (Agius, 1980; Fishelson, 2006; Franco-Belussi et al., 2013; Santos et al., 2014). Estas células produzem e armazenam a melanina, que por sua vez absorve e neutraliza os radicais livres e outros agentes tóxicos (Zuasti et al., 1989; Fanalli et al., 2018). Portanto, a desintoxicação é considerada uma das principais funções dos melanomacrófagos (Passantino et al., 2014; Fanalli et al., 2018). Em anfíbios, a análise destas células já foi aplicada em avaliações do efeito de agroquímicos (Oliveira et al., 2016; Huespe et al., 2016), demonstrando sua eficiência como biomarcador.

Neste sentido, diversos estudos laboratoriais já utilizaram estas técnicas para testar os efeitos de contaminantes. No entanto, os resultados destes estudos nem sempre são ecologicamente relevantes, uma vez que as condições de campo podem não ser simuladas com precisão em laboratório (Castro et al., 2003; Pollo et al., 2017). Assim, os estudos *in situ* são uma forma de gerar informações mais realistas considerando a interação de diferentes fatores no ambiente (Pollo et al., 2017). Uma vez que a América do Sul, especialmente o Brasil, passa por uma grande expansão das áreas agrícolas (Dias et al., 2016) e intenso uso de pesticidas (Pignati et al., 2017), estudos avaliando os possíveis efeitos do manejo destas áreas sobre a fauna de anuros do Cerrado brasileiro são importantes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do manejo de uma área agrícola na região Centro-Oeste do Brasil sobre a espécie de

anfíbio anuro *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) através da análise de alterações eritrocitárias e melanomacrófagos hepáticos, ambos considerados marcadores biológicos. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo *in situ* utilizando estas duas técnicas para monitoramento de populações naturais em áreas agrícolas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta dos espécimes

O estudo foi realizado em duas áreas localizadas no Cerrado brasileiro, porém, com diferentes históricos de uso do solo. Uma destas áreas está situada no município de Rio Verde, estado de Goiás e é caracterizada pela presença de plantação de soja (S17°47.742'W051°06.089'). Este município é considerado o principal exportador de soja do estado (IMB, 2019) e até o ano de 2017 ocupava o oitavo lugar no ranking de exportação nacional (IBGE, 2017). A área de cultivo de soja foi escolhida neste estudo, visto que entre as grandes culturas agrícolas esta se destaca pela maior utilização de agrotóxicos no Brasil (Pignati et al., 2017). Desta forma, Rio Verde representa um ambiente com alta probabilidade de efeitos genotóxicos sobre organismos que habitam o local (Borges et al., 2019b). A outra área selecionada para este estudo foi o Parque Nacional das Emas (PNE), uma unidade de conservação federal com cerca de 132.000 hectares localizada nos municípios goianos de Mineiros e Chapadão do Céu e em parte de Costa Rica, estado do Mato Grosso do Sul (ICMBio, 2019). A área apresenta topografia plana e predominância de chapadões, abrangendo diferentes formações de Cerrado, como os campos limpos, campos sujos, veredas e matas ciliares (ICMBio, 2019). O PNE foi escolhido neste estudo como área controle por se tratar de um local predominantemente preservado. Neste ambiente, a coleta dos animais ocorreu em uma área úmida localizada a, no mínimo, 10 km da borda do parque (S18°06.990'W052°55.024').

A espécie de anuro *Leptodactylus fuscus* apresenta tamanho médio ($42,8 \pm 4,0$ mm em machos e $43,6 \pm 4,4$ mm em fêmeas) (Sugai et al., 2012), ocorre em toda a América do Sul (Frost, 2019), é típica de habitats abertos e considerada colonizadora de áreas degradadas (Wynn; Heyer, 2001; Sugai et al., 2012). Os animais foram coletados no mês de novembro de 2018 no ambiente agrícola em Rio Verde, período de plantio da soja, e no mês de dezembro de 2018 no PNE. Dez indivíduos machos adultos foram coletados em cada ambiente através de busca ativa, totalizando vinte indivíduos ao final das coletas.

O período de coleta foi selecionado por ser a estação chuvosa na qual a espécie se encontra em seu período reprodutivo e, portanto, de maior atividade. A identificação do sexo foi feita com base na atividade de vocalização (Duellman; Trueb, 1994). Os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano (IFGoiano), campus Rio Verde onde foram realizadas as análises. Para cada animal, foram registrados o peso total e o comprimento rostro-cloacal utilizando balança analítica de precisão e paquímetro digital. Para este estudo, licenças para a coleta e uso dos animais foram obtidas através do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o nº 62687-1 e da Comissão de Ética no Uso de Animais do IFGoiano (CEUA/IFGoiano) sob o nº 6643030518.

Teste de Micronúcleo e outras Anormalidades Eritrocitárias Nucleares

Após a coleta, os animais foram eutanasiados por imersão no anestésico Benzocaína (5g/L) (Fanalli et al., 2018). Logo após, foi feita uma incisão abdominal a partir da qual foram obtidas as células sanguíneas circulantes da cavidade abdominal com auxílio de agulha heparinizada e seringa (25 mm x 0.7 mm). Foram confeccionadas 2 lâminas sanguíneas por animal, as quais foram fixadas em metanol gelado por 20 minutos e posteriormente coradas com solução de Giemsa (5%) por 12 minutos (Pérez-Iglesias et al., 2016, Borges et al., 2019b). Foi analisado um total de 2000 células por animal em microscópio óptico (Laborana LAB-1001TB) com câmera digital acoplada (Laborana 3.0Mp) e aumento de 100 x (Cruz-Esquivel et al., 2017).

Os critérios utilizados para identificação de Micronúcleo (MN) foram (a) intensidade de coloração igual à do núcleo principal da célula, porém, diâmetro inferior; (b) formato arredondado e sem ligação com o núcleo principal; (c) não haver sobreposição ao núcleo principal e estar localizado dentro do citoplasma (Fenech, 2000; Pollo et al., 2017). As outras anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) avaliadas foram: célula binucleada, broto nuclear, célula anucleada, núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo reniforme e núcleo segmentado (Cruz-Esquivel et al., 2017; Borges et al., 2019b). Os dados de frequência destas AENs são apresentados por cada tipo isoladamente e pelo conjunto de todas elas, conforme abordagem padrão (Pollo et al., 2015; Borges et al., 2019b).

Análise da melanina hepática

Fragmentos de fígado de *L. fuscus* foram removidos, pesados em balança analítica de precisão e fixados em metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) para as análises histológicas. Posteriormente, foi feita a desidratação em

série alcoólica e a inclusão em historesina (kit de inclusão Leica-historesina). Secções de 2µm foram cortadas com auxílio de micrótomo (RM 2265, Leica, Switzerland), depositadas sobre as lâminas, coradas com Hematoxilina e Eosina e fotografadas em microscópio com aumento de 20 x (Leica DM4 B) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica DMC 4500).

A pigmentação hepática foi quantificada utilizando o programa Image Pro-Plus Media-Cybernetics Inc. (versão 6.0) com base na intensidade de cor. Para cada animal, foram fotografados e analisados 25 campos histológicos aleatórios. Todos os procedimentos estão de acordo com os protocolos de Santos et al. (2014), Franco-Belussi et al. (2016) e Fanalli et al. (2018).

Análise de água

Amostras de água foram coletadas na área agrícola em Rio Verde e no PNE para análises físico-químicas. As amostras foram armazenadas em frascos específicos a uma temperatura de <4°C e enviadas ao laboratório para a avaliação da presença de pesticidas carbamatos, organoclorados e organofosforados. Os seguintes parâmetros foram testados: 2, 4-D + 2, 4, 5-T; Alaclor; Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfoxi; Aldrin + Dieldrin; Atrazina; Carbendazim + Benomil; Carbofuran; Clordano (Cis + Trans); Clorpirifos + Clorpirifos Oxon; Ddt; Diuron; Endossulfan (Alfa + Beta + Sulfato); Endrin; Glifosato + Ampa; Lindano; Mancozebe; Metamidofos; Metolacloro; Molinato; Metil Paration; Pendimetalina; Permetrina; Profenofos; Simazina; Tebuconazol; Terbufos e Trifluralina. As análises foram feitas de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23ª edição, e os parâmetros avaliados foram selecionados com base na resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 17 de março de 2005. Além disso, parâmetros como temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, resistividade, salinidade e sólidos totais dissolvidos foram mensurados *in situ* no momento da coleta das amostras de água no período da tarde usando equipamento medidor multiparâmetro portátil (Bante900P).

Análises estatísticas

Os dados de MN e AENs são apresentados como média±desvio padrão. Foram realizadas comparações entre os dois ambientes amostrados (área agrícola e PNE) para a frequência de MN, AENs e área de melanomacrófagos. Para estas análises, a homogeneidade das variâncias foi testada através do teste de Levene, sendo utilizado o

teste *T de Student* para dados paramétricos e o teste *U de Mann Whitney* para dados não-paramétricos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todas as análises.

3.3 RESULTADOS

Parâmetros da água

Os resultados da avaliação dos parâmetros da água em relação à presença de agroquímicos em ambos os ambientes, PNE e área agrícola com plantio de soja, bem como, os valores máximos permitidos de acordo com a resolução nº 357 do CONAMA de 17 de março de 2005 se encontram na Tabela 1. Não houve valores acima do limite de quantificação para nenhum dos parâmetros avaliados. Quanto aos parâmetros avaliados *in situ* nos dois ambientes, os valores são demonstrados na Tabela 2. O ambiente do PNE demonstrou valor de pH neutro em contraste com o valor ácido encontrado na área de plantio de soja. O maior valor para oxigênio dissolvido também foi encontrado no PNE, enquanto para os outros parâmetros, os valores mais altos são encontrados na plantação de soja.

Tabela 1. Concentração dos contaminantes carbamatos, organoclorados e organofosforados na plantação de soja e no Parque Nacional das Emas (PNE).

Parâmetros	Resultados ($\mu\text{g/L}$)		LQ	VMP
	PNE	Plantação de soja		
2 Clorofenol	<0,05	<0,05	0,05	0,1
2,4 Diclorofenol	<0,05	<0,05	0,05	0,3
Pentaclorofenol	<0,1	<0,1	0,1	0,009
Glifosato	<55	<55	55	65
Aldrin + Dieldrin	<0,02	<0,02	0,02	NR
Heptacloro epóxido+ Heptacloro	<0,005	<0,005	0,005	0,01
2,4 D	<0,15	<0,15	0,15	4
2,4,5 T	<1,0	<1,0	1	2
2,4,5 TP	<1,0	<1,0	1	NR
Alaclor	<0,1	<0,1	0,1	NR
Atrazina	<1,0	<1,0	1	NR
Carbaril	<0,01	<0,01	0,01	0,02
Clordano (cis + trans)	<0,02	<0,02	0,02	0,04
Demeton	<0,02	<0,02	0,02	0,1
Dodecacloropentaciclodecano (Mirex)	<0,001	<0,001	0,001	NR
Endossulfan (a+b+sulfato)	<0,03	<0,03	0,03	0,056
Endrin	<0,001	<0,001	0,001	0,004
Gama-BHC (Lindano)	<0,01	<0,01	0,01	0,02
Gution	<0,004	<0,004	0,004	0,005
Hexaclorobenzeno	<0,001	<0,001	0,001	0,0065
Malation	<0,05	<0,05	0,05	0,1

Metolacoloro	<0,1	<0,1	0,1	10
Metoxicloro	<0,001	<0,001	0,002	0,03
o,p-DDD+o,p-DDE+o,p-DDT	<0,003	<0,003	0,003	0,002
o,p-DDT	<0,001	<0,001	0,001	0,002
Paration	<0,01	<0,01	0,01	0,04
Simazina	<0,1	<0,1	0,1	2
Toxafeno	<0,01	<0,01	0,01	0,01
Trifluralina	<0,05	<0,05	0,05	0,2
1,1 Dicloroeteno	<0,10	<0,10	0,1	0,003
1,2 Dicloroetano	<0,45	<0,45	0,45	0,01
Tetracloroeteno	<0,31	<0,31	0,31	0,01
Triclorobenzeno (1,2,3+1,2,4+1,3,5)	<0,43	<0,43	0,43	0,02
Tricloroeteno	<2,00	<2,00	2	NR

LQ: Limite de Quantificação; VMP: Valor Máximo Permitido de acordo com a resolução nº 357 do CONAMA de 17 de março de 2005; NR: Não há recomendação.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água avaliados *in situ* nos ambientes de coleta de *Leptodactylus fuscus*.

Parâmetros	PNE	Plantação de soja
Temperatura da água	23,2°C	35,7°C
pH	7,41	5,38
Condutividade	2,56µS	3,70µS
Sólidos totais dissolvidos	1,74ppm	1279ppm
Salinidade	0,01psu	1,31psu
Resistividade	3,20	398
Oxigênio dissolvido	101,9%	76,1%

PNE: Parque Nacional das Emas

Teste de micronúcleo e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs)

Além de células micronucleadas, foram encontradas AENs, como células binucleadas, brotos nucleares, células anucleadas, núcleos lobados, núcleos entalhados, núcleos reniformes e núcleos segmentados nos eritrócitos de *L. fuscus* (Figura 1).

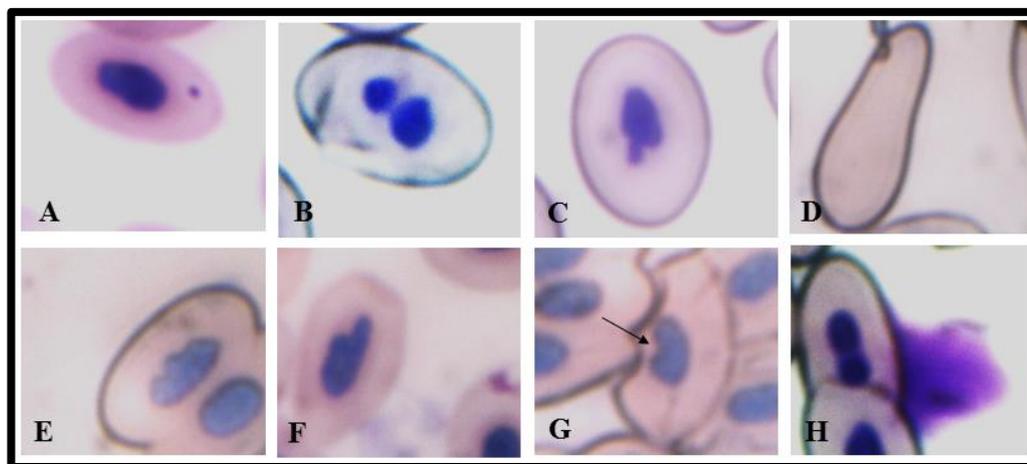


Figura 1. Eritrócitos de *Leptodactylus fuscus* (aumento de 100 x). A: micronúcleo, B: célula binucleada, C: broto nuclear, D: célula anucleada, E: núcleo lobado, F: núcleo entalhado, G: núcleo reniforme (seta), H: núcleo segmentado.

