

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO STATUS SANITÁRIO DE *Leptodactylus luctator* (Anura:  
Leptodactylidae) DE VIDA LIVRE EM PLANTAÇÕES DE ARROZ  
CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

**LINA CRESPO BILHALVA**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO STATUS SANITÁRIO DE *Leptodactylus luctator* (Anura:  
Leptodactylidae) DE VIDA LIVRE EM PLANTAÇÕES DE ARROZ  
CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

**Autora: Lina Crespo Bilhalva**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutora em  
Ciências Veterinárias na área de Patologia  
Clínica**

**Orientadora: Stella de Faria Valle**

**Coorientadora: Eliane Dallegrove**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

#### CIP - Catalogação na Publicação

Bilhalva, Lina Crespo  
Avaliação do status sanitário de *Leptodactylus  
luctator* (Anura: Leptodactylidae) de vida livre em  
plantações de arroz convencional e orgânico / Lina  
Crespo Bilhalva. -- 2024.  
94 f.  
Orientador: Stella de Faria Valle.

Coorientador: Eliane Dallegrave.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2024.

1. Herpetologia. 2. Hematologia. 3. Parasitologia.  
4. Patologia Clínica. 5. Toxicologia. I. Valle, Stella  
de Faria, orient. II. Dallegrave, Eliane, coorient.  
III. Título.

Lina Crespo Bilhalva

AVALIAÇÃO DO STATUS SANITÁRIO DE *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae) DE VIDA LIVRE EM PLANTAÇÕES DE ARROZ CONVENCIONAL E ORGÂNICO

Aprovada em 24 ABR 2024

APROVADA POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stella de Faria Valle  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Márcio Borges Martins  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Leonardo Barcellos  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. João Fabio Soares  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Stella, por sempre me incentivar e aceitar minhas propostas de pesquisa nada convencionais.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Eliane, assim como Prof. Josias, Camila e Wendell, que foram muito prestativos ao conduzir comigo as análises cromatográficas na UFCSPA.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Andrea, que foi muito paciente e me orientou durante seis meses durante o doutorado sanduíche, me permitindo realizar todos os testes e análises moleculares no seu laboratório; ainda aproveito para agradecer a todos os amigos e colegas da Universidade de Purdue (Laura, Naíla, Kerstin, Guilherme, Lucas, Camila, Nelly, Ekramy e todos os outros que conviveram comigo neste período) que me ajudaram ativamente durante a elaboração do projeto.

Às gestoras da Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande, Letícia e Cecília, que foram essenciais para a escolha das áreas de coleta e no acordo com os produtores rurais.

Ao Prof. Patrick e toda equipe do Laboratório de Herpetologia da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, que foram excepcionalmente solícitos me ajudando nas coletas a campo.

A todos os amigos não-herpetólogos que também me acompanharam nas coletas a campo (em especial à Laura, que esteve comigo do início ao fim), aguentando tardes, noites e madrugadas em meio à umidade, sujeira, rãs pegajosas e uma quantidade imensurável de mosquitos.

Aos meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS, que sempre me apoiaram, mesmo quando eu precisava bagunçar o laboratório durante as análises.

A todos meus amigos fora do ambiente acadêmico, que entenderam a minha ausência, física e psicológica, durante esse período; deixo aqui um agradecimento especial para a Fernanda, que me ajudou na interpretação dos resultados das análises cromatográficas, e a Carolyne, que sempre me apoiou em diversos âmbitos da vida.

## RESUMO

Anfíbios são animais susceptíveis a declínios populacionais devido a fatores como fragmentação de habitat, mudanças climáticas, doenças infecciosas e contaminantes ambientais. Entre as medidas de conservação propostas por pesquisadores, destaca-se a necessidade mais pesquisas a respeito das doenças emergentes de anfíbios, assim como os contaminantes que podem afetá-los. A exposição aos agrotóxicos pode causar diversas consequências a estes animais, devido ao caráter imunossupressor, teratogênico, genotóxico e por vezes letal destes compostos. Nesse contexto, parasitos sanguíneos, os quais geralmente não causam doenças, podem se proliferar de forma exacerbada em situações de desequilíbrio fisiológico. O objetivo deste trabalho é avaliar diferentes parâmetros relacionados ao status sanitário em anfíbios da espécie *Leptodactylus luctator* coletados em um arrozal orgânico e um convencional. Para melhor caracterização dos ambientes, amostras de água provenientes do dreno das plantações e próximas das regiões de coleta dos anfíbios foram analisadas quanto à presença de agrotóxicos. No total, 39 anuros foram capturados para a coleta de sangue e contagem de ectoparasitos. Sangue total em EDTA-K<sub>2</sub> foi utilizado para a realização de análises hematológicas e moleculares, e o soro para a dosagem de proteínas totais e suas frações. Em esfregaços sanguíneos foram avaliadas a morfologia celular, a presença e quantidade de inclusões parasitárias, parasitos extracelulares e alterações de núcleo eritrocitário. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em variáveis hematológicas e bioquímicas, quantidade de ectoparasitos, quantidade de eritrócitos com inclusões parasitárias, diversidade de hemoparasitos e alterações nucleares. Com base nestes resultados, sugere-se que os indicativos de genotoxicidade e alterações hematológicas, assim como a perda de diversidade e maiores cargas parasitárias, estejam relacionadas à exposição aos agrotóxicos. Este estudo ressalta o impacto negativo de agrotóxicos na população nativa de anfíbios, assim como a importância da implementação de práticas agrícolas sustentáveis e de estudos que ajudem a elucidar essas associações.

**Palavras-chave:** agrotóxicos; anfíbios; hematologia; hemoparasitos; herpetologia.

## **ABSTRACT**

*Amphibians are vulnerable to population declines due to factors such as habitat fragmentation, climate change, infectious diseases, and environmental contaminants. Among the conservation measures suggested by researchers is the need for more research into emerging amphibian diseases and the contaminants that can affect them. Pesticide exposure can have multiple effects on these animals due to the immunosuppressive, teratogenic, genotoxic, and sometimes lethal nature of these compounds. In this context, blood parasites, which generally do not cause disease, may proliferate and be exacerbated in situations of physiological imbalance. This study aimed to evaluate different parameters related to the health status of amphibians of the species *Leptodactylus luctator* collected in an organic and a conventional rice field. In order to better characterize the environment, water samples taken from the drains of the plantations and near the amphibian collection sites were analyzed for the presence of pesticides. A total of 39 anurans were captured for blood sampling and ectoparasite counting. Whole blood in EDTA-K2 was used for hematological and molecular analyses, and serum was used to measure total proteins and their fractions. Blood smears were used to assess cell morphology, presence and number of parasitic inclusions, extracellular parasites, and changes in the erythrocyte nucleus. Statistical differences were found between the groups regarding hematological and biochemical variables, number of ectoparasites, number of erythrocytes with parasitic inclusions, diversity of hemoparasites, and nuclear alterations. Based on these results, it is suggested that the signs of genotoxicity and hematological alterations, as well as the loss of diversity and higher parasite loads, are related to pesticide exposure. This study highlights the negative impact of pesticides on the native amphibian population and the importance of implementing conservation measures.*

**Keywords:** *amphibian; blood parasites; hematology; herpetology; pesticides.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa demonstrando os limites da Área de Proteção Ambiental (APA) do Banhado Grande, assim como os limites das regiões destinadas à produção de arroz orgânico e convencional.....	31
Figura 2 -	Face ventral dos membros inferiores de <i>L. luctator</i> após aplicação intradérmica do pigmento utilizado para a marcação dos indivíduos.....	34
Figura 3 -	Face ventral dos membros inferiores de um <i>L. luctator</i> recapturado, demonstrando a persistência do pigmento utilizado para a marcação dos indivíduos.....	39
Figura 4 -	Face ventral dos membros inferiores de <i>L. luctator</i> com vesículas dérmicas contendo ácaros trombidiformes.....	39
Figura 5 -	Morfologia dos eritrócitos de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 6 -	Morfologia dos granulócitos de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 7 -	Morfologia de monócitos e linfócito de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 8 -	Morfologia dos trombócitos de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 9 -	Protozoários do gênero <i>Trypanosoma</i> observados em amostras de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 10 -	Protozoários do filo Apicomplexa observados em amostras de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 11 -	Bactérias intraeritrocitárias observadas em amostras de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 12 -	Inclusões virais observadas em amostras de <i>L. luctator</i> .....	39
Figura 13 -	Micronúcleo e outras alterações nucleares de eritrócitos de <i>L. luctator</i> .....	39
<b>APÊNDICE B</b>		
Fig. 1.	Morphology of <i>Trypanosoma</i> species in <i>Leptodactylus luctator</i> blood samples.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos analisados em água proveniente de arrozais, organizados de acordo com seu grupo químico.....	32
Tabela 2 - Resultados das análises hematológicas de <i>L. luctator</i> no formato de média ± desvio-padrão (amplitude) coletados no AO (n=6) e AC (n=10).....	39
Tabela 3 - Resultados das análises bioquímicas séricas de <i>L. luctator</i> no formato de média ± desvio-padrão (amplitude) coletados no AO (n=15) e AC (n=10).....	39
Tabela 4 - Prevalência dos agentes infecciosos investigados em <i>L. luctator</i> nas diferentes regiões, de acordo com a metodologia utilizada.....	39
Tabela 5 - Resultados de diferentes metodologias aplicadas para a detecção de tripanossomas em 18 amostras de <i>L. luctator</i> .....	39

### APÊNDICE A

Tabela 1 - Lista de <i>primers</i> empregados no estudo, com os genes alvo e descrição da sequência.....	64
Tabela 2 - Quantidades de reagentes (expressos em µl) utilizados para cada PCR (volume final de 25 µl) realizada no estudo.....	65
Tabela 3 - Condições de temperatura e tempo programadas no termociclador para cada PCR realizada no estudo.....	65

### APÊNDICE B

Table 1. Positive and negative samples for trypanosomes according to the method used for detection.....	66
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ASVCP</b>	<i>American Society for Veterinary Clinical Pathology</i>
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>AN</b>	Anormalidades nucleares
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>CRC</b>	Comprimento rostro-cloacal
<b>EDTA-K<sub>2</sub></b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico
<b>EIP</b>	Eritrócitos com inclusões parasitárias
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FEV</b>	<i>Frog erythrocytic virus</i>
<b>GRRS</b>	<i>Global Ranavirus Reporting System</i>
<b>ICMBio</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<b>IR</b>	Intervalo de referência
<b>LACVet</b>	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>OIE</b>	<i>Office International des Epizooties</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>RAB</b>	Relação albumina:globulinas
<b>RNL</b>	Relação neutrófilos:linfócitos
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>ST</b>	Sólidos totais
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>VG</b>	Volume globular
<b>WOAH</b>	<i>World Organisation for Animal Health</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>A rizicultura no Brasil.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Agricultura orgânica como um contraponto ao emprego de agrotóxicos.....	13
2.1.1.1	<i>Impactos fisiológicos dos agrotóxicos em anfíbios.....</i>	<i>15</i>
<b>2.2</b>	<b>Doenças emergentes como obstáculos à conservação de anfíbios.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Quitridiomicose.....	17
2.2.2	Ranavirose.....	18
<b>2.3</b>	<b>Patologia clínica: ferramenta para a avaliação da saúde de anfíbios.....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Coleta de sangue.....	20
2.3.2	Processamento de amostras para hemograma e citologia sanguínea.....	21
2.3.3	Parasitas e outras inclusões observadas no sangue de anfíbios.....	23
2.3.3.1	<i>Protozoários intracelulares.....</i>	<i>24</i>
2.3.3.2	<i>Protozoários extracelulares.....</i>	<i>25</i>
2.3.3.3	<i>Helmintos.....</i>	<i>26</i>
2.3.3.4	<i>Rickettsias.....</i>	<i>26</i>
2.3.3.5	<i>Inclusões virais.....</i>	<i>27</i>
2.3.4	Bioquímica de proteínas sanguíneas.....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Área de estudo.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise de agrotóxicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta de amostras e identificação dos animais.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises hematológicas e bioquímicas.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Pesquisa direta e quantificação de hemoparasitos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6</b>	<b>Extração de DNA e análises moleculares.....</b>	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
	<b>APÊNDICE A – <i>Primers</i> e condições de PCR.....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE B – Artigo científico.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, são descritas 8.743 espécies na classe Amphibia, em sua maioria pertencentes à ordem Anura, distribuídas por todos os continentes, com exceção da Antártida (Fisher; Garner; Walker, 2009; Frost, 2024). Mais de 40% das espécies de anfíbios são consideradas ameaçadas de extinção, uma proporção maior do que a estimada para todos os outros vertebrados (IUCN, 2023). Declínios populacionais são observados há décadas nessa classe, levando a mais de um terço das suas espécies a passarem por reduções populacionais significativas ou extinção (IUCN, 2023; Silvano; Segalla, 2005; Stuart *et al.*, 2004). Diversos fatores são apontados como responsáveis por isso, como a perda de habitat, doenças infecciosas, mudanças climáticas e presença de contaminantes ambientais, os quais tendem a acentuar com o desequilíbrio ambiental (Luedtke *et al.*, 2023). Embora 1.188 espécies de anfíbios ocorram em território brasileiro, a pouca quantidade de estudos sobre a biologia das espécies nativas e de monitoramento em longo prazo dificulta a compreensão a respeito dos declínios populacionais no país (Segalla *et al.*, 2021; Silvano; Segalla, 2005). Diante disso, na ausência de estudos direcionados, uma das medidas de conservação proposta por pesquisadores é o aumento das pesquisas a respeito das doenças e contaminantes que possam afetar esses animais (Young *et al.*, 2004).