Houve diferença significativa em relação à frequência de MN entre os ambientes amostrados, sendo a maior frequência encontrada nos animais coletados na plantação de soja ($t= 3,095$; $p<0,05$; Figura 2; Tabela 3).

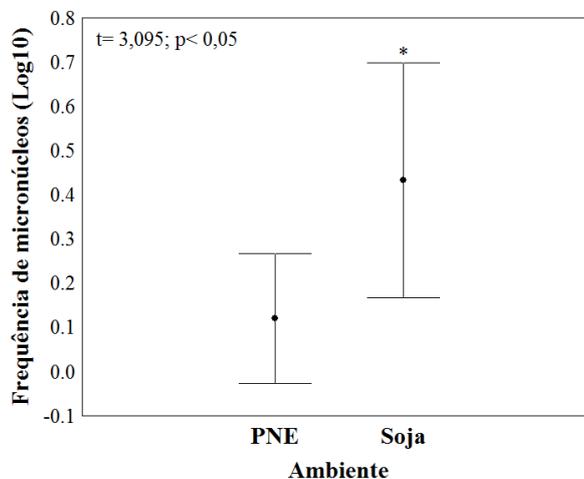


Figura 2. Frequência de micronúcleo nos animais coletados no Parque Nacional das Emas (PNE) e na área de plantio de soja. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco representa diferença significativa de acordo com o teste *T de student*.

Quando todas as AENs foram avaliadas em conjunto, também foi encontrada maior frequência na área de soja em comparação com a área controle ($t= 2,134$; $p<0,05$; Figura 3).

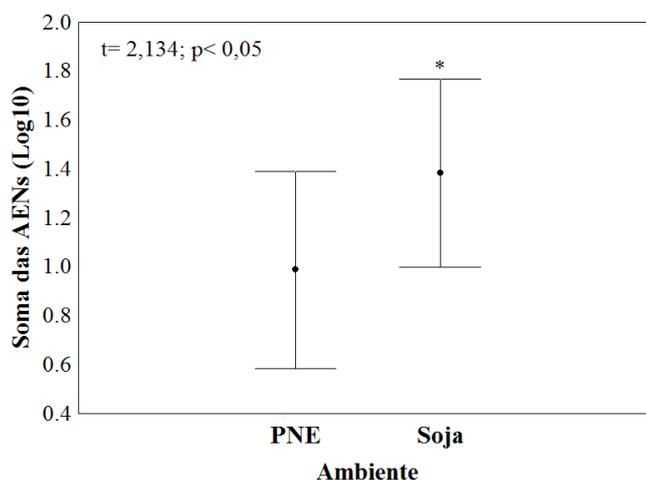


Figura 3. Frequência de todas as anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) para animais da área controle (PNE: Parque Nacional das Emas) e da área de plantio de soja. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *T de student*.

Além disso, também houve significativamente mais células com núcleo lobado ($u= 20,000$; $p<0,05$; Figura 4A; Tabela 3) e núcleo reniforme ($t= 5,077$; $p<0,05$; Figura 4B; Tabela 3) no ambiente de plantio de soja quando estas anormalidades foram avaliadas isoladamente.

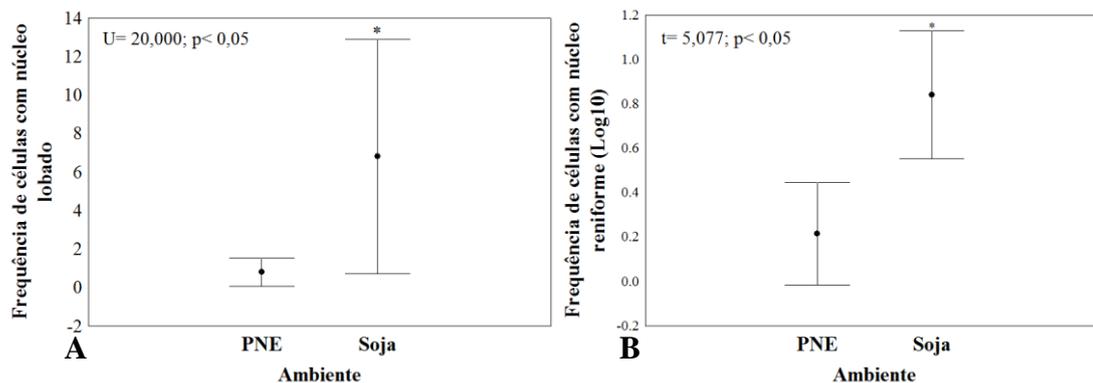


Figura 4. Frequências isoladas das anormalidades eritrocitárias nucleares nos animais coletados na área protegida (PNE: Parque Nacional das Emas) e na plantação de soja. A: diferença significativa (asterisco) em relação a núcleos lobados de acordo com o teste *U de Mann Whitney*. B: diferença significativa (asterisco) em relação a núcleos reniformes de acordo com o teste *T de student*. Os círculos representam a média e as barras verticais o desvio padrão.

Tabela 3. Média de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de *Leptodactylus fuscus* coletados na área protegida e em área de plantação de soja.

MN e AENs	PNE (n10) Média±SD	Soja (n10) Média±SD
Micronúcleo	0,12±0,15	0,43±0,27*
Célula binucleada	0,10±0,31	0,20±0,63
Broto nuclear	2,40±3,65	3,40±1,77
Célula anucleada	0,40±0,69	1,10±1,28
Núcleo lobado	0,80±0,78	6,80±6,42*
Núcleo entalhado	0,67±0,29	0,86±0,52
Núcleo reniforme	0,21±0,24	0,84±0,30*
Núcleo segmentado	3,10±3,84	1,90±1,85

Valores de média±SD (desvio padrão); PNE: Parque Nacional das Emas; *p<0,05, diferença significativa de acordo com o teste *T de student* e teste *U de Mann-Whitney*.

Análise dos melanomacrófagos hepáticos

A área ocupada por melanomacrófagos no tecido hepático dos indivíduos de *Leptodactylus fuscus* foi significativamente menor em animais coletados na área agrícola de plantação de soja em comparação com os animais coletados na área controle (Parque Nacional das Emas) ($t=-22,886$; $p<0,05$). Estes resultados são demonstrados nas figuras 5 e 6.

Quanto à área total ocupada, os melanomacrófagos presentes no tecido hepático de *Leptodactylus fuscus* coletados no Parque Nacional das Emas ocuparam uma porcentagem de cerca de 3,08% da área total do tecido, já em animais de ambiente agrícola de plantação de soja, a ocupação foi de aproximadamente 0,93% da área total do tecido.

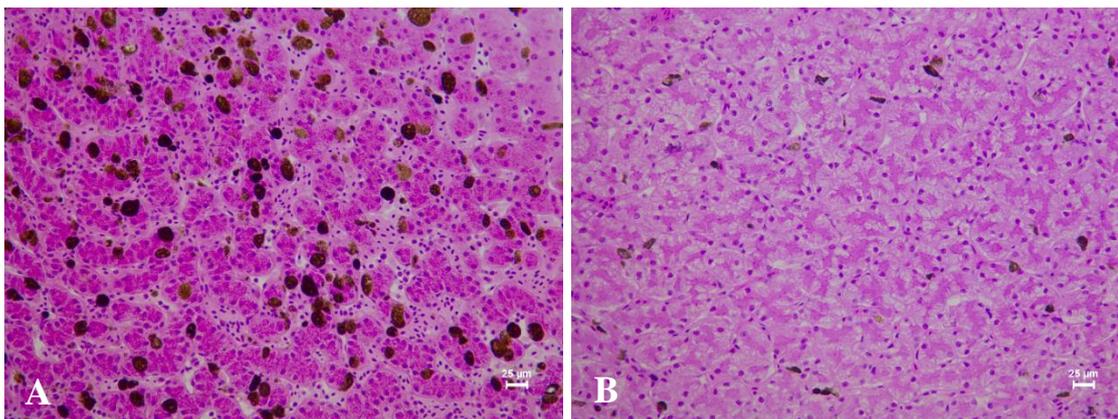


Figura 5. Fotomicrografia do tecido hepático de *Leptodactylus fuscus* mostrando a quantidade e ocupação de melanomacrófagos no fígado. A: Animal coletado no Parque Nacional das Emas (PNE), B: Animal coletado na área de plantação de soja. É possível observar menor área pigmentada nos animais da área agrícola. As barras indicam 25 µm. Coloração: HE.

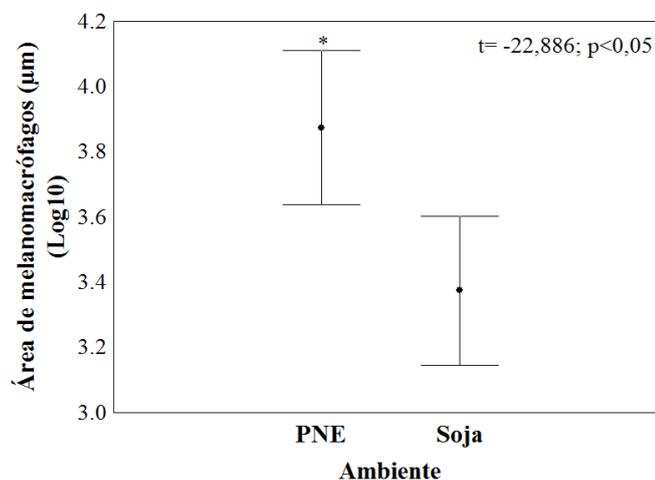


Figura 6. Área ocupada pelos melanomacrófagos hepáticos em *Leptodactylus fuscus* coletados na plantação de soja em comparação ao ambiente controle (PNE: Parque Nacional das Emas). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa na área de melanomacrófagos de acordo com o teste *T de student*.

3.4 DISCUSSÃO

Parâmetros da água

Apesar de todos os pesticidas analisados estarem abaixo do limite de quantificação do método utilizado, é importante ressaltar que a detecção destes compostos na água depende do tempo de aplicação e do mecanismo de transporte e diluição no ambiente (Dellamatrice; Monteiro, 2014). Assim, a concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa, principalmente no meio da estação chuvosa (Kuivila; Hladik, 2008), período no qual as amostras foram coletadas na área agrícola. O fato da baixa solubilidade destes compostos em água, bem como, o efeito de diluição podem contribuir para este resultado (Dores; Feire, 2001). Além disso, estudos recentes de Borges et al.

(2019a,b) analisaram amostras de água em área de plantação de soja em Rio Verde, detectando uma quantidade de atrazina milhares de vezes acima do valor máximo permitido pela legislação, além de outros 28 compostos que se encontravam abaixo desse valor. Os mesmos estudos avaliaram amostras de água coletadas no PNE e constataram que todos os compostos químicos estavam abaixo de seu valor máximo permitido e com concentrações inferiores às encontradas na amostra de Rio Verde. O estudo de Pignati et al. (2017) aponta Rio Verde como um dos dez municípios que mais consomem pesticidas no Brasil e indica que a cultura da soja utiliza em média 17,7 litros de agroquímicos por hectare. É importante ressaltar que, por se tratarem de animais adultos, a exposição à contaminação pode ocorrer também no solo através da aplicação direta de pesticidas. Desta forma, uma amostragem mais ampla e outras análises de água e solo do local em diferentes períodos do ano poderiam complementar estes dados.

Quanto aos parâmetros avaliados *in situ*, sabe-se que o pH e a temperatura influenciam a toxicidade de diversos poluentes (Hoffman et al., 2010; Pollo et al., 2017). Quanto aos anfíbios, o pH ideal para o seu desenvolvimento saudável varia de 6,3 a 7,7 (García; Fontúrbel, 2003; Babini et al., 2015; Pollo et al., 2017). Assim, nota-se que o valor de pH encontrado no PNE (7,41) está dentro do limite adequado para os anfíbios, em contraste com o valor apresentado pela análise realizada na plantação de soja (5,38). Além disso, na área de plantação de soja foram registrados valores mais altos para condutividade, sólidos totais dissolvidos e salinidade. Isto pode ser resultado de um processo de mineralização causado pela atividade antrópica desenvolvida no local (Gatica et al., 2012; Babini et al., 2015). Um valor alto de salinidade, especificamente, influencia diretamente organismos dependentes da água doce, uma vez que estes necessitam manter uma pressão osmótica interna em relação ao ambiente (Pollo et al., 2017). Assim, quando a salinidade se encontra alta, estes mecanismos de osmorregulação podem entrar em colapso, o que pode resultar em dano celular ou até mesmo morte (Cañedo Argüelles et al., 2013; Pollo et al., 2017).

Teste de micronúcleo e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs)

Todos os parâmetros investigados por meio do teste de MN e outras AENs demonstraram frequências maiores em animais coletados na área de plantio de soja quando comparados a animais coletados na área preservada. Foi demonstrado um aumento significativo na frequência de MN em *L. fuscus* que habitam ambiente agrícola em comparação àqueles de ambiente preservado. A formação de MN é apontada como resultado da ação de agentes genotóxicos que geram lesões de DNA (Fenech, 2000; Pollo

et al., 2015) ou ainda como produto da remoção de material que estaria em excesso no núcleo principal e que causaria instabilidade genômica (Prieto-García et al., 2007; Pollo et al., 2015). Neste contexto, resultados similares são encontrados em outros estudos *in situ* recentes com diferentes espécies de anuros em fase larval e adulta em habitats perturbados pelas práticas agrícolas (Pollo et al., 2015; Babini et al., 2015; Cruz-Esquivel, 2017; Borges et al., 2019b). Estes resultados evidenciam a importância deste tipo de estudo na avaliação do estado de saúde das populações que habitam ambientes perturbados (Hoffman et al., 2003). Considerando que estudos *in situ* estão sujeitos à interação de múltiplos estressores (Pollo et al., 2017), é importante ressaltar que em áreas agrícolas, fatores como altas temperaturas podem aumentar o efeito tóxico das substâncias químicas utilizadas (Hoffman et al., 2003). Em nosso estudo, a temperatura registrada na água do ambiente agrícola foi cerca de 12°C superior à encontrada no PNE, o que pode ter contribuído para a alta taxa de MN detectada para animais deste ambiente.

Além dos estudos *in situ*, diversos trabalhos experimentais avaliaram o efeito de produtos usados nas práticas agrícolas em anuros e apontaram a formação de MN como resposta à exposição. Entre estes trabalhos, Perez-Iglesias et al. (2019) avaliaram os efeitos de um herbicida à base de Atrazina em girinos de *Rhinella schneideri* e detectaram aumento na frequência de MN nos animais expostos por 48h e 96h em relação ao controle. Mesak et al. (2018) testaram o herbicida 2,4-D em concentração ambientalmente relevante do produto (1,97mg/L) e detectaram aumento nas células micronucleadas em girinos de *Lithobates catesbeianus* após 3, 5 e 9 dias de exposição.

Estudos experimentais avaliando efeitos de pesticidas na formação de MN em anuros adultos são menos comuns. Entre estes, o estudo de Pérez-Iglesias et al. (2016) apontou influência na frequência de MN e de melanomacrófagos hepáticos em espécimes de *Leptodactylus latinasus* expostos ao herbicida Glifosato, um dos mais usados no mundo.

Quanto às demais AENs, foi encontrado um aumento significativo na frequência de células com núcleo lobado e com núcleo reniforme em animais da área agrícola quando estas AENs foram avaliadas isoladamente. Os mecanismos que levam à formação das AENs em geral, ainda não foram totalmente explicados (Çavaş; Ergene-Gözükara, 2003; Silva-Souza; Fontanetti, 2006; Pollo et al., 2015). Entretanto, núcleos lobados e reniformes estão relacionados a diferentes meios precursores de MN e células binucleadas (Araújo et al., 2019). Núcleos lobados já foram observados como consequência da exposição a contaminantes ambientais em diversos estudos com anuros (Lajmanovich et

al., 2014; Pollo et al., 2015; Babini et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2018). Já o estudo de Borges et al. (2019b) detectou aumento na frequência de núcleos reniformes em girinos de *Physalameus cuvieri* coletados em ambiente agrícola em comparação com animais coletados no PNE, o que concorda com nossos resultados. Assim, supõe-se que as AENs podem representar de maneira geral, uma forma das células eliminarem material genético amplificado do seu núcleo (Shimizu et al., 1998; Lajmanovich et al., 2014; Araújo et al., 2019) sendo uma consequência da exposição a contaminantes com atividade citotóxica, genotóxica ou mutagênica (Lajmanovich et al., 2014; Arcaute et al., 2014).

Quando todas as AENs foram somadas, também foi encontrada maior frequência de dano em animais de ambiente agrícola. Entre estas, células binucleadas, assim como os MNs, estão relacionadas à divisão celular (Baršienė et al., 2010; Pollo et al., 2015); o broto nuclear, por sua vez, está relacionado à amplificação ou poliploidização do DNA, removendo o excesso de material genético com posterior formação de MN (Prieto-García et al., 2007; Pollo et al., 2015); as células anucleadas são consideradas uma resposta a situações de estresse como alterações de dieta, patologias e dano metabólico (Lajmanovich et al., 2014). Estas e as demais AENs como núcleo entalhado e núcleo segmentado, além dos núcleos lobado e reniforme, já foram consideradas como indicativo de dano causado por pesticidas em anuros (Lajmanovich et al., 2014; Babini et al., 2016; Mesak et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2018 e 2019). Em estudos *in situ*, estas AENs foram observadas em anuros de áreas urbanas (Pollo et al., 2015); áreas agrícolas de plantação de soja (Pollo et al., 2015; Borges et al., 2019b); áreas de atividade agrícola, silvipastoris e pecuária (Cruz-Esquível et al., 2017); área de mineração (Pollo et al., 2017) entre outras. Desta forma, este estudo constitui mais uma evidência de que o manejo de ambientes agrícolas promove o aumento de AENs.

Análise dos melanomacrófagos hepáticos

Foi detectada uma área reduzida de melanomacrófagos no tecido hepático de *L. fuscus* coletados em área agrícola em comparação aos animais da área controle (PNE). Sabe-se que as principais funções deste tipo celular são a desintoxicação (Fanalli et al., 2018) e funções relacionadas ao sistema imune, além de neutralizar radicais livres protegendo o tecido contra estresse oxidativo (Franco-Belussi et al., 2013). Assim, apesar dos melanomacrófagos serem encontrados em órgãos hematopoiéticos em geral, alguns autores destacam a importância da avaliação dos danos no fígado, por ser o principal local de desintoxicação de grande parte dos xenobióticos e ser um órgão vital para a homeostase metabólica em anuros (Paunescu et al., 2010; Pérez-Iglesias et al., 2019).

Neste sentido, outros estudos já demonstraram os efeitos nocivos de pesticidas através da análise dos melanomacrófagos hepáticos nestes animais (Paetow et al., 2012; Çakici, 2015; Oliveira et al., 2016; Huespe et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2016 e 2019). Além de pesticidas, a ação de outros agentes como o Benzo[a]pireno (Fanalli et al., 2018), a radiação UV (Franco-Belussi et al., 2016), o flúor (Bo et al., 2018) e o cádmio (Wu et al. 2017) já foram avaliadas no fígado de anuros.

Os estudos de Regnault et al. (2014) e Fanalli et al. (2017 e 2018), encontraram uma redução significativa na área de melonamacrófagos de anuros expostos ao Benzo[a]pireno, um hidrocarboneto aromático policíclico considerado um contaminante de alto risco capaz de induzir a formação de MN (Fortin et al., 2015). Esta diminuição da área de melanomacrófagos pode estar relacionada ao estresse hepático e à apoptose de hepatócitos (Regnault et al., 2014). Assim, a exposição a longo prazo a este composto pode fazer com que compostos químicos nocivos se acumulem na melanina (Fanalli et al., 2018), de forma a estimular células que contêm melanina a se degenerarem e causar lesões secundárias nos tecidos circundantes, o que diminui a área de melanomacrófagos (Larsson, 1993; Fanalli et al., 2018). Além disso, Perez-Iglesias et al. (2016) detectaram também a diminuição de outro pigmento presente nos melanomacrófagos, a hemossiderina, em anuros expostos ao Glifosato, atribuindo este fato a uma redução da atividade fagocitária.

Por outro lado, outros estudos com pesticidas encontraram aumento na área pigmentada no fígado de anuros expostos a estes contaminantes (Oliveira et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2016 e 2019). Pérez-Iglesias et al. (2019) atribuem este aumento a uma possível reação inicial à exposição ao xenobiótico como parte do sistema imunológico com a atuação das propriedades fagocíticas dos melanomacrófagos no processo inflamatório. Estes resultados reforçam a função e plasticidade do órgão para ajustes fisiológicos. No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento avaliando efeito de pesticidas nos melanomacrófagos de anuros, principalmente *in situ*, onde há exposição de longo prazo, portanto, são necessárias mais investigações nesta temática para aumentar a compreensão da resposta destas células nestes animais. Além disso, estudos avaliando outros parâmetros do tecido hepático através de testes citoquímicos, como análise de hemossiderina e lipofuscina, e enzimáticos, por exemplo, são encorajados para ampliar a compreensão destes resultados.

3.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou, por meio da análise de biomarcadores e avaliação *in situ*, o efeito de áreas agrícolas em anormalidades nucleares de eritrócitos e melanomacrófagos hepáticos da espécie de anuro *L. fuscus*. Através do teste de micronúcleo e outras alterações eritrocitárias nucleares, foi possível observar aumento de dano genotóxico em animais de áreas agrícolas de plantação de soja em comparação com animais de área preservada. A avaliação de melanomacrófagos hepáticos demonstrou redução de área pigmentada em animais coletados em área agrícola em comparação à área preservada. Desta forma, nota-se que esta espécie é uma bioindicadora de qualidade ambiental por ser sensível a mudanças no habitat. A análise de micronúcleos, anormalidades eritrocitárias nucleares e melanomacrófagos hepáticos se mostrou uma ferramenta eficaz para uma avaliação mais abrangente dos danos em anuros e estudos futuros utilizando esta abordagem são encorajados.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. *Journal of Zoology*, 191: 11-31.
- Araújo, A.P.C., Mesak, C., Montalvão, M.F., Freitas, I.N., Chagas, T.Q., Malafaia, G. 2019. Anti-cancer drugs in aquatic environment can cause cancer: Insight about mutagenicity in tadpoles. *Science of the Total Environment*, 650: 2284–2293.
- Arcaute, C.R., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2014. 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*, 45: 632-639.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (An-ura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118: 118–125.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 459.
- Baršienė, J., Bjornstad, A., Rybakovas, A., Šyvokienė, J., Andreikėnaitė, L. 2010. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels and fish inhabiting northern Atlantic zones impacted by aluminum industry. *Ekologija*, 56: 116–123.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E.A.S., Assis, R.A., Santos, C.G.A., Borges, R.E., Silva, D.M., Santos, L.R.S. 2020. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240: 124910.
- Bernabò, I., Guardia, A., Macirella, R., Sesti, S., Crescente, A., Brunelli, E. 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172:56–66.

- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., Kats, L.B. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of co-factors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 123: 108–119.
- Bo, X., Mu, D., Wu, M., Xiao, H., Wang, H. 2018. The morphological changes and molecular biomarker responses in the liver of fluoride-exposed *Bufo gargarizans* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151: 199–205.
- Böll, S., Schmidt, B., Veith, M., Wagner, N., Rödder, D., Weinmann, C., Kirschey, T., Loetters, S. 2013. Amphibians as indicators of changes in aquatic and terrestrial ecosystems following GM crop cultivation: a monitoring guideline. *BioRisk*, 8: 39-51.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Assis, R.A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., Oliveira, C. 2019a. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 2623–2634.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R.S., Assis, R.A., Oliveira, C. 2019b. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 22-28.
- Bosch, B., Mañas, F., Nora, G., Aiassa, D. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3: 155-163.
- Burlibaşa, A.L., Gavrilă, A.L. 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9: 1-15.
- Çakici, 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67: 237–243.
- Cañedo, A.M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.J. 2013. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environmental Pollution*, 173: 157–167.
- Caraffa, E., Bionda, C., Pollo, F., Salas, N., Martino, A. 2013. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicologica Argentina*, 21: 78–84.
- Carvalho, W.F., Arcaute, C.R., Pérez-Iglesias, J.M., Laborde, M.R.R., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2019. DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28: 367–377.
- Castro, B.B., Guilhermino, L., Ribeiro, R. 2003. In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, 125: 325–335.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions [agnors] as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538: 81–91.
- Cruz-Esquivel, A., Vilorio-Rivas, J., Marrugo-Negrete, J. 2017. 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*, 24: 27392–27401.
- Collins, J.P. 2010. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 93-99.

- Dellamatrice, P.M., Monteiro, R.T.R. 2014. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18: 1296-1301.
- Dias, L.C.P., Pimenta, F.M., Santos, A.B., Costa, M.H., Ladle, R.J. 2016. Patterns of land use, extensification, and intensification of Brazilian agriculture. *Global Change Biology*, 22: 2887–2903.
- Dores, E.F.G.C., Freire, E.M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Química Nova*, 24: 27-36.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Fanali, L.Z., de Lacerda Valverde, B.S., Franco-Belussi, L., Provete, D.B., de Oliveira, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo [a] pyrene. *Amphibia-Reptilia*, 38: 175-185.
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R., Oliveira, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237: 93-102.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 455: 81–95.
- Ficetola, G.F., Maiorano, L. 2016. Contrasting effects of temperature and precipitation change on amphibian phenology, abundance and performance. *Oecologia*, 6: 457–463.
- Fishelson, L. 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, 267: 57-69.
- Fortin, F., Bonvalot, Y., Pham, T.C.V., Ouellet, N., Ayotte, P., Viau, C., Lemieux, N. 2015. Biomarkers of genotoxicity measured in human lymphocytes exposed to benzo [a]pyrene: aneugenic effect, and involvement multiple primary DNA lesions. *Integrative Pharmacology Toxicology and Genotoxicology*, 1: 21-32.
- Franco-Belussi, L., Castrucci, A.M.D.L., Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7-a-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology*, 116: 316-324.
- Franco-Belussi, L., Skold, H.N., Oliveira, C. 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *Journal of Experimental Biology*, 219: 1378-1383.
- Franco-Belussi, L., Fanali, L.Z., Oliveira, C. 2018. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 180: 109–117.
- Frost, D.R. 2019. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.0 (July 2019). Electronic Database Accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garaj-Vrhovac, V., Gajski, G., Ravlić, S. 2008. Efficacy of HUMN criteria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41: 473–476.
- García, G.C., Fontúrbel, F.R., (Eds). 2003. *Propuestas para un desarrollo sostenible: Lago Titikaka por estrategias K*. Editorial Publicaciones Integrales. La Paz, pp. 105.
- Gatica, E.A., Almeida, C.A., Mallea, M.A., Corigliano, C.M., González, P. 2012. Water quality assessment, by statistical analysis, on rural and urban areas of Chocancharava River (RíoCuarto), Córdoba, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184: 7257–7274.

- Green, F.B., East, A.G., Salice, C.J. 2019. Will temperature increases associated with climate change potentiate toxicity of environmentally relevant concentrations of chloride on larval green frogs (*Lithobates clamitans*)? *Science of the Total Environment*, 682: 282-290.
- Hoffman, D., Rattner, B., Burton, J.R.G., Cairns, J.R.J. 2003. *Handbook of ecotoxicology*, 2nd edn. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, Jr.J (eds). 2010. *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press, London, New York, Washington.
- Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., Curi, L.M., Peltzer, P., Attademo, M.A., Villafane, N., Lajmanovich, R. 2016. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima glutatión s-transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta Biológica Colombiana*, 22: 234-237.
- IBGE. Produção agrícola – Lavoura temporária. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/rioverde/pesquisa/14/10193?tipo=ranking&indicador=10368>> Acesso em: 12 de Julho de 2019.
- ICMBio. Parque Nacional das Emas. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/204-parque-nacional-das-emas>> Acesso em: 12 de Julho de 2019.
- IMB. Análises conjunturiais - Balança comercial – COMEX. Disponível em: <<http://www.imb.gov.br/files/docs/releases/comex/2019/comex201905.pdf>> Acesso em: 12 de Julho de 2019.
- Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodels walt* to detect mutagens in fresh-water. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 164: 245–257.
- Köhler, H.R., Triebkorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341: 759-765.
- Kuivila, K.M., Hladik, M.L. 2008. Understanding the occurrence and transport of current-use pesticides in the San Francisco Estuary, Watershed. *Estuary & Watershed*, 6: 2-19.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research*, 769: 7–12.
- Larsson, B.S. 1993. Interaction between chemicals and melanin. *Pigmented Cell and Melanoma Research*, 6: 127-133.
- Mesak, C., Mendes, B.O., Ferreira, R.O., Malafaia, G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 15235–15244.
- Oliveira, C.R., Fraceto, L.F., Rizzi, G.M., Salla, R.F., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M. 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 149: 304-313.
- Paetow, L.J., McLaughlin, D., Cue, R.I., Pauli, B.D., Marcogliese, D.J. 2012. Effects of herbicides and the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on the health of post-metamorphic northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 372–380.