Embora a relação entre parasitos e seus hospedeiros em uma comunidade estável não costume gerar doenças, situações de desequilíbrio podem levar a diferentes níveis de patogenicidade destes agentes (Combes, 1996; Mackenzie, 1999). Enquanto alguns parasitos demonstram elevada sensibilidade às mudanças ambientais, outros aparentam maior resistência do que os próprios hospedeiros (Combes, 1996; Mackenzie, 1999). A atividade agrícola é capaz de desestabilizar a relação parasito-hospedeiro, tanto devido às modificações causadas no ambiente quanto pela liberação de contaminantes como os agrotóxicos (Hopkins; Hoverman, 2024; Koprivnikar; Redfern, 2012). Dessa forma, durante eventos que levem ao desequilíbrio ambiental, como o uso desses compostos químicos, a susceptibilidade à infecção e carga parasitária podem aumentar em anfíbios (Brown; Flynn; Hovermann, 2021; Combes, 1996; Hopkins; Hoverman, 2024; Mackenzie, 1999). Nestas circunstâncias, infecções parasitárias, antes pouco patogênicas, tem o potencial de ocasionar manifestações clínicas e hematológicas nestes animais (Arikan; Cicek, 2014).

Devido à sua elevada permeabilidade cutânea e por habitarem ambientes terrestres e aquáticos, anfíbios podem ser considerados sentinelas quanto à presença de poluentes em um determinado ecossistema (Jantawongsri *et al.*, 2015). Entretanto, a avaliação clínica destes

animais é muitas vezes inviabilizada em virtude da grande variedade de espécies e da ausência de intervalos de referência (IR) estabelecidos para seus parâmetros fisiológicos (Forzán *et al.*, 2017). Dessa forma, é reforçada a importância dos exames laboratoriais para a avaliação sanitária de anfíbios, embora ainda sejam escassas as informações a respeito da hematologia e bioquímica desses animais (Forzán *et al.*, 2017; Forzán; Horney, 2020).

Anuros da família Leptodactylidae Werner, 1986 ocorrem exclusivamente nas Américas, sendo típicos da região neotropical (Frost, 2023; Stuart *et al.*, 2004). Embora comum, é considerada uma das quatro famílias de anfíbios que sofre declínios populacionais de forma mais acelerada (Stuart *et al.*, 2004). O complexo *Leptodactylus latrans* contém quatro espécies amplamente distribuídas pela América do Sul ao leste dos Andes (Magalhães *et al.*, 2020). Entre estas, a espécie *Leptodactylus luctator* possui uma extensa distribuição, sendo a mais abundante no estado do Rio Grande do Sul (RS), localizado no extremo sul do Brasil (Magalhães *et al.*, 2020). Os anfíbios dessa espécie são grandes, de hábitos alimentares generalistas e noturnos, os quais podem ser encontrados próximos aos cursos de águas superficiais em áreas preservadas e antropizadas (Maneyro *et al.*, 2004; Solé *et al.*, 2009), com uma área de vida individual estimada em aproximadamente 2000 m<sup>2</sup> (Henrique, 2016). Em decorrência do seu maior tamanho, da maior disponibilidade de indivíduos e de sua permanência, mesmo em ambientes com maior ação antrópica, a espécie *L. luctator* aparenta elevado potencial como modelo de estudo nas áreas de patologia clínica e toxicologia que utilizem anfíbios de vida livre.

Esta pesquisa buscou, assim, preencher certas lacunas a respeito do impacto dos agrotóxicos na saúde dos anfíbios, com foco na espécie *L. luctator*. Há uma carência de estudos que abordem de forma abrangente e integrada os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde desses animais, especialmente no que diz respeito à hematologia e parasitologia. Pouco se sabe sobre a relação entre a presença de agrotóxicos e flutuações na ocorrência, parasitemia e diversidade de hemoparasitos em anuros. Além disso, a pesquisa sobre doenças infecciosas emergentes de anfíbios no RS é escassa, especialmente em áreas impactadas por compostos utilizados na agricultura. A compreensão dessas interações é fundamental para avaliar o impacto dos agrotóxicos sobre a saúde desses animais e para identificar possíveis consequências negativas para as populações de anfíbios em ecossistemas agrícolas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A rizicultura no Brasil

A gramínea *Oryza sativa*, ou arroz, é considerada um dos cereais de maior produção e consumo no mundo, ao lado do milho e do trigo (Nery; Cella, 2022; Neto, 2015; Wander; Silva; Ferreira, 2021; USDA, 2024). Nos países em que é considerado um item básico alimentar, o aumento no consumo do arroz é observado em conjunto com o crescimento populacional (USDA, 2024). Originário da Ásia, acredita-se que foi introduzido no Brasil pela frota de Pedro Álvares Cabral no período em que ocorria a expansão marítima europeia (Pereira, 2002; Sousa; Ferreira, 2021). Embora apenas no início do século XX tenha sido criada a primeira lavoura empresarial, atualmente o arroz é amplamente cultivado no país (Pereira, 2002; Sousa; Ferreira, 2021; Wander; Silva; Ferreira, 2021).

Na alimentação humana, o arroz pode ser utilizado de diversas formas, como o tradicional consumo do grão polido, branco ou parboilizado, farelo, ou até mesmo na indústria de bebidas e óleos à base deste cereal (Castro *et al.*, 2021). O arroz quebrado, ou arroz de terceira, assim como o farelo, também são empregados para a alimentação animal (Castro *et al.*, 2021). Além destes e muitos outros usos, as indústrias farmacêutica e cosmética são igualmente beneficiadas através do uso do amido e óleo (Castro *et al.*, 2021).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o Brasil ocupa a última posição entre os dez maiores produtores de arroz no mundo, sendo o único desta lista localizado fora do continente asiático (FAO, 2022). No país, mais de 82% da produção deste cereal ocorre na região sul, dentro da qual, 85% é realizada no RS, 13,4% em Santa Catarina (SC) e 1,6% no Paraná (EMBRAPA, 2023). Por este motivo, o sul do Brasil, em especial os estados do RS e SC, são considerados responsáveis por garantir o abastecimento nacional (Castro; Ferreira; Silva, 2022).

O sistema de cultivo de arroz mais utilizado é chamado de irrigado por inundação (Nery; Cella, 2022; Paula, 2008). Neste sistema, tradicionalmente realizado no sul do Brasil, o plantio é realizado em faixas de terra, seguido pela inundação do local utilizando a gravidade (EMBRAPA, 2023; Fernandes *et al.*, 2016; Paula, 2008). Previamente à colheita, a água é drenada do local (Paula, 2008). Outro modelo de cultivo é o chamado de terras altas, ou arroz de sequeiro, comum em propriedades que aplicam a rotação de culturas (Paula, 2008). Nesse tipo de produção os custos são menores, geralmente não são necessárias adaptações – mesmo

em solos de baixa fertilidade - e a irrigação é realizada naturalmente pela chuva (Moraes *et al.*, 2004; Paula, 2008).

Embora sobreviva em diferentes condições, a maior produtividade do arroz tende a ser alcançada quando cultivado dentro de intervalos térmicos adequados em clima quente e em solo úmido (Castro *et al.*, 2021; IRGA, 2018; Nery; Cella, 2022; Paula, 2008). A temperatura ideal varia em cada etapa do desenvolvimento, mas mantém-se geralmente entre 20 °C e 35 °C (IRGA, 2018). Em etapas críticas do desenvolvimento, como a floração, temperaturas abaixo de 15 °C podem induzir a esterilidade da planta (IRGA, 2018). Dessa forma, visto que a fase vegetativa costuma demorar entre 130 e 135 dias, a época de semeadura deve ser realizada evitando extremos de temperatura até o período de colheita (Guimarães; Fageria; Filho, 2002; IRGA, 2018). No estado do RS, o frio é um dos fatores mais importantes para a definição do calendário agrícola do arroz (Steinmetz; Braga, 2001). Com certa variação de acordo com a região do estado, após a determinação por Steinmetz e Braga (2001) dos períodos favoráveis para a semeadura do arroz irrigado no RS, foi observado que para cultivares de ciclo médio essa atividade poderia ser realizada entre 21 de setembro e 20 de novembro e, para cultivares de ciclo precoce, entre 11 de outubro e 10 de dezembro.

Vale destacar que mais de 90% das áreas úmidas nativas do sul do Brasil, como os banhados, já foram invadidas pela rizicultura (Maltchik *et al.*, 2011). Curiosamente, estas regiões destinadas ao plantio de arroz podem auxiliar na preservação de anfíbios na ausência do habitat original, mantendo uma elevada biodiversidade em um mosaico de microhabitats (Machado; Maltchik, 2010; Maltchik *et al.*, 2011; Moreira; Maltchik, 2014). Estes ambientes aparentam ser adequados para várias famílias de anuros durante as diferentes fases da produção agrícola, embora ainda possam ser representadas por uma riqueza de espécies menor do que áreas naturais (Machado; Maltchik, 2010; Moreira; Knauth; Maltchik, 2014; Moreira; Maltchik, 2014). Entretanto, a ação de agrotóxicos nos animais que habitam estes ambientes necessita ser avaliada (Machado; Maltchik, 2010).

### 2.1.1 Agricultura orgânica como um contraponto ao emprego de agrotóxicos

Agrotóxicos são compostos utilizados em áreas agrícolas, visando o controle de organismos danosos e o aumento no rendimento da produção (Quarles, 2015; Van Meter *et al.*, 2019). Estas substâncias podem ser empregadas para o controle de pragas com potencial de interferência nas produções, como microrganismos, ervas daninhas, animais invertebrados e vertebrados (Faria, 2003; Garcês; Pires; Rodrigues, 2019). Desde 2011, o Brasil é considerado

o maior consumidor destes agentes químicos; em um levantamento de 2021, o país utilizou 57% a mais do que o segundo colocado, os Estados Unidos da América (FAO, 2021). Da mesma forma, o registro de novos agrotóxicos e seus componentes no Brasil cresceu vertiginosamente entre 2017 e 2022, com a primeira queda observada em anos após a conclusão do relatório de 2023 (Brasil, 2023).

Visto que “pragas” podem influenciar negativamente na rizicultura (Castro; Ferreira; Silva, 2022), o uso de agrotóxicos é realizado visando maior produtividade e qualidade do produto final (Bosignari, 2020). Artrópodes lepidópteros, hemípteros e coleópteros, assim como moluscos, aves passeriformes e fungos são os principais acusados pela diminuição da produtividade do arroz irrigado (Neto, 2015). A doença mais importante no RS é chamada de Brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea*, o qual é capaz comprometer totalmente a produção (Neto, 2015). O primeiro tratamento com agrotóxicos é realizado com inseticidas e fungicidas diretamente nas sementes, evitando prejuízos durante a germinação da planta (Neto, 2015). Após a irrigação, a aplicação de agrotóxicos passa a ser por via aérea (Neto, 2015), a qual deve seguir normas estritas em relação à distância mínima para a pulverização em regiões próximas a mananciais de água, agrupamentos de animais e moradias humanas (Brasil, 2008; 2021).

Salienta-se que o uso inadequado de agrotóxicos deve ser evitado, visto que pode levar a perdas de produtividade, aumentos nos custos e até mesmo danos ambientais e à saúde dos produtores (IRGA, 2018). Na lavoura, é proibido o uso de diferentes compostos simultaneamente, os quais podem ter ação antagonista ou até mesmo causar fitotoxicidade (IRGA, 2018). Do ponto de vista ambiental, a água utilizada para a irrigação pode atingir mananciais hídricos, afetando o ecossistema (IRGA, 2018). Por estes motivos, sistemas de produção orgânica são uma ótima alternativa para reduzir o impacto, sendo definidos conforme a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003:

Art. 1º Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente. (Brasil, 2003)

Do ponto de vista da agricultura orgânica, o controle de doenças na rizicultura pode ser realizado através do uso de variedades tolerantes e a realização de semeadura na época adequada (Neto, 2015). Da mesma forma, o manejo adequado da lâmina d'água auxilia no

combate a plantas indesejadas, aves e caramujos (Diel *et al.*, 2020). No Brasil, para atestar um produto como orgânico e permitir a sua comercialização, entidades credenciadas devem inspecionar o processo produtivo e conceder o selo de certificação (Zang *et al.*, 2020).