- Paunescu, A., Ponepal, C.M., Drghici, O., Marinescu, A.G. 2010. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana (Pelophylax) ridibunda* induce by the action of reldan 40EC insecticide. *Analele Universităţii din Oradea - Fascicula Biologie*, 17: 166-169.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F., Corriero, A. 2014. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases*, 37: 241-250.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., Oliveira, C., Natale, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 9852–9861.
- Pérez-Iglesias, J.M., Natale, G.S., Solonesi, S., Larramendy, M.L. 2018. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 1–10.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C. 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution*, 244: 733-746.
- Pignati, W.A., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C. 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, 22: 3281-3293.
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 581.
- Pollo, F.E., Grenat, P.R., Salinas, Z.A., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 18179–18187.
- Prieto García, F., Baez Ramirez, O. A., Scout, W., Gaytán Oyarzún, J. C., & Zúñiga Estrada, A. 2007. Toxicidad y teratogénesis por arsénico en el pez cebra [*Danio rerio*]. *Revista de Toxicología*, 24: 18–22.
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., Lippe, C. 2009. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One*, 4: e7699.
- Regnault, C., Worms, I.A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.L., Reynaud, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genomics*, 15: 666.
- Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C. 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anatomical Records*, 297: 864-875.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140: 1307–1320.
- Silva-Souza, T., Fontanetti, C. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605: 87–93.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783–1786.

- Sugai, J.L.M.M., Terra, J.S., Ferreira, V.L. 2012. Diet of *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) in the Pantanal of Miranda river, Brazil. *Biota Neotropica*, 12.
- Udroiu, I., Sgura, A., Vignoli, L., Bologna, M.A., D'Amen, M., Salvi, D., Ruzza, A., Antoccia, A., Tanzarella, C. 2015. Micronucleus test on *Triturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 56: 412–417.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S., Briggs, C.J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 9689–9694.
- Wu, C., Zhang, Y., Chai, L., Wang, H. 2017. Histological changes, lipid metabolism and oxidative stress in the liver of *Bufo gargarizans* exposed to cadmium concentrations. *Chemosphere*, 179: 337-346.
- Wynn, A., Heyer, W.R. 2001. Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae). *Tropical Zoology*, 14: 255-285.
- Zuasti, A., Jara, J.R., Ferre, C., Solano, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2: 93-99.

4. CAPÍTULO II

**EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO A
ÁREAS AGRÍCOLAS SOBRE ANUROS: HÁ MUDANÇAS APÓS CESSAR A
EXPOSIÇÃO?**

Efeitos genotóxicos e histopatológicos da exposição a áreas agrícolas sobre anuros: há mudanças após cessar a exposição?

RESUMO

Anuros que habitam ambientes agrícolas estão sujeitos a danos genotóxicos e histopatológicos causados pela contaminação dos habitats dos quais estes animais dependem para sua sobrevivência. O teste de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs), bem como, a análise de melanomacrófagos hepáticos, são ferramentas que auxiliam na investigação destes danos. Porém, pouco se sabe sobre a possibilidade de diminuição dos danos causados por contaminantes de origem agrícola em anuros caso a exposição a estes produtos cesse. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar se o manejo de áreas agrícolas causa danos em anuros da espécie *Physalaemus nattereri* e se os danos são minimizados em animais afastados da exposição. Vinte indivíduos adultos coletados em área de plantio de soja (n=10) e de cana-de-açúcar (n=10) foram eutanasiados logo após a coleta para a realização das análises sanguíneas e hepáticas. Outros vinte indivíduos coletados nestes mesmos ambientes (n=10 em plantio de soja e n=10 em plantio de cana-de-açúcar) foram mantidos em laboratório e, portanto, livres de contaminação, por trinta dias. Animais expostos a ambientes agrícolas foram comparados àqueles que permaneceram por trinta dias em laboratório longe da exposição. O teste de MN e outras AENs demonstrou que animais expostos apresentaram maiores taxas de dano quando comparados aos indivíduos afastados da exposição para ambas as áreas avaliadas. A análise da pigmentação hepática apontou menor área ocupada pelos melanomacrófagos em animais expostos também para ambas as áreas. Assim, este estudo traz informações inéditas sobre a capacidade de diminuição de danos causados em anuros em ambiente natural, ou seja, condições onde pode haver a interação de diversos contaminantes, contribuindo para diminuição das lacunas de conhecimento sobre o real estado de saúde de animais que habitam ambientes imersos em matrizes agrícolas.

Palavras-chave: Anfíbios, Capacidade de recuperação, Contaminantes agrícolas, Genotoxicidade, Histopatologia hepática.

Genotoxic and histopathological effects of exposure to agricultural areas on anurans: Are there changes after exposure ceases?

ABSTRACT

Anurans that inhabit agricultural environments are subject to genotoxic and histopathological damage caused by contamination of the habitats on which these animals depend for their survival. The micronucleus (MN) test and other erythrocyte nuclear abnormalities (ENAs), as well as the analysis of hepatic melanomacrophages, are tools that assist in the investigation of these damages. However, little is known about the possibility of reducing the damage caused by contaminants of agricultural origin in anurans if exposure to these products ceases. In this sense, this study aimed to assess whether the management of agricultural areas causes damage to anurans of the species *Physalaemus nattereri* and whether the damage is minimized in animals away from exposure. Twenty adult individuals collected in a soybean (n = 10) and sugar cane (n = 10) plantation area were euthanized shortly after collection for blood and liver analysis. Another twenty individuals collected in these same environments (n = 10 in planting soybeans and n = 10 in planting sugarcane) were kept in the laboratory and, therefore, free of contamination, for thirty days. Animals exposed to agricultural environments were compared to those that remained in the laboratory for 30 days away from exposure. The MN and other ENAs test showed that exposed animals had higher damage rates when compared to individuals removed from exposure for both evaluated areas. The analysis of liver pigmentation showed a smaller area occupied by melanomacrophages in animals also exposed to both areas. Thus, this study provides unprecedented information on the ability to reduce the damage caused to anurans in a natural environment, that is, conditions where there may be the interaction of various contaminants, contributing to reduce the knowledge gaps about the real health status of animals that inhabit environments immersed in agricultural matrices.

Key Words: Agricultural contaminants, Amphibians, Genotoxicity, Liver histopathology, Recovery capabilities.

4.1 INTRODUÇÃO

A intensificação dos agroecossistemas tem levado à preocupação acerca da sustentabilidade a longo prazo e das consequências ambientais (Datta et al., 2018). A agricultura é a atividade humana que ocupa a maior parte do planeta (Devine e Furlong, 2007; Babini et al., 2015) cobrindo cerca de 38% da superfície terrestre (Ramankutty et al., 2008; Babini et al., 2016). Uma consequência desta atividade é o uso extensivo, em escala global, de pesticidas, resultando na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos em todo o mundo (Smiley et al., 2014; Silva et al., 2019). Os pesticidas atingem corpos d'água através de aplicação direta não intencional, deriva e escoamento, e representam um risco potencial para espécies não-alvo que habitam estes ambientes (Wagner et al., 2014; Bernabò et al., 2016). Os efeitos subletais dos pesticidas sobre estas espécies podem ocorrer em níveis genéticos, bioquímicos e fisiológicos, de forma semelhante ao que ocorre nos organismos-alvo (Köhler; Triebkorn, 2013; Perez-Iglesias et al., 2019).

Nas últimas décadas, o uso de biomarcadores em avaliações de risco apresentado por substâncias tóxicas tem aumentado (Pollo et al., 2015). O teste de micronúcleo (MN) e outras anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) é considerado uma das técnicas mais rápidas e sensíveis para avaliar danos genéticos (González et al., 2019). Este teste já foi aplicado em outros estudos, demonstrando que pesticidas podem induzir a formação de MN em diversos grupos animais, entre eles anfíbios (Cabagna et al., 2006; Arcaute et al., 2014; Mesak et al., 2018) e peixes (Alvim e Martinez, 2019; Gonzalez et al., 2019), que estão suscetíveis à contaminação em habitats aquáticos.

Os micronúcleos são originados de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que são incapazes de se envolver com o fuso mitótico (Fenech et al., 2016; González et al., 2019). Os fragmentos atrasados ou cromossomos inteiros são envolvidos por uma membrana se tornando MN (Fenech et al., 2016). Além do MN, outras AENs também são consideradas indicativo de dano, tais como, célula binucleada, broto nuclear, célula anucleada, núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo reniforme e núcleo segmentado (Pollo et al., 2015; Cruz-Esquivel et al., 2017; Gregório et al., 2019; Borges et al., 2019).

Outros biomarcadores utilizados em estudos de monitoramento ambiental por serem responsivos à ação de xenobióticos, são os melanomacrófagos (Franco-Belussi et al., 2013; Santos et al., 2014; Franco-Belussi et al., 2016; Franco-Belussi; Oliveira, 2016;

Fanali et al., 2018; Dang et al., 2019). Os melanomacrófagos são células presentes no fígado e outros órgãos hematopoiéticos de anfíbios, peixes e répteis e têm função de destruição, desintoxicação e reciclagem de materiais endógenos e exógenos (Franco-Belussi et al., 2013; Passantino et al., 2014; Curi et al., 2019). Estas células produzem e armazenam a melanina, pigmento que absorve e neutraliza radicais livres e outras substâncias tóxicas derivadas do metabolismo celular (Agius; Roberts, 2003; Franco-Belussi et al., 2013; Pérez-Iglesias et al., 2016). A exposição a pesticidas pode alterar a área de melanomacrófagos como demonstrado por estudos com anfíbios (Pérez-Iglesias et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2018) e peixes (Lutnicka et al., 2018). A análise conjunta de melanomacrófagos e micronúcleos já foi utilizada em alguns estudos (Pérez-Iglesias et al., 2016; Abo-Al-Ela et al., 2017; Fanali et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2019) demonstrando a eficiência destes dois biomarcadores.

Neste contexto, considerando que em áreas agrícolas, além da presença de pesticidas, outros estressores podem atuar (Bionda et al., 2013; Babini et al., 2015), os biomarcadores citados anteriormente podem auxiliar em análises do estado de saúde dos organismos que habitam estes ambientes. Entre estes organismos, os anfíbios são bioindicadores adequados, uma vez que são animais que estão expostos a ambientes aquáticos e terrestres e que possuem alta sensibilidade cutânea, o que facilita a absorção de xenobióticos (Cruz-Esquivel et al., 2017).

Além disso, as populações destes animais estão em declínio em todo o mundo, e uma das possíveis causas desse fenômeno é a exposição aos pesticidas, uma vez que a acumulação destes produtos em ambientes aquáticos pode prejudicar a saúde destes animais (Pérez-Iglesias et al., 2018). Desta forma, o número de estudos ecotoxicológicos com anfíbios tem crescido rapidamente (Burlibaşa; Gavrilă, 2011). Entretanto, apesar do conhecimento crescente sobre os efeitos da exposição a contaminantes de origem agrícola, pouco se sabe sobre a possibilidade de reversão destes efeitos após o fim da exposição (Guilherme et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2018).

Este estudo objetivou investigar se pode haver mudanças quanto aos efeitos do manejo de áreas agrícolas em parâmetros sanguíneos e hepáticos de anfíbios caso a exposição a estes agentes estressores cesse. A espécie *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) foi utilizada como bioindicadora e o teste de MN e outras AENs, bem como a análise de melanomacrófagos hepáticos foram utilizadas como ferramentas para avaliação de danos tanto em animais expostos a pesticidas em áreas agrícolas quanto em animais retirados destas áreas e mantidos em ambiente livre de contaminação.

Assume-se que animais *in situ* estão expostos a xenobióticos que favorecem a maior frequência de dano genotóxico e hepático. Por outro lado, aqueles animais retirados das pressões da agricultura são capazes de se recuperar, expressando menor frequência de danos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das áreas de estudo e organismo modelo

Para a realização deste estudo, os animais foram coletados em região do Cerrado brasileiro em dois ambientes agrícolas diferentes. Um destes ambientes, foi uma área de plantação de soja no município de Rio Verde, sudoeste do estado de Goiás (S17°47.742'W051°06.089'). No país, a soja é a cultura que mais utiliza pesticidas, utilizando cerca de 17,7 litros/hectare (Pignati et al., 2017). O município de Rio Verde ocupa o nono lugar no ranking nacional do consumo de pesticidas e sua paisagem é dominada por plantações de soja (Pignati et al., 2017; Borges et al., 2019). Estes fatores justificam a escolha desta área para avaliação da genotoxicidade. O outro ambiente amostrado foi uma área de plantio de cana-de-açúcar, no município de Paraúna, estado de Goiás (S17°16.639'W050°29.971). As áreas destinadas ao cultivo da cana-de-açúcar têm crescido nessa região (Silva et al., 2019). Esta cultura também utiliza grande quantidade de pesticidas, além de gerar resíduos poluidores (Correia et al., 2017). Assim, os organismos que habitam esta área também estão suscetíveis à contaminação.

Os animais utilizados foram anuros da espécie nativa *Physalaemus nattereri*. Esta espécie é caracterizada pela presença de glândulas inguinais ovais com ocelos escuros (Provete et al., 2011), sendo encontrada em diferentes habitats, incluindo áreas de pastagem e intensa agricultura (Freitas et al., 2017). Assim, vinte (n=20) indivíduos adultos desta espécie foram coletados em cada ambiente através de busca ativa. O período de coleta foi de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em ambos os ambientes por se tratar da estação chuvosa da região onde a espécie está em seu período reprodutivo e, portanto, os machos estão em atividade de vocalização (Kopp et al., 2010). As licenças para coleta e cuidado quanto ao uso dos espécimes foram emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o nº 62687-1 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano (CEUA/IFGoiano), n. 6643030518.

Processamento dos espécimes

Após a coleta dos espécimes, os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, onde foram realizadas as análises. Do total de vinte indivíduos coletados em cada ambiente (plantação de soja e

de cana-de-açúcar), dez foram eutanasiados por imersão em anestésico (Benzocaína a 5g/L) para a realização do teste de MN e outras AENs bem como para a análise de melanomacrófagos (Fanali et al., 2018). Outros dez indivíduos de cada ambiente foram separados em terrários, sendo cinco terrários com dois indivíduos cada, totalizando dez terrários. Os terrários foram construídos utilizando terra obtida de ambiente livre de poluição e umidificada com água limpa, também foram colocados galhos e folhas secas (Lenzi-Mattos et al., 2005) para simular ambiente mais próximo ao natural. Os animais foram mantidos em laboratório em temperatura ambiente e à luz do dia (12h claro: 12h escuro) (Franco-Belussi et al., 2016) e cada animal foi alimentado com larvas do inseto *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) (Lenzi-Mattos et al., 2005). Para verificar se há diferenças nos parâmetros estudados em relação aos animais coletados em ambiente de cultivos agrícolas, os animais foram mantidos no laboratório por trinta dias, sendo eutanasiados logo após esse período. O período de trinta dias foi selecionado para garantir o tempo necessário para que os animais se aclimassem e o estresse da mudança de ambiente não interferisse nos resultados. Os animais coletados em ambiente de plantio de soja, que foram eutanasiados logo após a coleta foram considerados grupo “Soja/exposição”. Já os animais coletados neste ambiente e mantidos por trinta dias em laboratório, em ambiente livre de contaminantes, foram considerados grupo “Soja/laboratório”. Aqueles coletados na área de plantio de cana-de-açúcar e eutanasiados em seguida foram considerados grupo “Cana-de-açúcar/exposição”. Por fim, os animais que foram coletados em área de cana-de-açúcar e mantidos em laboratório pelo mesmo período foram considerados grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”.

Análises sanguíneas

Logo após a eutanásia, os indivíduos foram pesados em balança analítica de precisão e foi medido o comprimento rostro-cloacal com auxílio de paquímetro digital, em seguida, uma amostra de sangue foi obtida com auxílio de agulha heparinizada e seringa (25 mm x 0.7 mm) e depositada sobre lâminas limpas. Foram confeccionadas duas lâminas por animal, as quais foram fixadas com metanol gelado e coradas com solução de Giemsa a 5% (Babini et al., 2016; Perez-Iglesias et al., 2016). Para cada animal, foi feita a análise de 2000 células em microscópio óptico (Laborana LAB-1001TB) com câmera digital acoplada (Laborana 3.0Mp) com aumento de 100 x (Cruz-Esquivel et al., 2017).

Para identificar os MNs, os seguintes critérios foram adotados de acordo com Fenech (2000), Babini et al. (2016) e Pollo et al. (2017): (a) intensidade de coloração

semelhante à do núcleo principal, mas diâmetro menor, (b) formato redondo, com membrana nuclear e sem conexão com o núcleo principal e (c) não ser sobreposto ao núcleo principal e deve estar localizado dentro do citoplasma. Para o teste de outras AENs, foram consideradas células binucleadas (BN), broto nuclear (BR), células anucleadas (AN), núcleo lobado (LB), núcleo entalhado (EN), núcleo reniforme (RE) e núcleo segmentado (SEG) de acordo com Souza e Fontanetti (2006), Pollo et al. (2015) e Borges et al. (2019).

Análises hepáticas

Fragments do fígado dos animais foram retirados, pesados em balança analítica de precisão, logo após foram fixados em metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético), hidratados em água destilada e em seguida desidratados em série alcoólica. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em historesina (kit de inclusão Leica-historesina), seccionados a 2µm com auxílio de um micrótomo (RM 2265, Leica, Switzerland) e depositados sobre lâminas limpas (2 por animal). Em seguida, os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e levados ao microscópio (Leica DM4 B) com aumento de 20x onde foram fotografados 25 campos histológicos aleatórios por animal através de sistema de captura de imagens (Leica DMC 4500). As fotos foram analisadas no programa Image Pro-Plus Media-Cybernetics Inc. (versão 6.0) para medição da área pigmentada. Estes métodos estão de acordo com Santos et al. (2014), Franco-Belussi et al. (2016) e Fanalli et al. (2018).

Análises de água

Amostras de água foram coletadas em ambas as áreas de obtenção dos animais (área de plantação de soja em Rio Verde e área de plantação de cana-de-açúcar em Paraúna) para análises físico-químicas. As amostras foram armazenadas em frascos específicos a uma temperatura de <4°C e enviadas ao laboratório para a avaliação da presença de pesticidas carbamatos, organoclorados e organofosforados. Os seguintes parâmetros foram testados: 2, 4-D + 2, 4, 5-T; Alaclor; Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfoxi; Aldrin + Dieldrin; Atrazina; Carbendazim + Benomil; Carbofuran; Clordano (Cis + Trans); Clorpirifos + Clorpirifos Oxon; Ddt; Diuron; Endossulfan (Alfa + Beta + Sulfato); Endrin; Glifosato + Ampa; Lindano; Mancozebe; Metamidofos; Metolacloro; Molinato; Metil Paration; Pendimetalina; Permetrina; Profenofos; Simazina; Tebuconazol; Terbufos e Trifluralina. As análises foram feitas de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23ª edição, e os parâmetros avaliados foram baseados na resolução nº 357

do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 17 de março de 2005. Além disso, parâmetros como temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, resistividade, salinidade e sólidos totais dissolvidos foram medidos *in situ* no momento da coleta das amostras de água no período da tarde usando equipamento medidor multiparâmetro portátil (Bante900P).

Análises estatísticas

Os dados de MN, AENs e melanomacrófagos são apresentados como média±desvio padrão. Foram realizadas comparações entre animais coletados nos dois ambientes amostrados (soja e cana-de-açúcar) e eutanasiados logo em seguida (Grupos soja/exposição e cana-de-açúcar exposição). Também foram feitas comparações entre animais do grupo “Soja/exposição” e aqueles animais coletados na soja e mantidos em laboratório por trinta dias (Grupo Soja/laboratório). Esse mesmo tipo de análise também foi feita para os animais coletados em cana-de-açúcar (Grupo Cana-de-açúcar/exposição e grupo Cana-de-açúcar/laboratório). Foram comparadas as frequências de MN, AENs e melanomacrófagos em todos os casos. As frequências de AENs foram avaliadas para cada uma individualmente e para a soma de todas elas conforme abordagem padrão (Pollo et al., 2015; Borges et al., 2019). Para todas as análises, a homogeneidade das variâncias foi testada através do teste de Levene, sendo utilizado o teste *T de Student* para dados paramétricos e o teste *U de Mann Whitney* para dados não-paramétricos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todas as análises de acordo com Zar (1999).

4.3 RESULTADOS

Análise sanguínea: Micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares

O teste de MN e outras AENs detectou a presença de células com: micronúcleo (MN), binucleadas (BN), com broto nuclear (BR), anucleadas (AN), com núcleo lobado (LB), núcleo entalhado (EN), núcleo reniforme (RE) e núcleo segmentado (SEG) nos eritrócitos dos animais (Figura 1). Nenhum parâmetro avaliado por estes testes, apresentou diferença significativa quando animais coletados em área de soja foram comparados a animais coletados na área de cana-de-açúcar, ambos sem passar pelo período livre de exposição, com exceção dos núcleos lobados, os quais ocorreram com mais frequência em área de cana-de-açúcar ($t = -3,002$; $p < 0,05$).

Quando animais “Soja/exposição” foram comparados a “Soja/laboratório” (aqueles que permaneceram por 30 dias em laboratório, sem exposição a agentes xenobióticos), verificou-se diferença quanto à frequência de MN ($t = 2,72$; $p < 0,05$; Figura

2; Tabela 1), BR ($t= 2,526$; $p<0,05$; Tabela 1), EN ($t= 2.387$; $p<0,05$; Tabela 1) e SEG ($t= 2,130$; $p< 0,05$; Tabela 1), com frequência menor de dano em animais que passaram pelo período livre de exposição (Soja/laboratório) para todos estes parâmetros.

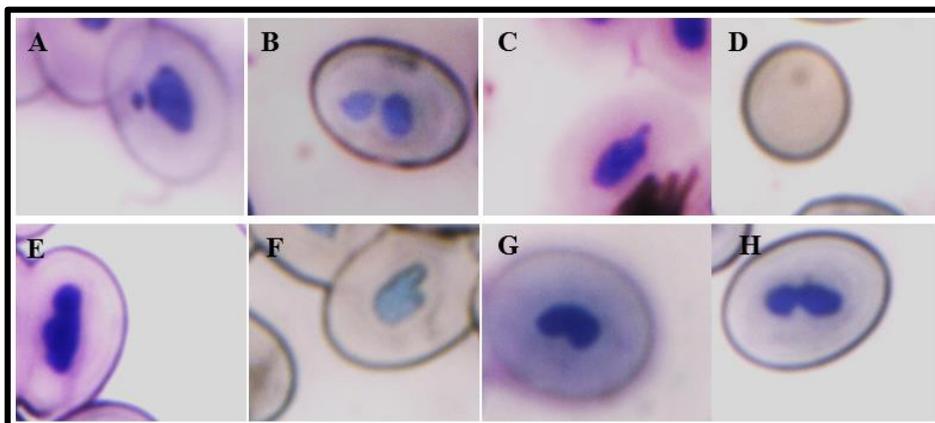


Figura 1. Eritrócitos de *Physalaemus nattereri* (aumento de 100x). A: micronúcleo, B: célula binucleada, C: broto nuclear, D: célula anucleada, E: núcleo lobado, F: núcleo entalhado, G: núcleo reniforme, H: núcleo segmentado.

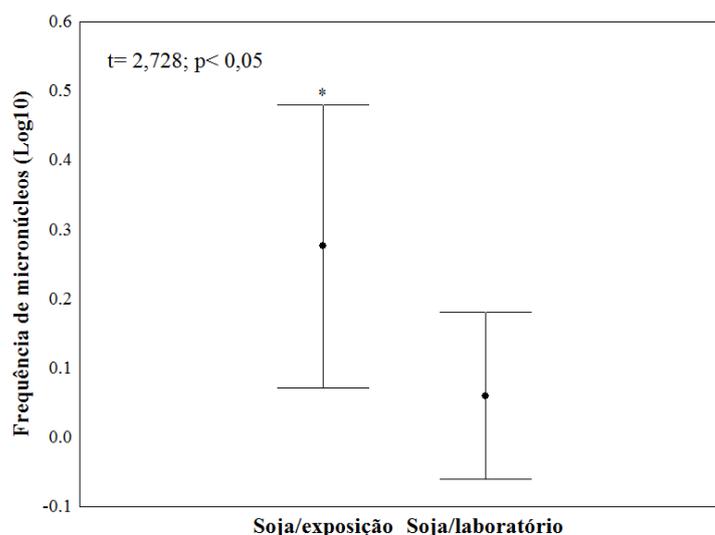


Figura 2. Frequência de micronúcleo nos animais coletados na área de plantação de soja e eutanasiados logo após a coleta (Soja/exposição) e nos animais mantidos em laboratório por 30 dias (Soja/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco representa diferença significativa de acordo com o teste *T de Student*.

Tabela 1. Média de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de *Physalaemus nattereri* coletados em área de plantação de soja e eutanasiados em seguida (Soja/exposição) e em animais mantidos em laboratório (Soja/laboratório).

MN e AENs	Soja/exposição (n10)	Soja/laboratório (n10)
	Média±SD	Média±SD
Micronúcleo	0,27±0,21*	0,06±0,12
Célula binucleada	0,15±0,20	0,09±0,14
Broto nuclear	9,50±6,24*	3,60±3,94

Célula anucleada	0,40±0,69	0,90±1,10
Núcleo lobado	6,00±8,48	7,70±11,36
Núcleo entalhado	29,20±17,14*	12,00±15,00
Núcleo reniforme	10,60±5,87	10,70±7,73
Núcleo segmentado	4,20±3,45*	1,60±1,71

Valores de média±SD (desvio padrão); *p<0,05, diferença significativa de acordo com o teste *T de Student* e teste *U de Mann-Whitney*.

Quando a comparação foi realizada entre animais coletados na cana-de-açúcar, os resultados também demonstram maior dano em animais expostos quando comparados aos animais que passaram pelo período livre de exposição. Para esse grupo foi encontrada diferença significativa para MN (U= 25,000; p<0,05; Figura 3), BR (t=3,789; p<0,05; Tabela 2), LB (U= 5,000; p<0,05; Tabela 2), EN (t= 2,971, p<0,05; Tabela 2), RE (t= 4,937, p< 0,05; Tabela 2) e para a soma de todas as AENs (t= 4,789, p<0,05; Figura 4).

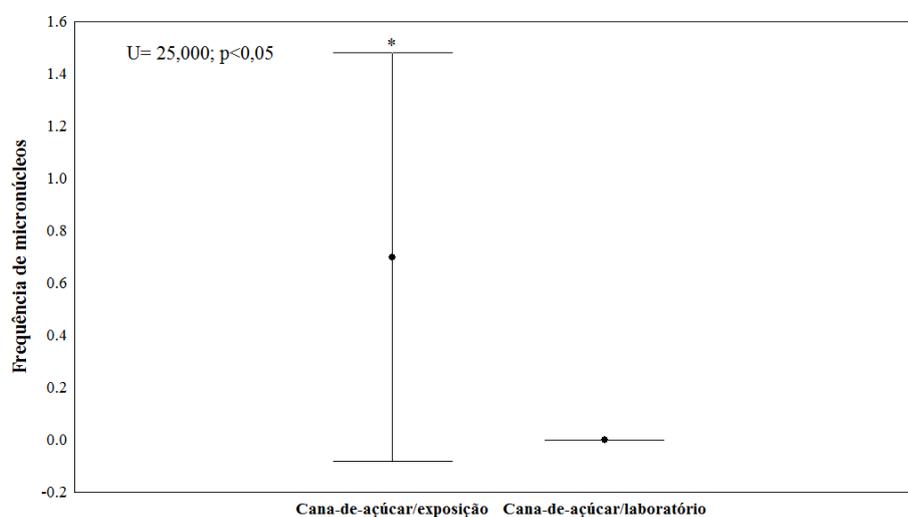


Figura 3. Frequência de micronúcleos dos animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição” e dos animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.