A agricultura orgânica também pode ir além da simples eliminação de agrotóxicos e da mitigação de impactos ambientais; quando aliada aos princípios da agroecologia, também promove transformações nas dinâmicas sociais de produção, incentivando a participação ativa dos agricultores e uma relação mais harmoniosa com o ambiente (Lindner; Medeiros, 2023). Atualmente, o Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra é reconhecido como o principal produtor de arroz orgânico na América Latina, em grande parte devido à produção proveniente do complexo de assentamentos localizados na região metropolitana de Porto Alegre, em especial o Assentamento Filhos de Sepé (Preiss, 2020).

#### *2.1.1.1 Impactos fisiológicos dos agrotóxicos em anfíbios*

Os principais riscos relacionados aos agrotóxicos se devem à sua persistência no ambiente, bioacumulação e toxicidade (Arcaute; Soloneski; Larramendy, 2016). Os anfíbios são suscetíveis a entrar em contato com estes compostos através da pulverização direta ou pelo escoamento em corpos de água (Quarles, 2015), permitindo a exposição destes animais tanto durante a fase larval quanto adulta (Van Meter *et al.*, 2019). A sensibilidade dos anfíbios contra a maior parte das classes de agrotóxicos é elevada, sejam estes utilizados de forma isolada ou em combinações, agindo de forma aguda ou crônica (Quarles, 2015; Van Meter *et al.*, 2019). A exposição simultânea a diferentes classes de agrotóxicos é capaz de causar efeitos até mesmo mais pronunciados, embora dados a respeito da concentração e efeitos tóxicos ainda sejam escassos na literatura (Van Meter *et al.*, 2019). Devido a isso, é importante compreender o potencial que estes agentes químicos possuem em participar de declínios populacionais de anfíbios e, desta forma, utilizar informações provenientes de pesquisas na área como um auxílio na elaboração de medidas de proteção de curto e longo prazo (Van Meter *et al.*, 2019).

A acentuada permeabilidade cutânea dos anfíbios, vital para promoção de trocas gasosas e manutenção do equilíbrio osmótico, é um dos principais responsáveis pela elevada absorção dos agrotóxicos (Pasmans; Martel, 2019; Quarles, 2015). Estudos sugerem que a exposição destes animais aos poluentes ambientais pode predispor à imunossupressão e aumentar a suscetibilidade a diversas enfermidades (Brodkin *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 2003; Linzey *et al.*, 2003).

Os agrotóxicos são considerados estressores, visto que são capazes de estimular a elevação de níveis séricos de glicocorticoides (Brodkin *et al.*, 2007; Gray; Miller; Hoverman, 2009; Van Meter *et al.*, 2019). Nos anfíbios, a corticosterona - o principal glicocorticoide liberado no estresse - é responsável por modular diversas funções relacionadas ao comportamento, reprodução, metabolismo e imunidade destes animais (Moore; Jessop, 2003). Ao avaliar indivíduos afetados por essa ação imunossupressora secundária dos agrotóxicos, diversas reações podem ser observadas no organismo, como uma maior predisposição à infecção por parasitos e outros agentes infecciosos (Christin *et al.*, 2003; Forson; Storfer, 2006; Rohr *et al.*, 2013). Além dos efeitos hormônio-dependentes, os agrotóxicos também podem afetar os anfíbios de outras formas; genotoxicidade - capacidade de causar danos ao material genético -, efeitos teratogênicos e redução de crescimento e sobrevivência são algumas das consequências relatadas (Garcês; Pires; Rodrigues, 2019; Langerveld *et al.*, 2009).

O herbicida ácido diclorofenoxiacético, popularmente conhecido como 2,4-D, pertence ao grupo químico do ácido ariloxialcanóico e é utilizado no ambiente agrícola para seletivamente eliminar ervas daninhas de folhas largas (Arcaute; Soloneski; Larramendy, 2016; Munro *et al.*, 1992). Este composto é amplamente utilizado no Brasil e no mundo em culturas como o arroz, cana-de-açúcar e batata (Freitas *et al.*, 2019). Quando diluído ou degradado de forma ineficiente, pode atingir concentrações capazes de causar genotoxicidade em organismos aquáticos (Arcaute; Soloneski; Larramendy, 2016). Em girinos expostos cronicamente, é capaz de prejudicar o crescimento, natação e metamorfose, assim como alterar reservas lipídicas (Freitas *et al.*, 2019). Este composto também é responsável por danos teratogênicos e por aumentar a resposta contra a maior geração de radicais livres em *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) (Aronzon *et al.*, 2010; Lajmanovich *et al.*, 2015).

As estrobilurinas atuam na inibição da respiração celular fúngica, sendo eficientes para o controle de doenças causadas por estes organismos (Bartett *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2020). Os compostos mais utilizados do grupo são a azoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina e cresoxim-metílico (Zhang *et al.*, 2020). Estrobilurinas causam elevada letalidade e efeitos teratogênicos em *Xenopus tropicalis* (Anura: Pipidae) (Li *et al.*, 2016). Piraclostrobina também é associada com maiores cargas parasitárias de trematódeos em *Aquarana catesbeiana* (Anura: Ranidae) (Hopkins; Hoverman, 2024). Estes compostos ainda podem ter efeitos sinérgicos ao serem utilizados em misturas com outros agrotóxicos (Wu *et al.*, 2018).

Triazóis compreendem um grupo amplamente utilizado na agricultura, os quais desestabilizam a membrana fúngica, inibindo o seu crescimento (Pernak *et al.*, 2015; Sancholle;

Weete; Montant, 1984). Existem diversos compostos triazóis atualmente, utilizados em estudos que avaliam seus efeitos em organismos não-alvo (Roman *et al.*, 2021). O ciproconazol pode diminuir o crescimento, prejudicar a metamorfose e ocasionar comportamentos anormais em *Pelophylax nigromaculatus* (Anura: Ranidae) (Zhang *et al.*, 2019). Triazóis são associados com efeitos teratogênicos em ratos e *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae) (Groppelli *et al.*, 2005; Renzo *et al.*, 2011). Estes produtos químicos também podem alterar a dinâmica de *Batrachochytrium dendrobatidis* no ambiente (Barbi *et al.*, 2023). Mesmo não reduzindo a carga fúngica em animais previamente contaminados, aparentam ter um efeito preventivo ao expor o hospedeiro antes da infecção (Barbi *et al.*, 2023). Embora com aparentes efeitos positivos, também causa um alerta quanto a possibilidade de selecionar organismos resistentes e os efeitos disso na medicina humana e veterinária (Barbi *et al.*, 2023; Garcia-Rubio; Cuenca-Estrella; Mellado, 2017).

## 2.2 Doenças emergentes como obstáculos à conservação de anfíbios

A maior ocorrência de declínios populacionais de anfíbios em nível global atrai a atenção de pesquisadores para o estudo das causas e o efeito delas nos animais há anos (Duffus; Olson, 2011; Stuart *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004). Entre estas causas, podemos citar as doenças infecciosas emergentes, principalmente representadas pela quitridiomicose e ranavirose (Duffus; Olson, 2011), ambas notificáveis à *World Organisation for Animal Health* (WOAH, fundada previamente como OIE - *Office International des Epizooties*) (OIE, 2022).

### 2.2.1 Quitridiomicose

O filo Chytridiomycota é composto por fungos encontrados principalmente na água e solo, capazes de parasitar principalmente outros fungos, algas, plantas e alguns pequenos invertebrados, utilizando quitina, queratina e debris como substrato (Berger *et al.*, 1998). Após análises histológicas de anuros vítimas de eventos de mortalidade em massa no Panamá e Austrália na década de 1990, foi descrito o primeiro relato de organismos deste filo parasitando vertebrados (Berger *et al.*, 1998).

A quitridiomicose é uma doença causada principalmente pelo fungo *B. dendrobatidis* (Longcore; Pessier; Nichols, 1999), o qual pode ser observado infectando a porção queratinizada da epiderme de anfíbios das ordens Anura, Urodela e Gymnophiona em todos os continentes nos quais habitam seus hospedeiros (Berger *et al.*, 1998; Olson; Ronnenberg, 2014).

Mais recentemente, após investigações de declínios populacionais de causa desconhecida de *Salamandra salamandra* (Caudata: Salamandridae), foi descrita a espécie *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.*, 2013). Atualmente, a quitridiomiose é associada com o declínio populacional de mais de 500 espécies de anfíbios, sendo que 90 destas podem estar extintas (Scheele *et al.*, 2019). No Brasil somente há descrição de *B. dendrobatidis*, a qual é amplamente distribuída pelo país, especialmente em regiões de mata atlântica (Carvalho; Becker; Toledo, 2017).

Em anfíbios adultos afetados por *B. dendrobatidis* geralmente não são observadas lesões macroscópicas. Por outro lado, em análises histológicas, esporângios podem ser encontrados nos estratos córneo e granuloso da epiderme, principalmente nos dígitos e região ventral do corpo (Berger *et al.*, 1998). Além das estruturas fúngicas, também podem ser visualizadas no estrato córneo áreas de hiperqueratose paraqueratósica e eventual erosão (Berger *et al.*, 1998). Em contrapartida, o oposto é observado em infecções por *B. salamandrivorans*, o qual é responsável por causar erosões multifocais superficiais, assim como úlceras profundas (Martel *et al.*, 2013). Citologicamente, o diagnóstico de quitridiomiose pode ser feito através da visualização de estruturas esféricas, frequentemente septadas, no citoplasma de queratinócitos ou no meio extracelular (Pressier, 2021).

Embora o mecanismo por trás da elevada letalidade da doença não esteja totalmente elucidado, em animais com cargas muito elevadas do fungo na pele a respiração cutânea e osmorregulação podem ser prejudicadas (Berger *et al.*, 1998; Fisher; Garner, 2020). Visto que o fungo somente se desenvolve em regiões queratinizadas da pele, em girinos a infecção só é capaz de ocorrer na boca, não sendo observado em outras regiões do corpo (Berger *et al.*, 1998). Por este mesmo motivo, a quitridiomiose não costuma causar a morte de anfíbios em estágio larval (Berger *et al.*, 1998).

### 2.2.2 Ranavirose

Os vírus do gênero *Ranavirus* são membros da família *Iridoviridae* e possuem genoma constituído por DNA dupla fita (Chinchar, 2002). Estes vírus são capazes de afetar de forma sistêmica peixes, anfíbios e répteis (Chinchar, 2002), com relatos na Ásia, Oceania, Europa, África e Américas (Brunner *et al.*, 2021).

Infecções por *Ranavirus* podem causar lesões em diversos órgãos, sendo associadas com doença clínica em populações de animais ectotérmicos há algumas décadas (Chinchar, 2002). Embora espécies diferentes do vírus possuam diferentes patogenicidades, a taxa de mortalidade

por ranaviruses pode chegar a 100% (Chinchar, 2002). Diversos fatores podem aumentar a susceptibilidade ao vírus, como a infecção por variedades mais virulentas ou a ação de estressores naturais e antropogênicos (Gray; Miller; Hoverman, 2009), incluindo os agrotóxicos (Forson; Storfer, 2006).

Em anfíbios, os primeiros isolados de *Ranavirus* datam da década de 1960 em amostras de *Lithobates pipiens* (Anura: Ranidae) (Granoff; Came; Rafferty, 1965). Atualmente já existem relatos de infecções em diversas espécies de anuros e urodelos em diferentes estágios ontogenéticos, sendo especialmente mais comum em membros da família Ranidae (Duffus; Olson, 2011; Miller; Gray; Storfer, 2011). Até o momento, não há relatos na ordem Gymnophiona (Brunner *et al.*, 2021).

Em um estudo com *Rana sylvatica* (Anura: Ranidae), foi observada uma redução na contagem relativa de linfócitos e neutrofilia em estágios iniciais da infecção por *Ranavirus*, seguido por linfocitose relativa com a progressão da doença (Forzán *et al.*, 2016). Também foram observadas inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas em todas as linhagens leucocitárias, com origem viral confirmada por imunocitoquímica; células contendo estas inclusões apresentavam degeneração nuclear, assim como outras alterações morfológicas (Forzán *et al.*, 2016).

A distribuição mundial do vírus, somada à capacidade de causar doença em diversas espécies de anfíbios, demonstram o seu risco a estas populações (Miller; Gray; Storfer, 2011). Esforços para a reunião de dados sobre *Ranavirus* e da sua distribuição resultaram em um sistema online e de acesso livre, o *Global Ranavirus Reporting System* (GRRS, [https://brunnerlab.shinyapps.io/GRRS\\_Interactive/](https://brunnerlab.shinyapps.io/GRRS_Interactive/)), criado em 2015 (Brunner *et al.*, 2021). No Brasil ainda são escassos os relatos, todos envolvendo a espécie exótica invasora *A. catesbeiana* e restritos ao sudeste (Neves *et al.*, 2016; Candido *et al.*, 2019) e centro-oeste (Galli *et al.*, 2006; Mazzoni *et al.*, 2009) do país, assim como um único no estado do RS (Ruggeri *et al.*, 2019).

### **2.3 Patologia clínica: ferramenta para a avaliação da saúde de anfíbios**

Devido aos declínios em populações de anfíbios ao redor do mundo, suas aplicações como modelo de estudo e até mesmo como mascotes, é observado um aumento na demanda por médicos veterinários que atuem com esses animais em programas de conservação, no ambiente laboratorial e na clínica médica, respectivamente (Pessier, 2021). Anfíbios também podem atuar como bioindicadores, visto que suas variáveis hematológicas aparentam estar diretamente conectadas às condições ambientais (Gavel *et al.*, 2021; Welsh; Ollivier, 1998; Zhelev;

Popgeorgiev; Mehterov, 2015). A avaliação hematológica de anfíbios é uma ferramenta muito útil quando utilizada como um direcionamento para a avaliação da saúde, diagnóstico de enfermidades, elaboração de prognósticos e acompanhamento terapêutico (Heatley; Russell, 2019). Entretanto, por serem animais ectotérmicos e adaptados ao ambiente terrestre e aquático, muitas variações são observadas em suas condições fisiológicas (Campbell, 2012; Heatley; Russell, 2019). Visto que fatores extrínsecos e intrínsecos podem ser bastante influentes, o estabelecimento de IR e a interpretação de resultados se tornam grandes desafios nestes animais (Forzán; Horney, 2020). A utilização de técnicas associadas, como reação em cadeia da polimerase (PCR), sorologia, histopatologia e cultura microbiológica, é frequentemente necessária para o diagnóstico definitivo da etiologia de doenças (Heatley; Russell, 2019).

Por outro lado, mesmo que complexa, a avaliação hematológica destes animais possui grande potencial para o monitoramento do status sanitário quando considerados diferentes IR e o efeito de fatores que possam influenciar na resposta hematológica (Campbell; Ellis, 2015). Atualmente, diretrizes já foram estabelecidas por profissionais da patologia clínica veterinária para o estabelecimento de IR de animais silvestres, minimizando interferentes (Friedrichs *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Coleta de sangue

Com finalidade de evitar a remoção da camada protetora de muco e trocas excessivas de calor, a manipulação de anfíbios deve ser realizada de forma delicada e durante o menor tempo possível (Forzán *et al.*, 2017). O uso de luvas nitrílicas sem talco também é encorajado para evitar lesões na pele e intoxicações ao animal, além de proteger o profissional envolvido (Greer *et al.*, 2009).

Sabe-se que o volume de sangue circulante de anuros é variável (Campbell; Ellis, 2015), embora componha aproximadamente 10% do peso corporal (Arikan; Cicek, 2014). Por segurança, de forma geral, a quantidade máxima de sangue que deve ser coletada de um indivíduo sadio é considerada a correspondente a 1% do seu peso corporal (Campbell; Ellis, 2015; Forzán *et al.*, 2017), podendo ser obtida por punção da veia abdominal ventral, veia femoral, veia maxilar, plexo lingual ou por cardiocentese (Almosny, 2014; Campbell, 2012; Campbell; Ellis, 2015; Forzán *et al.*, 2017; Heatley; Russell, 2019).

Assim como em répteis, devido à proximidade dos vasos linfáticos aos sanguíneos, amostras de sangue coletadas de anfíbios podem ser contaminadas por linfa durante a punção,

o que deve ser evitado a fim de prover valores fidedignos das contagens celulares (Almosny, 2014; Campbell, 2012; Campbell; Ellis, 2015).

Parte da literatura orienta o uso de heparina lítica como anticoagulante para análises hematológicas de anfíbios, visto que o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) seria capaz de causar hemólise em algumas espécies (Arikan; Cicek, 2014; Campbell, 2012). Entretanto, diversos estudos já extrapolam o uso do EDTA como anticoagulante para alguns anuros (Chang *et al.*, 2015; Coppo; Mussart; Fionarelli, 2005; Das; Mahapatra, 2014; Franco-Belussi *et al.*, 2022), o que permite uma contagem celular mais adequada devido à menor agregação de trombócitos e leucócitos. Entretanto, como todos os anticoagulantes podem afetar em diferentes graus a coloração e morfologia celular, é sempre recomendada a realização de distensões sanguíneas com a amostra fresca, imediatamente após a coleta (Heatley; Russell, 2019).

### 2.3.2 Processamento de amostras para hemograma e citologia sanguínea

Quando comparadas com as de mamíferos, mais limitações podem ser observadas nas análises hematológicas de anfíbios; embora alguns estudos tentem associar uma metodologia híbrida, utilizando contadores celulares automáticos, ainda é indispensável a realização de contagens manuais (Forzán *et al.*, 2017; Heatley; Russell, 2019). Metodologias descritas na literatura para a quantificação das células incluem estimativas de leucócitos em lâmina e contagens em hemocítmetro, utilizando contagens indiretas (como a coloração de Floxina) e diretas (utilizando o corante de Natt-Herrick), sendo a última considerada a mais acurada (Heatley; Russell, 2019). A aferição do hematócrito, estimativa de proteínas plasmáticas totais, diferencial e morfologia celular também devem ser incluídos no hemograma de anfíbios (Heatley; Russell, 2019).

Os anfíbios possuem os maiores eritrócitos entre os vertebrados (Arikan; Cicek, 2014). Estas células são elípticas, possuindo citoplasma pálido eosinofílico e núcleo ovalado central com cromatina densa (Arikan; Cicek, 2014; Campbell, 2012). Os policromatófilos são eritrócitos mais imaturos, de aparência menor, mais arredondados e com citoplasma mais basofílico, encontrados em discreta quantidade em animais hígidos (Forzán *et al.*, 2017).

Flutuações eritrocitárias sazonais são comuns, principalmente durante a primavera, estação em que se espera um maior número de células circulantes (Campbell, 2012). Por outro lado, alterações em índices eritrocitários também podem caracterizar anemia (regenerativa ou não regenerativa) ou eritrocitose (Heatley; Russell, 2019). Assim como em outros vertebrados, anemias regenerativas podem ocorrer devido à perda de sangue aguda e hemólise (Heatley;

Russell, 2019). Entre as causas de hemólise podemos citar a infecção por hemoparasitos, embora a patogenicidade destes agentes infecciosos seja dependente de diversos fatores, como a adaptação ao hospedeiro, célula afetada e espécie parasitária (Heatley; Russell, 2019). A identificação da resposta regenerativa ocorre devido à visualização de maiores quantidades de policromatófilos e outros precursores eritrocitários, eritrócitos binucleados e figuras de mitose (Heatley; Russell, 2019).

Os leucócitos de anfíbios aparentemente possuem funções similares às exercidas pelos de outros vertebrados, embora poucos estudos avaliem efeitos diretos sobre a proporção celular (Campbell, 2012; Heatley; Russell, 2019). No sangue de anfíbios, estes seguem a mesma classificação de mamíferos em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos) (Campbell, 2012; Forzán *et al.*, 2017; Heatley; Russell, 2019).

O termo heterófilo já foi previamente utilizado para se referir ao granulócito mais comum em anfíbios; porém, visto que citoquimicamente são mieloperoxidase positivos, atualmente são chamados de neutrófilos (Forzán *et al.*, 2017; Heatley; Russell, 2019; Pessier, 2021). Estas células são similares às encontradas em mamíferos, arredondadas, com citoplasma discretamente basofílico, pequenos grânulos eventualmente visíveis e núcleo multilobulado (Campbell; Ellis, 2015; Forzán *et al.*, 2017). Algumas espécies, como *L. luctator*, possuem neutrófilos com núcleo uni ou bilobulado (Bilhalva *et al.*, 2023). Eosinófilos possuem tamanho similar aos neutrófilos, porém com citoplasma mais basofílico, repleto de grânulos arredondados e eosinofílicos, e um núcleo menos lobulado (Arikan; Cicek, 2014; Campbell, 2012). Basófilos são granulócitos de fácil diferenciação (Heatley; Russell, 2019). Possuem citoplasma e núcleo arredondado, o qual por muitas vezes é oculto por grandes grânulos basofílicos (Campbell, 2012; Campbell; Ellis, 2015). Corantes aquosos podem não evidenciar corretamente esta granulação, sendo preferível a utilização de colorações derivadas de Romanowsky que utilizem metanol como solvente (Allison; Velguth, 2010).

Linfócitos geralmente são as células mais comuns no diferencial leucocitário de anfíbios (Heatley; Russell, 2019). São bastante similares aos observados em mamíferos, de formato arredondado, com citoplasma discretamente basofílico e agranular, assim como núcleo excêntrico com cromatina densa, ocupando grande parte do citoplasma (Arikan; Cicek, 2014; Heatley; Russell, 2019). Eventualmente, grandes linfócitos podem ser observados em esfregaços sanguíneos de animais saudáveis (Campbell, 2012). Monócitos são caracterizados por suas grandes dimensões e formato irregular, com citoplasma abundante, frequentemente vacuolizado e diferentes formatos de núcleo com cromatina pouco condensada (Campbell, 2012). No citoplasma destas células eventualmente podem ser observados materiais

fagocitados, como melanina, debris mucoproteicos, lipídios, eritrócitos, hemossiderina, entre outros (Heatley; Russell, 2019).

Assim como descrito para aves e répteis, os trombócitos de anfíbios também são nucleados e participam do processo de coagulação (Campbell, 2012; Forzán *et al.*, 2017). A morfologia destas células depende de certos fatores (Heatley; Russell, 2019). Quando se encontram inativados possuem formato ovalado, citoplasma pálido, pouco corado e núcleo ovalado central com cromatina densa (Campbell, 2012; Forzán *et al.*, 2017). Trombócitos ativados, por outro lado, são arredondados, frequentemente apresentando pseudópodes e citoplasma com granulação eosinofílica (Heatley; Russell, 2019). Estas células também podem ser facilmente confundidas com pequenos linfócitos, os quais possuem cromatina nuclear menos condensada e citoplasma mais basofílico (Forzán *et al.*, 2017). A presença de agregados trombocitários é bastante comum, principalmente quando utilizada a heparina como anticoagulante (Heatley; Russell, 2019). A presença de trombócitos imaturos pode sugerir uma resposta regenerativa desta linhagem celular (Campbell, 2012; Campbell; Ellis, 2015).

A interpretação do hemograma de anfíbios pode ser um desafio, sendo geralmente extrapolada de maneira similar à aplicada com répteis (Almosny, 2014). Para isso, deve ser levada em conta a fase de desenvolvimento, idade, fase reprodutiva e variações sazonais (Almosny, 2014). Além disso, contaminantes ambientais estressores, como os agrotóxicos, também podem modular a celularidade observada (Silva *et al.*, 2020).

### 2.3.3 Parasitos e outras inclusões observadas no sangue de anfíbios

A elevada prevalência de organismos parasitários no sangue de anfíbios é um assunto discutido há décadas (Causey, 1939). Um dos primeiros registros na literatura sobre os hemoparasitos destes animais foi o relato da descoberta do agente *Trypanosoma sanguinis* (syn. *Trypanosoma rotatorium*) em amostras de *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) (Ferreira *et al.*, 2015; Gruby, 1843; Hoare, 1964). Dessa forma, a observação de parasitos sanguíneos em esfregaços sanguíneos de anfíbios se torna um achado frequente (Forzán *et al.*, 2017).

Sabe-se que a invasão do ambiente terrestre após o período larval permite uma maior exposição dos indivíduos às diferentes condições climáticas, predadores e vetores capazes de transmitir agentes patogênicos (Fonseca; Reynolds, 2021). Além disso, as células sanguíneas dos anfíbios aparentemente proporcionam um ambiente propício para o desenvolvimento de seres eucariotos e procariotos (Desser; Barta, 1984).

De forma geral, infecções parasitárias raramente cursam com doenças em anfíbios de vida-livre, entretanto, manifestações clínicas e hematológicas podem ser observadas devido ao estresse (Arikan; Cicek, 2014). Protozoários intracelulares e extracelulares, assim como helmintos, bactérias intraeritrocitárias e inclusões virais podem ser encontrados em amostras coletadas de animais de cativeiro ou vida-livre (Desser, 2001; Forzán *et al.*, 2017; Netherlands *et al.*, 2015). Segundo alguns autores, a prevalência destes agentes parece ser mais modulada de acordo com o habitat do indivíduo, visto que aparenta afetar mais animais de ambientes aquáticos ou que possuam o estágio biológico de girino por longos períodos (Barta; Desser, 1984; Desser; Barta, 1984). A exposição prolongada de um hospedeiro anfíbio com vetores também aparenta possuir relação com a parasitemia, já que animais maiores e mais velhos costumam possuir maior carga parasitária (Barta; Desser, 1984; Nguiffo *et al.*, 2019).