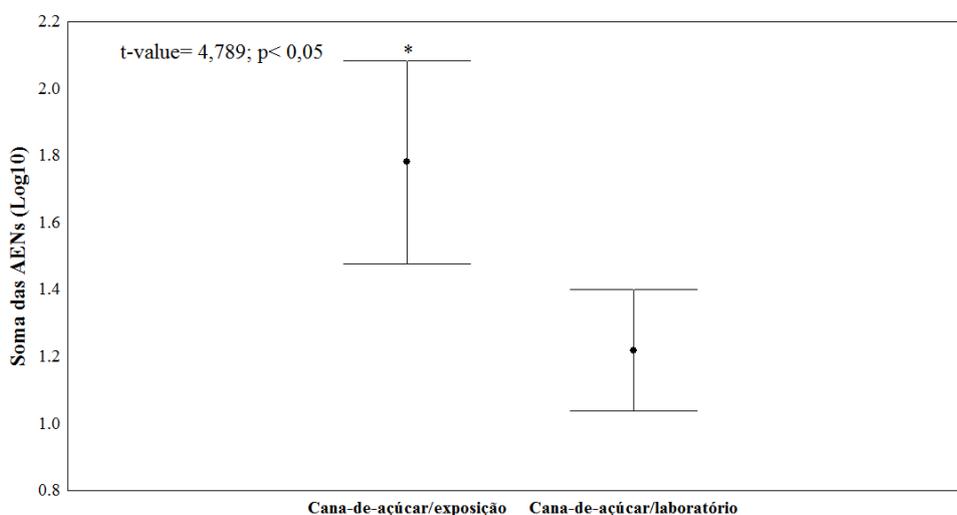


Figura 4. Frequência de todas as anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs) avaliadas nos animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição” e nos animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão

(barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *T de Student*.

Tabela 2. Média de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs) (2000 células/animal) em eritrócitos de *Physalaemus nattereri* coletados em área de plantação de cana-de-açúcar e eutanasiados em seguida (Cana-de-açúcar/exposição) e em animais mantidos em laboratório (Cana-de-açúcar/laboratório).

MN e AENs	Cana-de-açúcar/exposição (n10)	Cana-de-açúcar/laboratório (n10)
	Média±SD	Média±SD
Micronúcleo	0,70±0,82*	0,00±0,00
Célula binucleada	0,60±0,84	0,30±0,67
Broto nuclear	0,99±0,29*	0,49±0,29
Célula anucleada	0,60±0,84	0,10±0,31
Núcleo lobado	19,20±13,77*	2,30±1,41
Núcleo entalhado	1,25±0,43*	0,78±0,25
Núcleo reniforme	1,12±0,28*	0,52±0,25
Núcleo segmentado	3,60±3,59	2,70±1,94

Valores de média±SD (desvio padrão); *p<0,05, diferença significativa de acordo com o *T de Student* e teste *U de Mann-Whitney*.

Análise hepática: os melanomacrófagos

A análise da área ocupada por melanomacrófagos indicou diferença significativa entre animais coletados na cana-de-açúcar e animais coletados na soja, ambos eutanasiados logo após a coleta ($U=7999,000$; $p<0,05$), havendo maior área ocupada em animais oriundos da área de plantio da cana-de-açúcar. Também houve diferença significativa entre a área de melanomacrófagos em animais expostos à área de soja (Soja/exposição) e animais que ficaram trinta dias livres da exposição (Soja/laboratório) ($U=8760,000$; $p<0,05$; Figuras 5 e 6; Tabela 3).

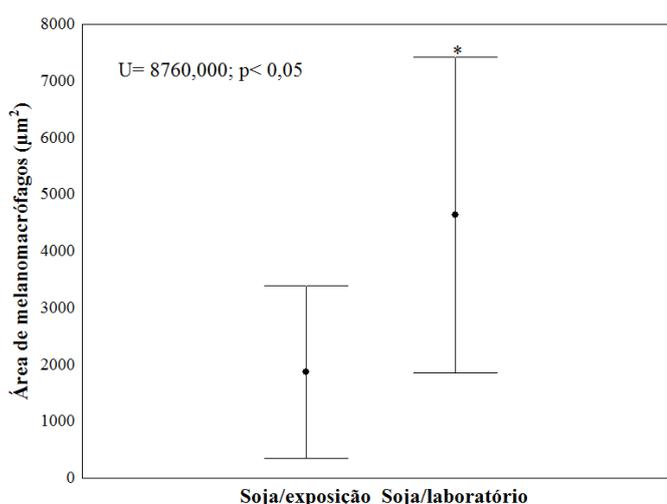


Figura 5. Área de melanomacrófagos hepáticos em *Physalaemus nattereri* coletados na soja. Comparação entre animais expostos (Soja/exposição) e animais que foram retirados da exposição (Soja/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.

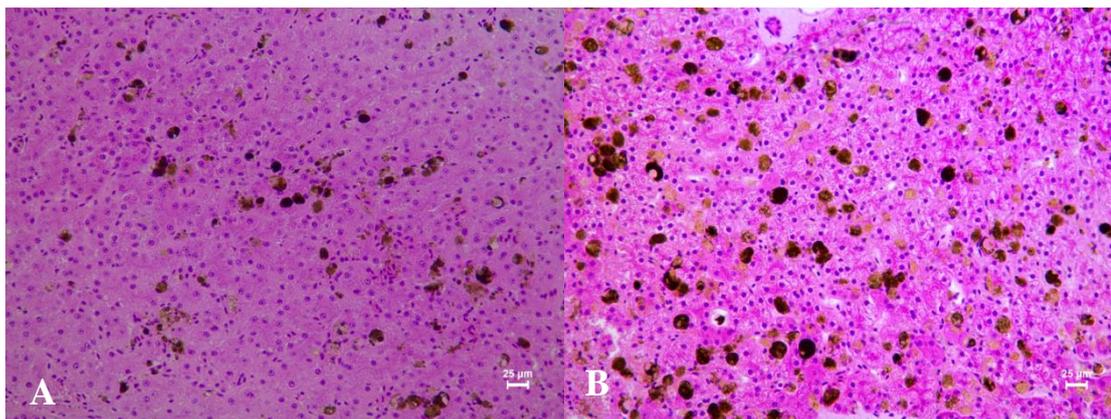


Figura 6. Fotomicrografia do tecido hepático de *Physalaemus nattereri* mostrando a área ocupada pelos melanomacrófagos. A: Animais do grupo “Soja/exposição”; B: Animais do grupo “Soja/laboratório”. É possível observar maior área pigmentada nos animais que passaram pelo período livre de exposição. As barras indicam 25 μm .

Quanto a animais coletados em área de cana-de-açúcar, também houve diferença significativa na área ocupada por melanomacrófagos quando comparados os animais expostos (Cana-de-açúcar/exposição) aos animais que passaram 30 dias sem exposição, ou seja, os mantidos em laboratório (Cana-de-açúcar/laboratório) ($U=24885,50$; $p<0,05$; Figura 7; Tabela 3). A área ocupada por melanomacrófagos também foi maior em animais após o período de recuperação (Figuras 7 e 8; Tabela 3).

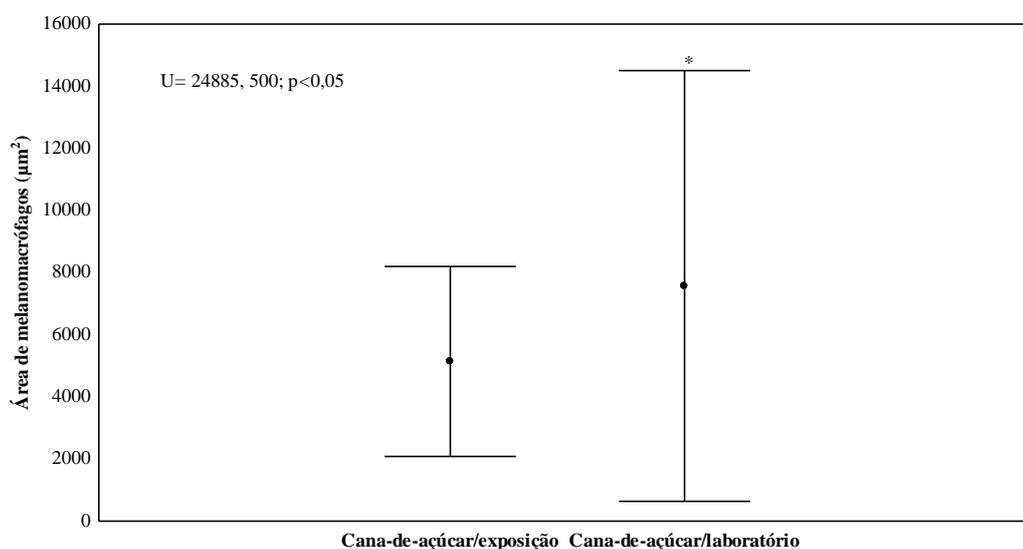


Figura 7. Área de melanomacrófagos hepáticos em *Physalaemus nattereri* coletados na plantação de cana-de-açúcar. Comparação entre animais que não passaram pelo período livre de exposição (Cana-de-açúcar/exposição) e animais que passaram pelo período livre de exposição por 30 dias em laboratório (Cana-de-açúcar/laboratório). Os dados são apresentados como média (círculos) e desvio padrão (barras verticais). O asterisco indica diferença significativa acordo com o teste *U de Mann-Whitney*.

Quanto às análises de água, nenhum dos pesticidas avaliados apresentou valores acima do limite de quantificação de acordo com o método cromatográfico utilizado (Tabela 4). Os dados amostrados *in situ* são apresentados na tabela 5.

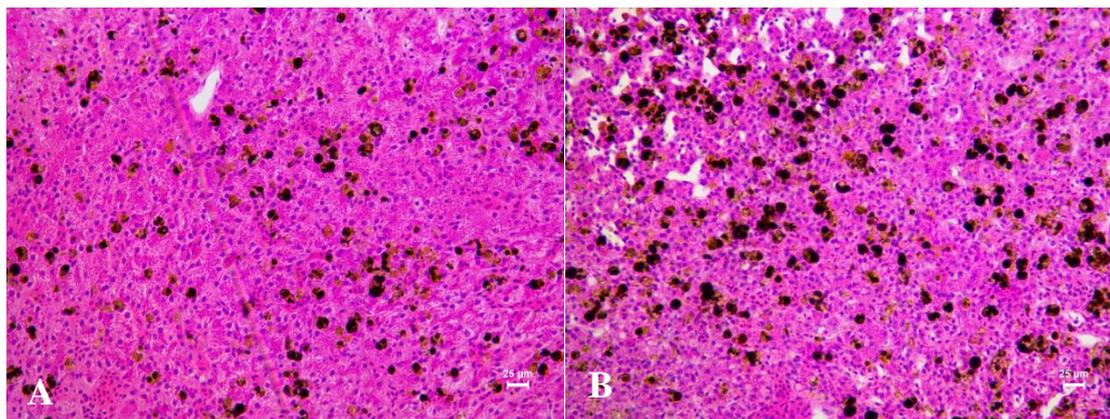


Figura 8. Fotomicrografia do tecido hepático de *Physalaemus nattereri* mostrando a área ocupada pelos melanomacrófagos. A: Animais do grupo “Cana-de-açúcar/exposição”; B: Animais do grupo “Cana-de-açúcar/laboratório”. É possível observar maior área pigmentada nos animais que passaram pelo período livre de exposição. As barras indicam 25 μ m.

Tabela 3. Média da área ocupada pelos melanomacrófagos (25 campos histológicos/animal) no tecido hepático de *Physalaemus nattereri* coletados em área de plantações agrícolas e eutanasiados em seguida (Soja/exposição e Cana-de-açúcar/exposição) e em animais mantidos em laboratório por 30 dias (Soja/laboratório e Cana-de-açúcar/laboratório).

Grupo	Área de melanomacrófagos (n10) Média \pm SD
Soja/exposição	1875,98 \pm 1604,45
Soja/laboratório	4637,24 \pm 2931,19*
Cana-de-açúcar/exposição	5141,17 \pm 3218,92
Cana-de-açúcar/laboratório	7572,24 \pm 7298,02*

Valores de média \pm SD (desvio padrão). Asterisco indica diferença estatística quando comparados grupos expostos com os grupos do mesmo ambiente, porém, que passaram por 30 dias sem exposição.

Tabela 4. Concentração dos contaminantes carbamatos, organoclorados e organofosforados nas plantações de soja e de cana-de-açúcar.

Parâmetros	Resultados (μ g/L)		LQ	VMP
	Plantação de soja	Plantação de cana-de-açúcar		
2 Clorofenol	<0,05	<0,05	0,05	0,1
2,4 Diclorofenol	<0,05	<0,05	0,05	0,3
Pentaclorofenol	<0,1	<0,1	0,1	0,009
Glifosato	<55	<55	55	65
Aldrin + Dieldrin	<0,02	<0,02	0,02	NR
Heptacloro epóxido+	<0,005	<0,005	0,005	0,01
Heptacloro				
2,4 D	<0,15	<0,15	0,15	4
2,4,5 T	<1,0	<1,0	1	2
2,4,5 TP	<1,0	<1,0	1	NR
Alaclor	<0,1	<0,1	0,1	NR
Atrazina	<1,0	<1,0	1	NR
Carbaril	<0,01	<0,01	0,01	0,02

Clordano (cis + trans)	<0,02	<0,02	0,02	0,04
Demeton	<0,02	<0,02	0,02	0,1
Dodecacloropentaciclodecano (Mirex)	<0,001	<0,001	0,001	NR
Endossulfan (a+b+sulfato)	<0,03	<0,03	0,03	0,056
Endrin	<0,001	<0,001	0,001	0,004
Gama-BHC (Lindano)	<0,01	<0,01	0,01	0,02
Gution	<0,004	<0,004	0,004	0,005
Hexaclorobenzeno	<0,001	<0,001	0,001	0,0065
Malation	<0,05	<0,05	0,05	0,1
Metolacloro	<0,1	<0,1	0,1	10
Metoxicloro	<0,001	<0,001	0,002	0,03
o,p-DDD+o,p-DDE+o,p-DDT	<0,003	<0,003	0,003	0,002
o,p-DDT	<0,001	<0,001	0,001	0,002
Paration	<0,01	<0,01	0,01	0,04
Simazina	<0,1	<0,1	0,1	2
Toxafeno	<0,01	<0,01	0,01	0,01
Trifluralina	<0,05	<0,05	0,05	0,2
1,1 Dicloroeteno	<0,10	<0,10	0,1	0,003
1,2 Dicloroetano	<0,45	<0,45	0,45	0,01
Tetracloroeteno	<0,31	<0,31	0,31	0,01
Triclorobenzeno (1,2,3+1,2,4+1,3,5)	<0,43	<0,43	0,43	0,02
Tricloroeteno	<2,00	<2,00	2	NR

PNE: Parque Nacional das Emas; LQ: Limite de Quantificação; VMP: Valor Máximo Permitido de acordo com a resolução nº 357 do CONAMA de 17 de março de 2005; NR: Não há recomendação.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água avaliados *in situ* nos ambientes de coleta dos espécimes de *Physalaemus nattereri*.

Parâmetros	Soja	Cana-de-açúcar
Temperatura da água	35,7°C	28,9°C
pH	5,38	7,74
Condutividade	2,56µS	52,30µS
Sólidos totais dissolvidos	1279ppm	26,00ppm
Salinidade	1,31psu	0,03psu
Resistividade	398	19,20
Oxigênio dissolvido	76,10%	90,5%

4.4 DISCUSSÃO

Análise sanguínea: Micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares

Este estudo avaliou pela primeira vez a possibilidade de recuperação de anuros a danos genotóxicos e histopatológicos causados por áreas agrícolas caso a exposição a essas áreas cesse. Os resultados acerca do teste de MN e outras AENs mostraram que houve maior dano genotóxico em animais expostos a áreas agrícolas em comparação a animais que ficaram livres da exposição a estas mesmas áreas. Dessa forma, fica evidente

que o manejo de áreas com cultivos agrícolas, como soja e cana-de-açúcar, pode promover dano genético para organismos não-alvos.

Apesar de não terem sido detectados altos níveis de pesticidas nas amostras de água que foram avaliadas, sabe-se que em áreas agrícolas de soja, misturas de pesticidas com diversos ingredientes ativos são comumente aplicadas por duas ou três vezes, no mínimo, em cada ciclo de cultivo (González et al., 2019). Além disso, por ser um estudo *in situ*, a interação de outras variáveis que podem ser encontradas em ambiente de plantação de soja deve ser considerada. Já em áreas de cana-de-açúcar, a eutrofização, devido a altos níveis de fósforo e nitrogênio pode diminuir drasticamente os níveis de oxigênio dissolvido (Macleod; Haygarth, 2003; Smith; Schindler, 2009) prejudicando anfíbios e outros organismos aeróbicos que dependem de ambientes aquáticos (Babini et al., 2015). Outros Parâmetros da água, como o pH e a temperatura influenciam os níveis de toxicidade dos poluentes (Hoffman et al., 2010; Pollo et al., 2017) e podem levar a estresse fisiológico em organismos aquáticos caso não estejam dentro dos limites ótimos para estes organismos (Addy et al., 2004). É importante ressaltar que o valor de pH encontrado na área de soja (5,38) está fora da faixa segura para anfíbios, a qual vai de 6,3 a 7,7 (García; Fontúrbel, 2003).

Além disso, parâmetros como salinidade, condutividade, sólidos totais dissolvidos e níveis de sulfato também podem afetar anfíbios em nível genotóxico (Pollo et al., 2017). Outros estudos que avaliaram a saúde de anfíbios também detectaram dano oriundo do estresse causado por estes fatores, bem como pela presença de pesticidas em áreas de plantação de soja em diversos lugares do mundo (Peltzer et al., 2008; Brodeur et al., 2012; Peltzer et al., 2013; Borges et al., 2019).

Em áreas de cultivo de cana-de-açúcar, apesar do consumo de pesticidas ser menor quando comparado ao das áreas de soja (Pignati et al., 2017), são encontrados outros resíduos potencialmente tóxicos oriundos do processo de transformação da cana-de-açúcar em etanol nas usinas. Entre estes resíduos estão a vinhaça, a torta de filtro, cinzas, bagaços, gás de combustão, efluentes de lavagens de tanques, entre outros, os quais possuem alta quantidade de elementos tóxicos como cádmio, níquel, zinco, ferro e chumbo (Rebelato et al., 2019). A vinhaça, por exemplo, pode contaminar habitats aquáticos, causar danos no DNA (Correia et al., 2017) e promover alterações histopatológicas (Marinho et al., 2014) em peixes.

Desta forma, a alta frequência de micronúcleo, broto nuclear, núcleo entalhado, núcleo lobado, núcleo reniforme e núcleo segmentado, encontrada nos indivíduos de

ambientes agrícolas, é um indicativo dos danos que os poluentes podem causar em anfíbios, uma vez que estas células já foram observadas como consequência à exposição de anuros a diversos contaminantes (Lajmanovich et al., 2014; Pollo et al., 2015; Babini et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2018). Quanto aos micronúcleos, sua presença é um indicativo da ocorrência de alterações cromossômicas estruturais ou numéricas surgidas na mitose (Fenech et al., 2011; Pollo et al., 2017). Desta forma, o teste de micronúcleo é considerado altamente sensível para detectar alterações iniciais causadas por xenobióticos, sendo usado em ensaios ecotoxicológicos e como instrumento de biomonitoramento para detectar impactos de poluentes na biota (Mesak et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que anuros apresentam aumento de células micronucleadas em resposta a poluentes como herbicidas (Lajmanovich et al., 2014; Mesak et al., 2018) e inseticidas (Arcaute et al., 2014) além da exposição *in situ* a áreas agrícolas (Babini et al., 2015; Babini et al., 2016; Cruz-Esquivel et al., 2017; Borges et al., 2019).

Assim, o fato de haver menor dano em animais que ficaram trinta dias longe das áreas agrícolas demonstra a plasticidade fisiológica desses organismos com relação à capacidade de recuperação/reversão de um dano genotóxico promovido por contaminantes ambientais. Outros autores que também avaliaram danos genéticos induzidos por contaminantes ambientais em vertebrados e invertebrados demonstraram a recuperação dos organismos, atribuindo esta característica à ação de enzimas de reparo do DNA através da excisão de base ou de nucleotídeo (Michel; Vincent-Hubert, 2015; Mouchet et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2018). Mouchet et al. (2015) em estudo com a espécie de anuro *Xenopus laevis* em fase larval exposta a cádmio e zinco detectaram indução de MNs e metalotioneínas por estes metais, bem como, a capacidade de recuperação da espécie a partir de 7 dias livres da exposição. Estes autores argumentam que os sistemas de reparo do DNA desta espécie são rápidos e eficientes e que os efeitos tóxicos do cádmio e do zinco são, portanto, reversíveis. Esta mesma espécie já foi avaliada em outro estudo (Morse et al., 1996), em girinos expostos ao Benzo[a]pireno, os quais apresentaram danos ao DNA após 24 horas de exposição e a capacidade de reparo do DNA foi constatada em apenas 24 horas após cessar a exposição.

Ainda com relação à capacidade de recuperação, Pérez-Iglesias et al. (2018), avaliaram larvas de *Boana pulchella*, expostas a um herbicida. Após 96 horas de exposição, foi constatado aumento de MN, outras AENs e quebras de DNA diagnosticadas pelo ensaio cometa. Os girinos mantidos livres da exposição apresentaram

níveis basais de MNs, AENs e parâmetros do ensaio cometa após 7 dias, indicando que danos causados por pesticidas em anuros podem ser reversíveis. Estudo com peixes realizado por Marques et al. (2014) constatou que um herbicida causou danos no DNA na espécie *Anguilla anguilla* e que estes danos foram reparados em 24 horas após cessar a exposição. Os autores atribuíram esta resposta a uma capacidade adaptativa dos peixes que permite evitar danos neogerados no período pós-exposição ao contaminante, assim como evitar danos induzidos no período de exposição. Guilherme et al. (2014) ao avaliarem a capacidade de recuperação de peixes (*A. anguilla*) também à exposição a herbicidas constataram que os animais expostos a um herbicida que tem como ingrediente ativo o Ácido Triclopyr não foram capazes de se recuperar totalmente, enquanto aqueles expostos a um herbicida à base de Glifosato alcançaram recuperação completa do DNA após 14 dias livres da exposição. Mohanty et al. (2011) avaliaram alevinos de *Labeo rohita* expostos a diferentes concentrações de um pesticida organofosforado por 24, 48, 72 e 96 horas e depois mantidos livres do contaminante por 0, 3, 6, 12 e 24 horas. Foi constatada redução na quebra de DNA a partir das 3 horas em água livre do pesticida e às 24 horas os danos retornaram ao nível encontrado no controle.

Apesar da recuperação rápida das espécies estudadas por estes autores, é reconhecido que o tempo para recuperar um nível basal de dano genético é variável dependendo da espécie (Pérez-Iglesias et al., 2018). Em anfíbios, um período de até 14 dias é relatado (Mouchet et al., 2015), no entanto, ainda não existem informações sobre a capacidade de recuperação da maioria das espécies, principalmente em indivíduos adultos. Além disso, em condições naturais os animais estão expostos a muitos estressores por um período muito maior de tempo que o avaliado por estudos experimentais (Pérez-Iglesias et al., 2018), o que pode influenciar na capacidade de reversibilidade dos danos. Assim, este estudo é a primeira evidência de que um período de 30 dias pode ser suficiente para a ação dos mecanismos de reparo do DNA da espécie *P. nattereri* após exposição a estressores agrícolas em condição natural.

Análise hepática: os melanomacrófagos

Quanto à avaliação hepática realizada neste estudo por meio da análise de melanomacrófagos, foi constatado que a pigmentação hepática foi maior em animais que passaram pelo período de recuperação (30 dias livres da exposição) em ambas as áreas agrícolas, bem como, foi maior na área de cana-de-açúcar em comparação com a área de soja. A função imune dos melanomacrófagos é bastante discutida na literatura (Agius, 1985; Agius; Roberts, 2003; Fenoglio et al., 2005; Franco-Belussi et al., 2013; Franco-

Belussi et al., 2016a; Steinel; Bolnick, 2017; Pérez-Iglesias et al., 2019), bem como, sua função de desintoxicação (Passantino et al., 2014; Fanalli et al., 2018; Sayed et al., 2018). A melanina armazenada nestas células tem função protetora capaz de eliminar radicais livres e neutralizar cátions, protegendo os tecidos contra danos citotóxicos (Barni et al., 1999; Curi et al., 2019). Além disso, o fígado é um dos principais órgãos afetados pela exposição a poluentes, uma vez que sua função está relacionada ao metabolismo, desintoxicação e excreção de substâncias tóxicas (Curi et al., 2019).

Desta forma, diversas respostas dos melanomacrófagos hepáticos à exposição a diferentes poluentes têm sido relatadas na literatura, demonstrando a complexidade do mecanismo de ação deste biomarcador. Loumbourdis e Vogiatzis (2002) detectaram aumento destas células dependente do tempo de exposição ao cádmio em anfíbios adultos da espécie *Rana ridibunda*. Os autores relacionaram este resultado a uma possível depressão do sistema imunológico causada pelo contaminante que levou a uma infecção por parasitas, fazendo com que o organismo produzisse melanomacrófagos como uma linha de defesa. O cádmio também aumentou a área de melanomacrófagos em girinos de *Bufo gargarizans* (Wu et al., 2017). Esta espécie também foi avaliada quanto à exposição ao flúor, onde foi detectado aumento na área de melanomacrófagos nos girinos expostos por 72 h (Bo et al., 2018). Em outro estudo, desta vez com a espécie *Rana catesbeiana*, exposta a aflatoxinas na dieta, Grassi et al. (2007) não encontraram alteração significativa na área de melanomacrófagos hepáticos, demonstrando que este contaminante não exerceu influência sobre estas células no tempo de exposição. O fármaco flutamida, por sua vez, causou aumento na área de melanomacrófagos em adultos de *Rhinella schneideri* expostos a 1 mg/kg do produto (Gregorio et al., 2016).

Quanto a pesticidas, Paetow et al. (2012) não detectaram alterações na área de melanomacrófagos em *Lithobates pipiens* expostas a herbicidas à base de Atrazina e Glifosato e ao patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis* ao mesmo tempo. Neste estudo, a sobrevivência, os índices esplenossomáticos e hepatossomáticos, a densidade e tamanho dos granulomas hepáticos e a proporção de leucócitos circulantes também não sofreram alterações. Os autores relacionaram estes resultados à resistência da espécie à infecção pelo fungo, que não foi afetada pela exposição aos contaminantes. Já Çakici et al. (2015) detectaram aumento no número de melanomacrófagos em *Bufo variabilis* exposta a um inseticida. Resultados semelhantes foram detectados por Oliveira et al. (2016) em estudo com girinos da espécie *Rana catesbeiana* expostos a um herbicida por 96 horas. Huespe et al. (2016) em estudo com a espécie *Leptodactylus chaquensis*

coletada em ambiente agrícola após a aplicação de inseticida, detectaram aumento na área de melanomacrófagos hepáticos em animais deste ambiente em comparação com animais coletados em ambiente livre de contaminação. Pérez-Iglesias et al. (2019) detectaram que um herbicida à base de Atrazina induz aumento na área de melanomacrófagos em girinos de *Rhinella schneideri*. Este aumento na área de melanomacrófagos em resposta à exposição a pesticidas tem sido relacionado a uma reação inicial a esta exposição que é parte do sistema de defesa, com a posterior atuação das células no processo inflamatório, devido a suas propriedades fagocíticas (Pérez-Iglesias et al., 2019).

Por outro lado, alguns estudos detectaram diminuição da área de melanomacrófagos em anuros expostos a contaminantes. Entre eles, Rohr et al. (2008) em estudo *in situ* com a espécie de anuro *Rana pipiens*, detectaram que a Atrazina e o fosfato encontrados na água causaram redução da área de melanomacrófagos. No mesmo estudo, um experimento com a espécie *Rana palustris* identificou que animais expostos à Atrazina apresentaram redução significativa de melanomacrófagos em comparação com animais do grupo controle. Os autores correlacionaram este resultado com o aumento de infecções por trematódeos detectado neste mesmo estudo, demonstrando que a Atrazina atuou suprimindo a resposta imunitária exercida pelos melanomacrófagos nestas espécies. Estudos com o contaminante Benzo[a]pireno detectaram que este contaminante também é capaz de induzir redução na área de melanomacrófagos em anuros (Regnault et al., 2014; Fanali et al., 2017; Fanali et al., 2018). Algumas explicações sobre essa resposta foram discutidas nestes estudos, entre elas, a hipótese de que esta diminuição ocorra devido ao estresse metabólico, apoptose e autofagia (Regnault et al., 2014). Além disso, a exposição a longo prazo também pode causar acumulação de altos níveis de produtos químicos na melanina, o que estimula a degeneração das células (Larsson, 1993; Fanali et al., 2018). Fanali et al. (2018) discutem também que o Benzo[a]pireno pode ter afetado a síntese de melanina, devido a sua ação como inibidor da atividade da tirosinase (enzima responsável pela regulação da melanogênese).