A quantidade de pesquisas a respeito destes agentes de anfíbios vem crescendo nos últimos tempos, embora ainda ocorram em poucas áreas do Brasil, geralmente restritas ao Centro-Oeste (Ferreira *et al.*, 2007; 2015; Rodrigues *et al.*, 2019; Úngari *et al.*, 2020; 2021; 2022), Sudeste (Costa; Pereira, 1971; Costa *et al.*, 1973; Ferreira *et al.*, 2007; 2020; Úngari *et al.*, 2022) e Norte (Coelho *et al.*, 2021a; 2021b; 2021c; Ferreira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2020; Pinho *et al.*, 2021). Na região sul do país ainda não há descrição molecular de hemoparasitos de anuros, com dois estudos restrito à morfologia, um no estado do Paraná (D'Bastiani; Struett; Campião, 2018) e outro no RS (Bilhalva *et al.*, 2023).

### 2.3.3.1 Protozoários intracelulares

Pequenas inclusões intraeritrocitárias nomeadas de *Anguillula minima* foram relatadas em anfíbios pela primeira vez no século 19 por Chaussat (1850, apud Mackerras; Mackerras, 1961), sendo posteriormente classificadas como *Lankesterella minima* (Labbé, 1899). Estes parasitos são coccídios pertencentes à subordem Eimeriorina, e, no hospedeiro vertebrado, são capazes de realizar esquizogonia e esporogonia em macrófagos e células endoteliais, seguidos pela liberação de esporozoítos pelo oocisto e invasão de eritrócitos e leucócitos (Mackerras; Mackerras, 1961; Paperna *et al.*, 2009). Também podem ser facilmente observados livres no esfregaço sanguíneo, provavelmente devido ao rompimento de eritrócitos infectados, os quais possuem menor integridade (Mackerras; Mackerras, 1961; Paperna; Martin, 2001). Acredita-se que a transmissão ocorra através de hospedeiros invertebrados, como as sanguessugas da espécie *Hemiclepsis marginata* (Noller, 1920 *apud* Fonseca; Reynolds, 2021), embora possivelmente atuem somente como vetores mecânicos (Mackerras; Mackerras, 1961).

Outros protozoários intracelulares observados em anfíbios incluem as hemogregarinas, termo utilizado na literatura para se referir a um grande e diverso grupo de parasitos apicomplexos da subordem Adeleorina (Netherlands *et al.*, 2020). Dentro da família Haemogregarinidae, o gênero *Hepatozoon* é frequentemente relatado em anfíbios, enquanto os gêneros *Haemogregarina*, *Haemolivia* e *Pseudohaemogregarina* são reportados raramente (Al-Quraishy *et al.*, 2021). Para uma correta diferenciação morfológica entre os gêneros, principalmente *Hepatozoon* e *Haemogregarina*, se faz necessária a observação do estágio esporogônico no vetor, entretanto, a maioria dos relatos descritivos são baseados somente na morfologia parasitária encontrada no sangue do hospedeiro, visto que os ciclos biológicos ainda foram pouco elucidados (Leal *et al.*, 2009). *Hepatozoon leptodactyli* já foi observado parasitando eritrócitos de *Leptodactylus pentadactylus* e do complexo *L. latrans*, sendo possivelmente transmitido por vetores sanguessugas da espécie *Haementeria lutzi* (Costa *et al.*, 1973). Em infecções graves, os autores também relataram a presença deste parasito em leucócitos (Costa *et al.*, 1973).

Hemogregarinas pertencentes à família Dactylosomatidae também podem ser observadas no sangue de anfíbios, como os gêneros *Babesiosoma* e *Dactylosoma* (Davies; Johnston, 2000; Netherlands *et al.*, 2020). Entre estes, o gênero *Dactylosoma* é mais frequentemente citado na literatura e, devido à observação deste parasito em diferentes locais do mundo, acredita-se que habitam o sangue de anfíbios há muitos anos, sem efeitos patogênicos descritos (Manwell, 1964). Relatos da presença deste gênero já existem em diversas espécies de anuros, incluindo as do complexo *L. latrans* (Costa; Pereira, 1971). Visto que membros dessa família somente foram observados em animais aquáticos, acredita-se que sejam transmitidos por vetores como as sanguessugas (Netherlands *et al.*, 2020).

### 2.3.3.2 Protozoários extracelulares

Protozoários flagelados da família Trypanosomatidae possuem distribuição mundial (Bardsley; Harmsen, 1973; O'Donoghue, 2017) e podem habitar o sangue de todas as classes de vertebrados (Jordaan; Preez; Netherlands, 2023). A descrição inicial destes parasitos ocorreu na primeira metade do século XIX, com a criação do gênero *Trypanosoma* (Gruby, 1843). Tripomastigotas geralmente são maiores e mais complexos em anfíbios do que em mamíferos, com núcleo e cinetoplasto visíveis, mas dotadas ou não de membrana ondulante e flagelo, podendo ser facilmente encontradas de forma livre no sangue do hospedeiro vertebrado (Bardsley; Harmsen, 1973). Os formatos observados no sangue destes animais podem ser

diversos, variando desde a clássica aparência alongada tripaniforme, até formas arredondadas e ausentes de flagelo livre (Ferreira *et al.*, 2007).

Diversos fatores dificultam a identificação das mais de 60 espécies de tripanossomas que habitam estes animais (Klaphake, 2009). Devido ao intenso pleomorfismo destes protozoários, o reconhecimento com base na morfologia não deve ser realizado além do gênero no estágio biológico presente no sangue do hospedeiro (Bardsley; Harmsen, 1973; Desser, 2001), o que resultou em diversas espécies classificadas erroneamente ao longo dos anos (Desser, 2001). Além disto, o gênero costuma compreender agentes menos espécie-específicos quando habitando animais de sangue frio (Bardsley; Harmsen, 1973).

Em anfíbios, sanguessugas e dípteros são descritos como potenciais vetores para a transmissão de tripanossomatídeos (Ayala, 1971; Barta; Desser, 1984; Johnson; Young; Butler, 1993; Martin; Desser, 1991; O'Donoghue, 2017), os quais não costumam ser patogênicos. Entretanto, existem relatos associados com espécies de *Trypanosoma* nos quais puderam ser observados sinais clínicos graves, incluindo óbito (Klaphake, 2009).

#### 2.3.3.3 *Helmintos*

Nematódeos da família Onchocercidae, popularmente conhecidos como filárias, podem migrar entre o sangue e a linfa do hospedeiro, locais de fácil ingestão pelo vetor hematófago (Bain, 2002). Estes parasitos podem afetar uma grande gama de hospedeiros terrestres, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Bain, 2002). A visualização de microfilárias no sangue de anfíbios é comum, sendo frequentemente relatadas em estudos sobre a fauna hemoparasitária destes animais (Netherlands *et al.*, 2015; Nguiffo *et al.*, 2019). A prevalência e intensidade da infecção flutuam de acordo com a época do ano, provavelmente de acordo com a disponibilidade de dípteros vetores (Nguiffo *et al.*, 2019).

Embora não costumem ser associados com doenças, em elevadas quantidades estes helmintos podem causar letargia e outros sinais clínicos (Arikan; Cicek, 2014). Infecções acentuadas por microfilárias ou indivíduos adultos do gênero *Foleyella* podem resultar em óbito (Klaphake, 2009).

#### 2.3.3.4 *Rickettsias*

Estruturas intraeritrocitárias similares a rickettsias foram descritas no sangue de anfíbios no final do século 19 por Labbé (1894 *apud* Desser; Barta, 1989) e chamadas de *Cytamoeba*

*bacterifera*. Devido às suas características ultraestruturais, posteriormente foram inseridas no gênero *Aegyptianella*, organismos capazes de afetar outros ectotérmicos e aves (Desser, 1987). Já no século XXI, foram reclassificados na família Flavobacteriaceae como *Candidatus Hemobacterium ranarum* (Zhang; Rikihisa, 2004). Na microscopia de luz geralmente aparentam como uma estrutura intracitoplasmática arredondada e delimitada, preenchida por organismos bastonetes dispostos em paralelo, os quais podem ser observados eventualmente isolados (Desser, 1987). Quanto à sua transmissão, acredita-se que sanguessugas atuem como vetores destes agentes (Desser, 1987). O significado clínico destes agentes ainda é incerto (Pressier, 2021).

#### 2.3.3.5 Inclusões virais

Inclusões virais intraeritrocitárias são descritas há anos em anfíbios, ocasionadas por vírus icosaédricos, com DNA dupla fita e eventualmente envelopados (Grua-Gray; Petric; Desser, 1989). Chamados de *Frog erythrocytic virus* (FEV), acredita-se que façam parte da família dos *Iridovirus* (Grua-Gray; Petric; Desser, 1989). Embora ainda com raras descrições moleculares, estudos filogenéticos mais recentes posicionam os vírus eritrocitários de *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) na subfamília *Betairidoviridae* (Russo *et al.*, 2021).

As inclusões associadas ao FEV apresentam um formato redondo, localizadas no citoplasma celular e eventualmente deslocando o núcleo (Desser; Barta, 1984). Estas inclusões já foram descritas por diferentes autores como eosinofílicas e basofílicas, mesmo utilizando ao utilizar o mesmo corante, o que levanta a hipótese de se tratar de diferentes organismos (Desser; Barta, 1984; Pessier, 2021; Werner, 1993). Eritrócitos infectados pelo FEV aparentam menores e mais arredondados na visão bidimensional, embora o volume corpuscular médio (VCM) seja maior (Gruia-Gray; Desser, 1992). Em animais com infecções muito acentuadas já foi observada anemia, provavelmente decorrente de hemólise extravascular (Gruia-Gray; Desser, 1992). Acredita-se que este vírus seja mais frequente e potencialmente mais letal para animais jovens, podendo também levar a uma maior susceptibilidade à predação e infecções por outros patógenos (Gruia-Gray; Desser, 1992). Segundo alguns autores, a presença das estruturas em eritrócitos sugere que um vetor hematófago está envolvido (Desser; Barta, 1984), provavelmente dípteros e de forma mecânica (Gruia-Gray; Desser, 1992).

#### 2.3.4 Bioquímica de proteínas sanguíneas

O plasma é um fluido responsável pelo transporte de substâncias de diferentes pesos moleculares (Arikan; Cicek, 2014). A coloração normal do plasma de anfíbios é bastante variável, de incolor a amarelo claro, alaranjado, azul ou até mesmo esverdeado (Forzán *et al.*, 2017; Heatley; Johnson, 2009). A escolha da amostra entre plasma e soro depende do ensaio bioquímico e metodologia realizada, entretanto, precauções especiais devem ser tomadas para a interpretação dos resultados de anfíbios (Forzán *et al.*, 2017). Além das variações extrínsecas e a falta de padronização na elaboração de IR, deve ser considerado o fato de que a maioria dos analisadores bioquímicos mede a atividade enzimática a 37° C, bastante superior à esperada para a ação enzimática em anfíbios (Forzán *et al.*, 2017). Dessa forma, são raras as informações a respeito da significância diagnóstica de enzimas cardíacas, hepáticas, pancreáticas e musculares em anfíbios (Forzán *et al.*, 2017).

Proteínas sanguíneas podem ser aferidas por refratometria, espectrofotometria e eletroforese (Forzán *et al.*, 2017). A análise de sólidos totais (ST), principalmente influenciados pelas proteínas presentes no plasma, é realizada por refratometria, sendo considerada uma alternativa rápida e sem custos (Forzán *et al.*, 2017). No entanto, esta análise deve ser interpretada como uma estimativa, visto que pode ser elevada devido à presença de outros sólidos dissolvidos na amostra, como colesterol e triglicerídeos (Parker-Graham; Clayton; Mangus, 2020), embora pesquisadores tenham obtido uma boa correlação com o método do Biureto em um estudo com *Litoria caerulea* e *Litoria infrafrenata* (Anura: Pelodyadidae) (Young *et al.*, 2012). Para a dosagem de proteínas totais (PT) séricas de forma acurada, recomenda-se utilizar o método do Biureto (Forzán *et al.*, 2017).

A albumina geralmente é aferida em laboratórios veterinários pelo método do Verde de Bromocresol, o qual pode promover ligações inespecíficas com globulinas e superestimar a sua concentração em aves (Spagnolo *et al.*, 2006) e répteis (Broughton; Webb, 2022; Müller; Brunberg, 2010). Apenas um estudo avaliou este método para a dosagem de albumina em relação à eletroforese de proteínas em anfíbios e, ao contrário do observado para outras classes, os valores foram aparentemente subestimados pelo método do Verde de Bromocresol (Young *et al.*, 2012). Dessa forma, acredita-se que a eletroforese de proteínas seja o método mais confiável para avaliar a concentração relativa de albumina e globulinas através de uma medida acurada de PT (Forzán *et al.*, 2017). Esta metodologia se torna especialmente interessante ao requerer baixas quantidades de amostra, entretanto, possui um custo elevado, pode ser de difícil acesso e sua interpretação ainda é pouco estudada em anfíbios (Forzán *et al.*, 2017).

O aumento das PT deve ser avaliado junto com as suas frações e pode ser decorrente de enfermidades ou não (Forzán *et al.*, 2017). Anfíbios mantidos em temperaturas muito baixas ou

em brumação podem apresentar hiperglobulinemia através do aumento de fibrinogênio, proteínas de choque térmico, proteínas transportadoras de glicose e proteínas anticongelantes (Helmer; Whiteside, 2005). O processo de metamorfose também exige um aumento significativo das proteínas séricas, especialmente a albumina (Feldhoff, 1971). Outras causas de hiperproteinemia incluem processos inflamatórios (por hiperglobulinemia) e desidratação (principalmente por hiperalbuminemia) (Forzán *et al.*, 2017). Hipoproteinemia, por outro lado, pode ser observada em animais com doenças hepáticas, renais ou gastrointestinais, assim como na má nutrição (Crawshaw, 1998; Parker-Graham; Clayton; Mangus, 2020).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Avaliar se os indicadores do *status* sanitário em *L. luctator* coletados em uma plantação de arroz orgânico são diferentes dos avaliados em anuros da mesma espécie que habitam um arrozal convencional.

#### 3.2 Objetivos específicos

Quantificar os níveis de agrotóxicos na água localizada nos drenos das plantações de arroz orgânico e convencional pesquisadas no estudo.

Avaliar se o hemograma e os valores de proteínas séricas em *L. luctator* coletados na área de plantação de arroz orgânico diferem daqueles coletados em arrozal convencional.

Determinar se a quantidade de alterações nucleares em eritrócitos de *L. luctator* coletados em área de plantação de arroz orgânico é distinta de animais coletados em arrozal convencional.

Avaliar a presença de DNA de *Ranavirus* em amostras sanguíneas de *L. luctator* e verificar se difere entre animais coletados em áreas de plantações de arroz orgânico e convencional.

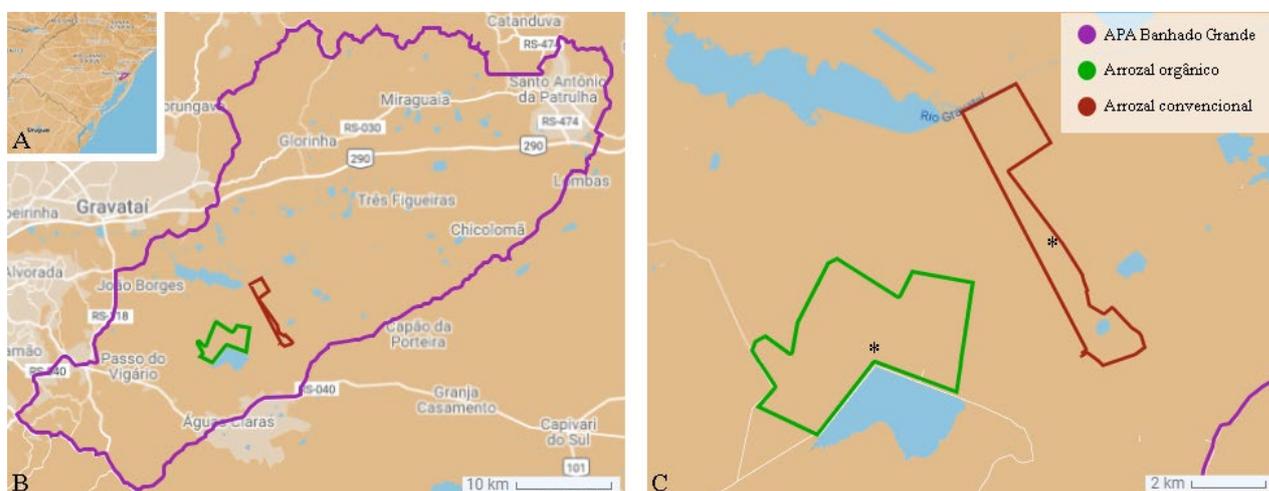
Avaliar e quantificar a presença de hemoparasitos de *L. luctator* por técnicas de microscopia óptica e PCR, verificando se diferem em anuros coletados em áreas de plantações de arroz orgânico e convencional.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido em duas áreas pertencentes ao município de Viamão, Rio Grande do Sul, localizadas dentro da Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande. A área de arrozal orgânico (AO) é composta por 1600 ha de plantações de arroz de base ecológica pertencente ao Assentamento Filhos de Sepé ( $30^{\circ}03'56''S$   $50^{\circ}52'29''O$ ), apoiada em práticas sustentáveis de produção e posicionada ao redor do reservatório artificial Barragem Águas Claras, com aproximadamente 500 ha. Neste sistema, o preparo do solo é feito com adubos orgânicos no período entressafra, seguido pela nivelção do terreno e semeadura com sementes pré-germinadas. O controle de organismos danosos é feito através do controle da lâmina d'água. A área denominada de arrozal convencional (AC) é composta por 811 ha destinados ao cultivo de arroz ( $30^{\circ}02'24''S$   $50^{\circ}49'29''O$ ), a qual se difere do sistema anterior por utilizar de agrotóxicos em diversas etapas do desenvolvimento da planta. A fim de evitar outros fatores que possam afetar os animais do estudo, foram selecionadas áreas bastante próximas (com os pontos de coleta se distanciando em apenas 5,5 km) e com manejos similares, diferenciando-se somente no uso ou não de agrotóxicos. Todos os animais envolvidos no projeto foram coletados nos meses de março e abril de 2023, logo após a colheita do arroz, e em uma distância máxima de 5 m do canal de drenagem da lavoura a fim de melhor delimitação do espaço.

Figura 1 – Mapa demonstrando os limites da Área de Proteção Ambiental (APA) do Banhado Grande, assim como os limites das regiões destinadas à produção de arroz orgânico e convencional



A: estado do Rio Grande do Sul; B: APA do Banho Grande; C: arrozais utilizados no estudo, asteriscos marcam os pontos de coleta em cada região. Fonte: a própria autora, adaptado de Google My Maps®.

## 4.2 Análise de agrotóxicos

Com a finalidade de detectar agrotóxicos nos arrozais, 500 ml de água foram coletadas dos drenos em frascos de plástico fosco em cada dia de coleta de amostras (três no AO e dois no AC) e mantidas a -20° C até o seu processamento na Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Os agrotóxicos analisados foram escolhidos com base na sua aplicação na rizicultura, na eficiência do método de extração optado, assim como a disponibilidade de padrões analíticos no laboratório em que foram realizadas as análises. Maiores detalhes quanto à classificação dos compostos analisados podem ser observados na Tabela 1. Para o desenvolvimento do método de extração, 25 ml de água ultrapura foram fortificados com 100 µg/ml de padrões analíticos da marca Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Para a extração em fase sólida foram utilizados cartuchos Welchrom BRP (Welch, Xangai, China) acoplados a um sistema a vácuo. Para isto, os cartuchos foram condicionados com 5 ml de metanol grau LC-MS (Merck, Rahway, EUA) e 5 ml de água ultrapura, seguido pela passagem de 25 ml de solução fortificada ou amostra. Para a eluição da amostra foram utilizados 2 ml de acetonitrila (ACN) grau LC-MS (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

Tabela 1 - Agrotóxicos analisados em água proveniente de arrozais, organizados de acordo com seu grupo químico

Grupo químico	Composto	Modo de ionização	Íon precursor	Íons produto
Ácido ariloxialcanóico	2,4-D	Negativo	220	162
Estrobilurina	Piraclostrobina	Positivo	388	163, 194
	Azoxistrobina	Positivo	404	372, 344
Triazol	Tebuconazol	Positivo	308	70, 125
	Ciproconazol	Positivo	292	70, 125

Fonte: a própria autora.

As amostras extraídas foram analisadas em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LCMS-8045, Shimadzu Corp., Quioto, Japão) no modo ionização por *electrospray*. Os parâmetros foram ajustados em: fluxo do gás de nebulização 2,4 l/min,

fluxo do gás de aquecimento 10 l/min, fluxo do gás de secagem 10 l/min, temperatura da interface 300 °C, temperatura do bloco de aquecimento 400 °C e temperatura da linha de dessolvatação 250 °C. A separação cromatográfica foi conduzida com uma coluna Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,9 µm; Shimadzu, Quioto, Japão), em um fluxo de 300 µl/min e mantida a 45 °C. O sistema de fase móvel foi composto por um gradiente de água com 0,1% de ácido fórmico (solução A) e acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (solução B), nas seguintes condições: 0 – 1 min 2% B; 1 – 7 min 2-100% B; 7 – 8 min 100% B; 8 – 13 min 100 – 2% B. O tempo total de corrida foi de 13 minutos. Uma solução contendo um mix de padrões analíticos foi utilizada para a realização da curva de calibração com cinco pontos (5, 10, 50, 100 e 250 ng/ml); 5 ng/ml foi considerado o limite inferior de quantificação.

#### 4.3 Coleta de amostras e identificação dos animais

Foram coletados anuros da espécie *L. luctator* de forma manual e por busca ativa no período da noite (entre 20h e 4h). Entre estes, 15 estavam localizados no AO e 24 no AC, totalizando 39 indivíduos. Animais com massa inferior a 10 g não foram incluídos no projeto devido a pouca quantidade de sangue capaz de ser extraída de forma segura.

Após a captura, os animais foram contidos fisicamente por imobilização dos membros posteriores e tórax, seguida pela aferição do comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa. Durante a contenção, os anfíbios foram fisicamente examinados e, na presença de ectoparasitos, estes foram quantificados. A coleta de sangue foi realizada pela venopunção femoral com agulhas 26G (13 mm x 0,45 mm) acopladas a seringas de 1 ml, respeitando o volume máximo de acordo com a massa do animal (Wright, 2001). Em animais em que foi possível coletar quantidades acima de 250 µl, este volume foi transferido para um microtubo contendo EDTA-K<sub>2</sub> e o restante para um microtubo sem anticoagulante. Nos casos em que a quantidade coletada foi inferior, o sangue foi inteiramente transferido para um microtubo sem anticoagulante. Para todos os indivíduos, uma pequena quantidade de amostra restante no canhão da agulha foi utilizada para a confecção de esfregaços sanguíneos sem anticoagulante. As amostras (com exceção das lâminas de esfregaço sanguíneo) foram mantidas refrigeradas até o processamento no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet) da UFRGS, em um período máximo de 6 h.

Por último foi realizada a marcação dos animais capturados (Figura 2) com tinta preta própria para tatuagem (NRC, 1974), através da aplicação intradérmica do material na região ventral do membro pélvico com agulha 30G (13 mm x 0,3 mm) a fim de evitar recapturas.

Imediatamente após os procedimentos foi realizada a soltura dos animais no mesmo local de origem.

Figura 2 – Face ventral dos membros inferiores de *L. luctator* após aplicação intradérmica do pigmento utilizado para a marcação dos indivíduos



Fonte: a própria autora.

O projeto foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), registrado sob número 42757, além de contar com autorização pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através da licença número 84735 no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

#### **4.4 Análises hematológicas e bioquímicas**

A quantidade total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi obtida através da diluição de 20 µl de sangue com anticoagulante em 4 ml de solução de Natt-Herrick (Natt; Herrick, 1952), seguida pela contagem em câmara de Neubauer na objetiva de 40x em microscópio óptico e multiplicação por fatores pré-determinados (Campbell; Grant, 2022). Capilares de vidro foram preenchidos com sangue e centrifugados (Heraeus Pico 17, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 5 minutos a 9.600 g para a determinação do volume globular (VG). O plasma resultante nos capilares foi utilizado para mensuração dos ST por refratometria. Hemoglobina foi aferida em hemoglobinômetro Hb 301 (HemoCue,

Ängelholm, Skåne, Suécia). Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e VCM foram calculados com fórmulas pré-estabelecidas (Nardini; Leopardi; Bielli, 2013).

Lâminas de esfregaço sanguíneo e de camada leucocitária foram confeccionadas utilizando sangue com anticoagulante. Esfregaços sanguíneos de amostras sem e com anticoagulante foram corados com Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e submetidos à avaliação da morfologia celular e contagem relativa de leucócitos, respectivamente, ambas em objetivas de 10x, 40x e 100x (em imersão) em microscopia óptica. Na ausência de amostra com EDTA, a distensão sanguínea realizada no momento da captura também foi utilizada para a contagem diferencial de leucócitos. A quantidade relativa de neutrófilos e linfócitos foi utilizada para calcular a relação neutrófilos:linfócitos (RNL).

Amostras de sangue total acondicionadas em tubo sem anticoagulante foram centrifugadas para a separação do soro. Proteínas totais (PT) e albumina foram quantificadas através de métodos cinéticos em um analisador bioquímico automático (CM 200, Wiener Lab., São Paulo, Brasil) utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil) baseado no método do Biureto e Verde de Bromocresol, respectivamente. A quantidade de globulinas foi obtida pela subtração da albumina do valor de PT, a qual foi utilizada para o cálculo da relação albumina:globulinas (RAB) sérica.