Assim, neste estudo, a área reduzida de melanomacrófagos em animais coletados em áreas agrícolas pode também ser uma resposta à exposição a contaminantes nestas áreas, demonstrando que, após essa exposição cessar, a atividade dos melanomacrófagos aumenta, como observado nos animais que ficaram livres de exposição. Esta redução da área de melanomacrófagos em animais coletados em áreas agrícolas pode, portanto, ser devida à exposição a longo prazo a compostos químicos que causam degeneração na melanina (Fanali et al., 2018). Assim, os resultados apontados por este biomarcador

concordariam com aqueles do teste de MN e outras AENs apontando que os animais também são capazes de se recuperar de danos no fígado causados por contaminantes presentes nessas áreas. Entretanto, este é o primeiro estudo que utiliza a área de melanomacrófagos para avaliar capacidade de recuperação de anuros, assim, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação destas células.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o manejo de áreas agrícolas de soja e de cana-de-açúcar, é capaz de causar danos genotóxicos e alterações histopatológicas (avaliadas pela ocupação de área dos melanomacrófagos) em anuros da espécie *P. nattereri*. Demonstrou, ainda, que animais que passam por um período de trinta dias livres da exposição a contaminantes de origem agrícola apresentaram resultados significativamente diferentes quanto à frequência de MNs e outras AENs e à área ocupada por melanomacrófagos em comparação com animais que não passaram por este período. Desta forma, a possível capacidade de reversibilidade dos danos causados por práticas agrícolas fica demonstrada nesta espécie, porém, outros estudos podem avaliar diferentes intervalos de tempo, bem como, áreas com diferentes tipos de antropização para uma maior compreensão sobre a capacidade de recuperação dos animais.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Al-Ela, H.G., El-Nahas, A.F., Mahmoud, S., Ibrahim, E. 2017. Vitamin C modulates the immunotoxic effect of 17 alpha-methyltestosterone in Nile tilapia. *Biochemistry*, 56: 2042-2050.
- Addy, K., Green, L., Herron, E. 2004. pH and alkalinity. University of Rhode Island, Kingston.
- Agius, C. 1985. The melano-macrophage centres in fish: are view. In: *Fish Immunology* (ed. by M.J. Manning & M.F. Tatner), pp. 85–105. Academic Press, London.
- Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Biology*, 26: 499–509.
- Alvim, T.T., Martinez, C.B.R. 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842: 85–93.
- Arcaute, C.R., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2014. 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*, 45: 632-639.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit

- agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118: 118–125.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 459.
- Barni, S., Bertone, V., Croce, A. C., Bottirolì, G., Bernini, F., Gerzeli, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19–25.
- Bernabò, I., Guardia, A., Macirella, R., Sesti, S., Crescente, A., Brunelli, E. 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172: 56–66.
- Bionda, C.L., Luque, E., Gari, N., Salas, N.E., Lajmanovich, R.C., Martino, A.L. 2013. Diet of tadpoles of *Physalaemus biligonigerus* (Leiodactylidae) from agricultural ponds in the central region of Argentina. *Acta Herpetologica*, 8: 2.
- Bo, X., Mu, D., Wu, M., Xiao, H., Wang, H. 2018. The morphological changes and molecular biomarker responses in the liver of fluoride-exposed *Bufo gargarizans* larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151: 199-205.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R.S., Assis, R.A., Oliveira, C. 2019. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 22-28.
- Brodeur, J. C., Candiotti, J. V., Soloneski, S., Larramendy, M. L., Ronco, A. E. 2012. Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*, 46: 72-79.
- Burlibaşa, L., Gavrilă, L. 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9: 1-15.
- Cabagna, M.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Ale, E. 2006. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88: 729-737.
- Çakıcı, Ö. 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67: 237-243.
- Correia, J.E., Christofoletti, C.A., Ansoar-Rodríguez, Y., Guedes, T.A., Fontanetti, C.S. 2017. Comet Assay and Micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). *Chemosphere*, 173: 494-501.
- Cruz-Esquivel, A., Vilorio-Rivas, J., Marrugo-Negrete, J. 2017. 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*, 24: 27392–27401.
- Curi, L.M., Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Lajmanovich, R.C. 2019. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water, Air & Soil Pollution*, 230: 22.
- Dang, M., Nowell, C., Nguyen, T., Bach, L., Sonne, C., Nørregaard, R., Stride, M., Nowak, B. 2019. Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus Scorpius*). *Tissue and Cell*, 57: 34–41.

- Datta, S., Singh, J., Singh, S., Singh, S. 2018. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermin compost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28: 171-178.
- Devine, G.J., Furlong, M.J. 2007. Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*, 24: 281–306.
- Fanali, L.Z., de Lacerda Valverde, B.S., Franco-Belussi, L., Provete, D.B., de Oliveira, C. 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo [a] pyrene. *Amphib-Reptil*, 38: 175-185.
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R., Oliveira, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237: 93-102.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 455: 81–95.
- Fenech, M., Kirsch, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26:125–132
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T., Kirsch-Volders, M. 2016. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research*, 770: 12-25.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G., Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 259-268.
- Franco-Belussi, L., Castrucci, A.M.D.L., Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7-a-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology*, 116: 316-324.
- Franco-Belussi, L., Skold, H.N., Oliveira, C. 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *Journal of Experimental Biology*, 219: 1378-1383.
- Franco-Belussi, L., Oliveira, C. 2016. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. *Italian Journal of Zoology*, 83: 298-305.
- Freitas, J.S., Teresa, F.B., Almeida, E.A. 2017. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 197: 32–44.
- García, G.C., Fontúrbel, F.R. (Eds.) 2003. *Propuestas para un desarrollo sostenible: Lago Titikaka por estrategias K*. Editorial Publicaciones Integrales. La Paz.
- Grassi, T.F., Pires, P.W., Barbisan, L.F., Dal Pai-Silva, M., Said, R. A., de Camargo, J.L.V. 2007. Liver lesions produced by aflatoxins in *Rana catesbeiana* (bullfrog). *Ecotoxicology and environmental safety*, 68: 71-78.
- Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., Gomes, F.R. de Oliveira, C. 2016. Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology*, 176: 181-189.
- Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., Oliveira, C. 2019. Genotoxic effects of 4-nonylphenol and Cyproterone Acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. *Environmental Pollution*, 251: 879-884.

- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Pacheco, M. 2014. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? *Aquatic Toxicology*, 155: 213–221.
- González, E.C.L., Siroski, P.A., Poletta, G.L. 2019. Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232: 337-344.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, Jr. G.A., Cairns, Jr. J. (eds). 2010. Handbook of ecotoxicology. CRC Press, London, New York, Washington.
- Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., Curi, L.M., Peltzer, P., Attademo, M.A., Villafane, N., Lajmanovich, R. 2016. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima glutatión s-transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta Biológica Colombiana*, 22: 234-237.
- Köhler, H.R., Triebkorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341: 759-765.
- Kopp, K., Signorelli, L., Bastos, R.P. 2010. Distribuição temporal e diversidade de modos reprodutivos de anfíbios anuros no Parque Nacional das Emas e entorno, estado de Goiás, Brasil. *Iheringia, Série Zoolologia*, 100: 192-200.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research*, 769: 7–12.
- Larsson, B.S. 1993. Interaction between chemicals and melanin. *Pigmented Cell and Melanoma Research*, 6: 127-133.
- Lenzi-Mattos, R., Antoniazzi, M.M., Haddad, C.F.B., Tambourgi, B.V., Rodrigues, M.T., Jared, C. 2005. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behavior. *Journal of Zooology*, 266: 385–394.
- Loumbourdis, N.S., Vogiatzis, A.K. 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 52-58.
- Lutnicka, H., Bojarski, B., Król, T., Trybus, W., Trybus, E., Kopacz-Bednarska, A., Witeska, M., Pankiewicz, L., Pawlak, K. 2018. Hematological Parameters and Ultrastructure of Hematopoietic Tissues in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Exposed to Sublethal Concentration of Pendimethalin. *Folia Biologica (Kraków)*, 66: 121-131.
- Macleod, C., Haygarth, P. 2003. Are view of the significance of non-point source agricultural phosphorus to surface water. *Scope Newslett*, 51: 1–10.
- Marinho, J.F.U., Correia, J.E., Marcato, A.C.C., Pedro-Escher, J., Fontanetti, C.S. 2014. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110: 239-245.
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M. 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods—Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166: 126–133.
- Mesak, C., Mendes, B.O., Ferreira, R.O., Malafaia, G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 15235–15244.

- Michel, C., Vincent-Hubert, F. 2015. DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo (a) pyrene. *Ecotoxicology*, 24: 2009–2016.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A.K., Mohanty, S., Dutta, S.K. 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology*, 20: 283–292.
- Morse, H.R., Jones, N.J., Peltonen, K., Harvey, R.G., Waters, R. 1996. The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo[a]pyrene in developing *Xenopus laevis* larvae. *Mutagenesis*, 11: 101–109.
- Mouchet, F., Teaniniuraitemoana, V., Baudrimont, M., Daffe, G., Gauthier, L., Gonzalez, P. 2015. Recovery capabilities of *Xenopus laevis* after exposure to Cadmium and Zinc. *Chemosphere*, 139: 117–125.
- Oliveira, C.R., Fraceto, L.F., Rizzi, G.M., Salla, R.F., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M. 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 149: 304-313.
- Paetow, L.J., McLaughlin, J.D., Cue, R.I., Pauli, B.D., Marcogliese, D.J. 2012. Effects of herbicides and the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on the health of post-metamorphic northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 372-380.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F., Corriero, A. 2014. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases*, 37: 241-250.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernandez, J.C., Cabagna, M.C., Attademo, A.M., Bassó, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicustadpoles*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 185-197.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenlusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrist, M.E., Beldoménico, H. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 142–151.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., Oliveira, C., Natale, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 9852–9861.
- Pérez-Iglesias, J.M., Natale, G.S., Solonesi, S., Larramendy, M.L. 2018. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 1–10.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C. 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution*, 244: 733-746.
- Pignati, W.A., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C. 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, 22: 3281-3293.
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental

- health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 581.
- Pollo, F.E., Grenat, P.R., Salinas, Z.A., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 18179–18187.
- Provete, D.B., Garey, M.V., Da Silva, F.R., Rossa-Feres, D.D.C. 2011. Anurofauna do noroeste paulista: lista de espécies e chave de identificação para adultos. *Biota Neotropical*, 11: 377-391.
- Ramankutty, N., Evan, A. T., Monfreda, C., Foley, J. A. 2008. Farming the planet: 1, geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles*, 22: 1–19.
- Rebelato, M.G., Rodrigues, A.M., Thomaz, A.G.B., Saran, L.M., Madaleno, L.L., Oliveira, O.J. 2019. Developing an index to assess human toxicity potential of sugarcane industry. *Journal of cleaner production*, 209: 1274-1284.
- Regnault, C., Worms, I.A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.L., Reynaud, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genomics*, 15: 666.
- Rohr, J.R., Schotthoefer, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Schoff, P.K. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455: 1235.
- Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C. 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anatomical Records*, 297: 864-875.
- Sayed, A.E.H., Abd-Elkareem, M., Khalil, N.S.A. 2018. Immunotoxic effects of 4-nonylphenol on *Clarias gariepinus*: cytopathological changes in hepaticmelanomacrophages. *Aquatic Toxicology*, 207: 83-90.
- Silva, K.R., Giongo, P.R., Soares, J.A.B., Giongo, A.M.M., Lunas, D.A.L., Gomes, L.F. 2019. Evolução da área de cana-de-açúcar e indicadores selecionados socioeconômicos em Quirinópolis-GO. *Brazilian Applied Science Review*, 3: 1206-1222.
- Silva, G.S., Matos, L.V., Freitas, J.O.S., Campos, D.F., Val, V.M.F.A. 2019. Gene expression, genotoxicity, and physiological responses in an Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818), exposed to Roundup® and subsequent acute hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 222: 49–58.
- Smiley, P.C., King, K.W., Fausey, N.R. 2014. Annual and seasonal differences in pesticides mixtures within channelized agricultural headwater streams in central Ohio. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 193: 83–95.
- Smith, V.H., Schindler, D.W. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 201-207.
- Souza, T, S., Fontanetti, C. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605: 87–93.
- Steinel, N.C., Bolnick, D.L. 2017. Melanomacrophage Centers As a Histological indicator of immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8: 1-8.
- Wagner, D., Brühl, M., Veith, P.P., Lötters, S. 2014. Evaluating the risk of pesticide exposure for amphibian species listed in Annex II of the European Union Habitats Directive. *Biological Conservation*, 176: 64–70.

- Wu, C., Zhang, Y., Chai, L., Wang, H. 2017. Histological changes, lipid metabolism and oxidative stress in the liver of *Bufo gargarizans* exposed to cadmium concentrations. *Chemosphere*, 179: 337-346.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4^aed. New Jersey, Prentice-Hall. 663p.

5. CONCLUSÃO GERAL

A aplicação dos dois biomarcadores propostos, o teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares e a análise da área de ocupação de melanomacrófagos hepáticos se mostrou eficiente para investigar os efeitos de áreas agrícolas em anuros. Animais de áreas de soja apresentaram maior frequência de dano genotóxico (micronúcleo e anormalidades nucleares) e menor área ocupada por melanomacrófagos que animais de áreas preservadas. Isto indica que há influência dos fatores ambientais sobre a saúde de anuros, onde áreas agrícolas podem impactar parâmetros sanguíneos e hepáticos, principalmente devido à má qualidade da água nestes ambientes. Por outro lado, anuros coletados em áreas de soja e de cana-de-açúcar demonstraram uma possível capacidade de recuperação dos danos causados pelo ambiente agrícola após passarem trinta dias livres da exposição. Assim, fica demonstrada a importância do monitoramento ecotoxicológico de anuros que habitam áreas agrícolas como ferramenta de auxílio à conservação do grupo, em especial, diante das novas evidências da capacidade de diminuição dos danos apresentadas por estes organismos após o fim da exposição a estas áreas, as quais podem ser também investigadas em outras espécies em estudos futuros, além de serem úteis para iniciativas de conservação.