#### **4.5 Pesquisa direta e quantificação de hemoparasitos**

Capilares de vidro preenchidos com sangue em EDTA e centrifugados, os mesmos utilizados para a determinação do VG, também foram empregados para a realização da técnica de Woo (Woo, 1969), visando à pesquisa e diferenciação de parasitos móveis, como microfilárias e tripanossomas (Bennett, 1962). Em esfregaços de sangue total com e sem anticoagulante e esfregaços de camada leucocitária, todos corados com Wright-Giemsa, foram avaliadas a presença e morfologia de hemoparasitos em objetivas de 10x, 40x e 100x (em imersão) em microscopia óptica. Nas amostras em que protozoários intraeritrocitários foram detectados, a quantidade de eritrócitos com inclusões parasitárias (EIP) foi determinada, em triplicata, entre 1000 eritrócitos totais (Totino *et al.*, 2013) e expressos em porcentagem. Microfilárias foram contabilizadas na totalidade da lâmina (Nguiffo *et al.*, 2019), em objetiva de 10x, utilizando esfregaço sanguíneo padronizado confeccionado com 5 µl de sangue total com anticoagulante e coradas com panóptico rápido (Instant Prov, New Prov, Pinhais, Paraná, Brasil).

#### 4.6 Extração de DNA e análises moleculares

Uma alíquota de 20 µl de sangue total em EDTA-K<sub>2</sub> de cada amostra foi utilizada para a extração de DNA utilizando kit comercial (Purelink, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. No caso de animais em que não foi possível a coleta em sangue com anticoagulante, o coágulo remanescente da separação do soro foi homogeneizado vigorosamente em vórtex e em seguida as amostras foram submetidas à extração pelo mesmo protocolo para sangue total. Após o procedimento, as estimativas de concentração e pureza de DNA foram obtidas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Visando facilitar o envio e garantir a qualidade das amostras, 50 µl de DNA extraído foi pipetado em cartões (QIAcard FTA Indicating, Qiagen, Hilden, Alemanha) que empregam uma tecnologia capaz de fixar e preservar os ácidos nucleicos em temperatura ambiente. As análises moleculares a seguir foram conduzidas no *Clinical and Molecular Pathology Research Lab*, localizado na Universidade de Purdue.

Fragmentos de 1,5 mm de diâmetro de cada cartão em que as amostras foram impregnadas foram removidos com *punch* dermatológico, tratados seguindo as instruções do fabricante e utilizados como amostra. As reações de PCR convencional foram padronizadas em um volume final de 25 µl utilizando uma solução comercial composta pela mistura da enzima DNA polimerase, buffer, MgCl<sub>2</sub> e nucleotídeos (HotStarTaq Plus Master Mix, Qiagen, Hilden, Alemanha). Para cada reação, foram utilizados *primers* específicos para a amplificação de regiões conservadas do genoma de protozoários da ordem Kinetoplastida e filo Apicomplexa, nematódeos da família Onchocercidae, bactérias da família Anaplasmataceae e micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas), assim como para *Ranavirus* e uma reação pan-DNA vírus. Os dois pares de *primers* utilizados para a amplificação de bactérias da família Anaplasmataceae foram padronizados e utilizados em conjunto em uma PCR duplex. Para cada reação, um controle positivo (amostra contendo o DNA do agente alvo) e negativo (água ultrapura) foi utilizado. As sequências de *primers*, volume de cada ingrediente e condições de PCR programadas no termociclador (6331 Nexus Gradient MasterCycler, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) estão listadas no Apêndice A. Produtos de PCR foram visualizados em luz UV após eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo um corante de ácidos nucleicos na proporção de 1:10.000 (SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Os amplicons gerados foram purificados (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), agrupados em um *pool* para cada animal e submetidos ao *Purdue Genomics Core Facility* para sequenciamento de nova geração e processamento de dados. Foi utilizada a técnica *WideSeq*, uma abordagem que permite a identificação de uma ampla gama de sequências genéticas em uma única amostra. Bibliotecas geradas (Illumina DNA Prep, Illumina, San Diego, CA, EUA) foram utilizadas em aparelho Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) para gerar segmentos pareados de 250 pb. Com o auxílio do software Trimmomatic foi realizada a remoção de adaptadores e bases de baixa qualidade. Sequências resultantes com menos de 30 pb foram descartadas. Fragmentos foram alinhados e montados pelo método *de novo* em sequências maiores. Não foram analisadas as sequências não-pareadas. Em amostras positivas, as sequências resultantes foram submetidas à análise de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para comparação com outras sequências já depositadas na base de dados GenBank® (Benson *et al.*, 2013).

#### 4.7 Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares

Os esfregaços sanguíneos confeccionados no momento da coleta (sem anticoagulante) e corados com Wright-Giemsa foram utilizados para a realização do teste de frequência de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN). Para isto, 1000 eritrócitos foram avaliados em objetiva de 1000x (em imersão) por microscopia óptica. Como critério para a classificação de micronúcleos, estes deveriam estar no mesmo plano de foco, possuir a mesma intensidade de coloração e estar visivelmente separados e menores que um terço do núcleo principal (Jiraungkoorskul *et al.*, 2007). As anormalidades nucleares consideradas foram classificadas como núcleos *blebbed* (com pequena evaginação nuclear, similar ao tamanho de micronúcleos), lobados (com evaginações nucleares maiores que *blebs*, contendo certa constrição da cromatina) e fendidos (com uma fenda bem definida e de largura uniforme em direção ao centro do núcleo) (Carrasco; Tilbury; Myers, 1990). Visto que estas alterações podem possuir certa sobreposição nos formatos, elas foram reunidas em uma única variável. O resultado foi expresso na porcentagem de micronúcleos e média da porcentagem de anormalidades nucleares.

#### 4.8 Análises estatísticas

A normalidade das variáveis (hematológicas, bioquímicas, quantidade de ectoparasitos, EIP, MN e AN) foi testada pelo Teste de Shapiro-Wilk. A diferença estatística entre os grupos foi avaliada com os testes estatísticos Teste T não pareado (para dados quantitativos de distribuição normal) e Mann-Whitney (para dados quantitativos de distribuição não-normal). Como nível de significância utilizado para a rejeição da hipótese nula, foi utilizado  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 10 (GraphPah Software Inc, California, USA).

## **5 RESULTADOS**

Disponível a partir de 2026 ou no momento da publicação.

## **6 DISCUSSÃO**

Disponível a partir de 2026 ou no momento da publicação.

## **7 CONCLUSÃO**

Disponível a partir de 2026 ou no momento da publicação.

## **8 PERSPECTIVAS**

Disponível a partir de 2026 ou no momento da publicação.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, H. A. *et al.* The best practice for preparation of samples from FTA<sup>®</sup> cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 1-7, 2011.
- AL-QURAI SHY, S. *et al.* Haemogregarines and criteria for identification. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 170, 2021.
- ALLENDER, M. C.; BUNICK, D.; MITCHELL, M. A. Development and validation of TaqMan quantitative PCR for detection of Frog virus 3-like virus in eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). **Journal of Virological Methods**, v. 188, n. 1-2, p. 121-125, 2013.
- ALLISON, R. W.; VELGUTH, K. E. Appearance of granulated cells in blood films stained by automated aqueous versus methanolic Romanowsky methods. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 39, n. 1, p. 99-104, 2010.
- ALMOSNY, N. R. P. Patologia Clínica em Vertebrados Ectotérmicos. *In*: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.) **Tratado de Animais Selvagens**, 2 ed. São Paulo, Roca, 2014, p. 1597-1623.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARCAUTE, C. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222-229, 2016.
- ARIKAN, H.; CICEK, K. Hematology of amphibians and reptiles: a review. **Northwestern Journal of Zoology, Oradea**, v. 10, n. 1, p. 190-209, 2014.
- ARONZON, C. M. *et al.* Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 373-381, 2010.
- ATTADEMO, A. M. *et al.* Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 3, p. 579-584, 2012.
- AYALA, S. C. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 3, p. 433-436, 1971.

- BAIN, O. Evolutionary relationships among filarial nematodes. *In*: KLEI, T. R.; RAJAN, T. V. (Eds.) **World Class Parasites Volume 5: The Filaria**. Boston, Springer, 2002, p. 21-29.
- BARBI, A. *et al.* Widespread triazole pesticide use affects infection dynamics of a global amphibian pathogen. **Ecology Letters**, v. 26, n. 2, p. 313-322, 2023.
- BARDSLEY, J. E.; HARMSSEN, R. The trypanosomes of anura. **Advances in Parasitology**, v. 11, p. 1-73, 1973.
- BARTA, J. R.; DESSER, S. S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 3, p. 180-189, 1984.
- BARTETT, D. W. *et al.* Understanding the strobilurin fungicides. **Pesticide Outlook**, v. 12, n. 4, p. 143-148, 2001.
- BELDEN, L. K.; KIESECKER, J. M. Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercariae. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 686-688, 2005.
- BELDEN, J. *et al.* Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2477-2480, 2010.
- BENNETT, G. F. The hematocrit centrifuge for laboratory diagnosis of hematozoa. **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, n. 1, p. 124-5, 1962.
- BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 36-42, 2013.
- BERGER, L. *et al.* Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036, 1998.
- BILHALVA, L. C. *et al.* Hematologic variables of free-living *Leptodactylus luctator* with and without hemoparasites and thrombidiform mites in southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, p. 100834, 2023.
- BIOLÉ, F. G. *et al.* Parasitic infestation of intradermal chiggers *Hannemania achalai* (Acari: Leeuwenhoekiidae) on the cryptic species *Pleurodema kriegi* and *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from Sierra Grande, Córdoba, Argentina. **The Herpetological Journal**, v. 25, n. 3, p. 163-167, 2015.
- BOES, K. M. *et al.* Identification of a *Mycoplasma ovis*-like organism in a herd of farmed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in rural Indiana. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 41, n. 1, p. 77-83, 2012.

BOSIGNARI, V. Rizicultura em Santa Catarina: um panorama sobre cultura, problemas socioambientais e o PROVÁRZEAS. **Revista Discente Ofícios de Clio**, v. 5, n. 9, p. 292-302, 2020.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de Dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília, DF, p. 8. 24 de Dezembro de 2003. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa MAPA nº 2, de 3 de Janeiro de 2008. Aprova as normas de trabalho da aviação agrícola, em conformidade com os padrões técnicos operacionais e de segurança para aeronaves agrícolas, pistas de pouso, equipamentos, produtos químicos, operadores aeroagrícolas e entidades de ensino, objetivando a proteção às pessoas, bens e ao meio ambiente, por meio da redução de riscos oriundos do emprego de produtos de defesa agropecuária, e ainda os modelos constantes dos Anexos I, II, III, IV, V e VI. Brasília, DF. 8 de Janeiro de 2008.

BRASIL. Portaria MAPA nº 298, de 22 de Setembro de 2021. Estabelece regras para operação de aeronaves remotamente pilotadas destinadas à aplicação de agrotóxicos e afins, adjuvantes, fertilizantes, inoculantes, corretivos e sementes. Brasília, DF, n. 182, p. 14. 24 de Setembro de 2021. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Resumo de Registro de Agrotóxicos, Componentes e Afins. Brasília, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 30 de mar de 2024.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BRODEUR, J. C. *et al.* Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. **Ecological Indicators**, v. 112, p. 106098, 2020.

BRODKIN, M. A. *et al.* Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 26, n. 1, p. 80-84, 2007.

BROMILOW, R. H.; EVANS, A. A.; NICHOLLS, P. H. The influence of lipophilicity and formulation on the distribution of pesticides in laboratory-scale sediment/water systems. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 238-244, 2003.

BROUGHTON, C.; WEBB, K. L. Diagnostic Clinical Pathology of the Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*). **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 25, n. 3, p. 713-734, 2022.

BROWN, S. R.; FLYNN, R. W.; HOVERMAN, J. T. Perfluoroalkyl substances increase susceptibility of northern leopard frog tadpoles to trematode infection. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 689-694, 2021.

BRUNNER, J. L. *et al.* Global patterns of ranavirus detections. **Facets**, v. 6, n. 1, p. 912-924, 2021.

CABAGNA, M. C. *et al.* Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological and Environ Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 729-737, 2006.

CAMPBELL, T. W. Hematology of Amphibians. In: THRALL, M. A. *et al.* (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**, 2 ed. Ames, John Wiley & Sons, 2012, p. 313-320.

CAMPBELL, T. W.; GRANT, K. R. Hematologic Techniques for Quantitative Assessment in Reptiles and Amphibians. In: CAMPBELL, T. W.; GRANT, K. R. (Eds.). **Exotic Animal Hematology and Cytology**, 5 ed. Ames: John Wiley & Sons, 2022, p. 391-398.

CAMPBELL, T. W.; ELLIS, C.K. Peripheral Blood of Amphibians. In: CAMPBELL, T. W. (Ed.). **Exotic Animal Hematology and Cytology**, 4 ed. Ames: John Wiley & Sons, 2015, p. 89-95.

CANDIDO, M. *et al.* Genome analysis of Ranavirus frog virus 3 isolated from American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in South America. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CARVALHO, T.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162254, 2017.

CASIRAGHI, M. *et al.* A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. **Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 93-103, 2001.

CASTRO, A. P. *et al.* A planta e o grão de arroz e as formas de apresentação aos consumidores. In: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. (Eds.) **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**, Brasília, Embrapa, 2021, p. 117-146.

CASTRO, A. P.; FERREIRA, C. M.; SILVA, R. S. Arroz em sistemas sustentáveis sob pivô central. **Revista de Política Agrícola**, n. 3, p. 117-129, 2022.

CAUSEY, O. R. Aedes and Culex mosquitoes as intermediate hosts of frog filaria, *Foleyella*

sp. **American Journal of Hygiene**, v. 29, n. 2, 1939.

CHANG, A. G. *et al.* Biochemical and hematologic reference intervals for aged *Xenopus laevis* in a research colony. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 5, p. 465-470, 2015.

CHINCHAR, V. G. Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. **Archives of virology**, v. 147, p. 447-470, 2002.

CHO, J. H. *et al.* Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2551-2558, 2005.

CHRISTIN, M. S. *et al.* Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1127-1133, 2003.

CHUAMMITRI, P. *et al.* Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 129, n. 1-2, p. 126-131, 2009.

CIANCIARULLO, A. M.; SOARES, M. J.; BEÇAK, W. Erythropoiesis in the diploid and tetraploid *Odontophrynus americanus*: an evolutionary approach in these cryptic species (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Comparative Haematology International**, v. 10, p. 19-29, 2000.

COÊLHO, T. A. *et al.* Haemogregarine of genus *Dactylosoma* (Adeleorina: Dactylosomatidae) in species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from the Brazilian amazon. **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 1574-1580, 2021a.

COÊLHO, T. A. *et al.* First record of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasiting *Rhinella major* in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 2, 2021b.

COÊLHO, T. A. *et al.* Filarial nematode in the blood of *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Leptodactylidae). **Herpetology Notes**, v. 14, p. 855-857, 2021c.

COMBES, C. Parasites, biodiversity and ecosystem stability. **Biodiversity & Conservation**, v. 5, n. 8, p. 953-962, 1996.

COPPO, J. A.; MUSSART, N. B.; FIORANELLI, S. A. Blood and urine physiological values in farm-cultured *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) in Argentina. **Revista de Biologia Tropical**, v. 53, n. 3-4, p. 545-559, 2005.

CORSARO, C. *et al.* Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation. A

study on albino and pigmented *Xenopus*. **Pigment Cell Research**, v. 8, n. 5, p. 279-282, 1995.

COSTA, S. C. G.; PEREIRA, N. M. *Lankesterella alencari* n. sp., a toxoplasma-like organism in the central nervous system of Amphibia (Protozoa, Sporozoa). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 69, n. 3, p. 397-411, 1971.

COSTA, S. C. G. *et al.* The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal: the frog of the genus *Leptodactylus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 71, n. 1-2, p. 1-8, 1973.

COUTO, L. F. M. *et al.* Presence of *Trypanosoma vivax* DNA in cattle semen and reproductive tissues and related changes in sperm parameters. **Veterinary Parasitology**, v. 309, p. 109761, 2022.

CRAWSHAW, G. J. Amphibian emergency and critical care. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 1, n. 1, p. 207-231, 1998.

CRUMP, M. L.; SCOTT JR, N. J. Standard techniques for inventory and monitoring: Visual Encounter Surveys. In: HEYER, W. R. *et al.* (Eds.). **Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians**. Washington, Smithsonian Institution Press, 1994, p. 84-92.

D'BASTIANI, E.; STRUETT, M. M.; CAMPIÃO, K. M. First record of Filarial nematode in the Brazilian torrent frog *Hylodes heyeri* (Anura, Hylodidae). **Herpetology Notes**, v. 11, p. 367-368, 2018.

DAHMANI, M. *et al.* Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmatidae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 39, p. 39-45, 2015.

DAS, M.; MAHAPATRA, P. K. Hematology of wild caught Dubois's tree frog *Polypedates teraiensis*, Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

DAVIES, A. J.; JOHNSTON, M. R. L. The Biology of some Intraerythrocytic Parasites of Fishes, Amphibia and Reptiles. In: BAKER, J. R.; MULLER, R.; ROLLINSON, D. (Eds.). **Advances in Parasitology**, vol 45. London, Academic Press, 2000, p. 1-107.

DAVIS, A. K.; GOLLADAY, C. A survey of leukocyte profiles of red-backed salamanders from Mountain Lake, Virginia, and associations with host parasite types. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, p. 1743-1750, 2019.

DAVIS, T. M.; OVASKA, K. Individual recognition of amphibians: effects of toe clipping and fluorescent tagging on the salamander *Plethodon vehiculum*. **Journal of Herpetology**, p. 217-

225, 2001.

DENARDO, D. Amphibians as laboratory animals. **Ilar Journal**, v. 37, n. 4, p. 173-181, 1995.

DESQUESNES, M.; RAVEL, S.; CUNY, G. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, p. 1-6, 2002.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux**, v. 49, n. 4, p. 315-321, 1996.

DESSER, S. S.; BARTA, J. R. An intraerythrocytic virus and rickettsia of frogs from Algonquin Park, Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 8, p. 1521-1524, 1984.

DESSER, S. S.; BARTA, J. R. The morphological features of *Aegyptianella bacterifera*: an intraerythrocytic rickettsia of frogs from Corsica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 3, p. 313-318, 1989.

DESSER, S. S. *Aegyptianella ranarum* sp. n. (Rickettsiales, Anaplasmataceae): ultrastructure and prevalence in frogs from Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 1, p. 52-59, 1987.

DESSER, S. S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 152-60, 2001.

DEVIGNAT, R.; DRESSE, A. Micro-technique simple et rapide de concentration du sang en trypanosomes. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 35, n. 3, p. 315-321, 1955.

DÍAZ-PÁEZ, H. *et al.* Body distribution of *Hannemania* sp. (Acari: Leeuwenhoekiidae) in *Rhinella spinulosa*, *Pleurodema bufonina*, and *Pleurodema thaul* from Chile. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, n. 2, p. 594-600, 2016.

DIEL *et al.* Manejo do sistema de produção de arroz irrigado de base ecológica. In: ANGHINONI, I. *et al.* (Eds.) **Fundamentos, manejo e perspectivas da produção de arroz irrigado de base ecológica no Rio Grande do Sul**. Cachoeirinha, IRGA. 2020, p.13-57.

DONNELLY, M. A. *et al.* Techniques for marking amphibians. In: HEYER, W. R. *et al.* (Eds.). **Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians**. Washington, Smithsonian Institution Press, 1994, p. 277-284.

DUFFUS, A.; OLSON, D. The establishment of a global Ranavirus reporting system. **Froglog**, v. 96, p. 37, 2011.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Dados conjunturais da**

**produção de arroz (*Oryza sativa* L.) no Brasil (1986 a 2022): área, produção e rendimento.** Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2023. Disponível em: <<https://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 15 de mar de 2024.

FARIA, M. V. C. Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Eds.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente.** Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003, p. 177-209.

FAO (Food and Agriculture Organization). **FAOSTAT.** Roma, 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/>>. Acesso em: 15 de mar de 2024.

FELDHOFF, R. C. Quantitative changes in plasma albumin during bullfrog metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 733-739, 1971.

FERMINO, B. R. *et al.* The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 1-14, 2013.

FERNANDES, J. H. *et al.* Cultivo de arroz irrigado no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT**, n. 1, 2016.

FERREIRA, R. C. *et al.* Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1623-1638, 2007.

FERREIRA, J. I. G. S. *et al.* Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. **Systematic parasitology**, v. 91, n. 1, p. 63-70, 2015.

FERREIRA, D. A. R. *et al.* Molecular detection of Apicomplexan hemoparasites in anurans from Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, n. 10, p. 3469-3479, 2020.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. Chytrid fungi and global amphibian declines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 332-343, 2020.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 291-310, 2009.

FLANDERS, A. J. *et al.* Presumptive heterophil extracellular traps recognized cytologically in nine reptile patients with inflammatory conditions. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 89-96, 2021.

FONSECA, M. G.; REYNOLDS, A. M. **Parasitas Sanguíneos de Anfíbios**. Teresina, Edufpi. 2021, 77 p.

FORSON, D. D.; STORFER, A. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Ecological Applications**, v. 16, n. 6, p. 2325-2332, 2006.

FORZÁN, M. J. *et al.* Hematologic reference intervals for *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) and effect of infection with Frog Virus 3 (*Ranavirus* sp., Iridoviridae). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 430-443, 2016.

FORZÁN, M. J. *et al.* Clinical pathology of amphibians: A review. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 46, n. 1, p. 11-33, 2017.

FORZÁN, M. J.; HORNEY, B. S. Amphibians. In: HEATLEY, J. J., RUSSEL, K. E. (Eds.) **Exotic Animal Laboratory Diagnosis**. Hoboken, Wiley Blackwell, 2020, p. 347-368.

FRIEDRICHS, K. R. *et al.* ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 41, n. 4, p. 441-453, 2012.

FRANCO-BELUSSI, L. *et al.* Hematological parameters of a Neotropical wild frog population, with a phylogenetic perspective on blood cell composition in Anura. **Current Zoology**, v. 68, n. 3, p. 361-369, 2022.

FREITAS, J. S. *et al.* Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA<sup>®</sup> 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109446, 2019.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.1. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2024. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>>. Acesso em: 25 de mai de 2024.

GALLI, L. *et al.* *Ranavirus* detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 78-82, 2006.

GALLONE, A. *et al.* Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system?. **Pigment Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 32-40, 2002.

GARCÊS, A.; PIRES, I.; RODRIGUES, P. Teratological effects of pesticides in vertebrates: A review. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 1, p. 75-89, 2019.

GARCIA, H. A. *et al.* Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants.

**International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 13-14, p. 1385-1396, 2011.

GARCIA-RUBIO, R.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. **Drugs**, v. 77, n. 6, p. 599-613, 2017.

GAVEL, M. J. *et al.* Effects of two pesticides on northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) stress metrics: blood cell profiles and corticosterone concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 235, p. 105820, 2021.

GILBERTSON, M. K. *et al.* Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 22, n. 1, p. 101-110, 2003.

GINNAN, N. A. *et al.* Toe clipping does not affect the survival of leopard frogs (*Rana pipiens*). **Copeia**, v. 2014, n. 4, p. 650-653, 2014.

GLINSKI, D. A. *et al.* Effect of hydration status on pesticide uptake in anurans following exposure to contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 16192-16201, 2018.

GOLDBERG, S. S. *et al.* Release of lipopolysaccharide (LPS) from cell surface of *Trypanosoma cruzi* by EDTA. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 1983.

GONZÁLEZ, L. P. *et al.* Do blood parasites increase immature erythrocytes and mitosis in amphibians?. **Revista de Biología Tropical**, v. 69, n. 2, p. 615-625, 2021.

GRAFE, T. U. *et al.* Putting toe clipping into perspective: a viable method for marking anurans. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2011.

GRANOFF, A.; CAME, P. E.; RAFFERTY, K. A. The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 126, n. 1, p. 237-255, 1965.

GRAY, M. J.; MILLER, D. L.; HOVERMAN, J. T. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 87, n. 3, p. 243-266, 2009.

GREER, A. L. *et al.* Guidelines for the safe use of disposable gloves with amphibian larvae in light of pathogens and possible toxic effects. **Herpetological Review**, v. 40, p. 145-147, 2009.

GROPPELLI, S. *et al.* Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: craniofacial defects. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 4, p. 370-381, 2005.

GRUBY, M. Recherches et observations sur une nouvelle espe`ce d'he´matozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Se´ances de l'Acade´mie des Sciences**, v. 55, p. 1134–1136, 1843.

GRUIA-GRAY, J; PETRIC, M; DESSER, S. S. Ultrastructural, biochemical and biophysical properties of an erythrocytic virus of frogs from Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 4, p. 497-506, 1989.

GRUIA-GRAY, J.; DESSER, S. S. Cytopathological observations and epizootiology of frog erythrocytic virus in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 1, p. 34-41, 1992.

GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; FILHO, M. P. B. Como a Planta de Arroz se Desenvolve. **Arquivo do Agrônomo**, n.13, 2002.

GYIMESI, Z. S.; HOWERTH, E. W. Severe melanomacrophage hyperplasia in a crocodile lizard, *Shinisaurus crocodilurus*: a review of melanomacrophages in ectotherms. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 2004.

HANLEY, C. S. *et al.* Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 3, p. 328-332, 2004.

HANSON, L. A. *et al.* A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. **Virology Journal**, v. 3, p. 1-10, 2006.

HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HEATLEY, J. J.; JOHNSON, M. Clinical technique: Amphibian Hematology: A practitioner's guide. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 18, n. 1, p. 14–19, 2009.

HEATLEY, J. J.; RUSSEL, K. E. Hematology. In: DIVERS, S. J., STAHL, S. J. (Eds.). **Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery**, 3 ed. Saint Louis, Elsevier, 2019, p. 301-318.

HELMER, P. J.; WHITESIDE, D. P. Amphibian anatomy and physiology. In: O'MALLEY, B. (Ed.). **Clinical anatomy and physiology of exotic species**. Philadelphia, Elviesier Saunders, 2005. p. 3-14.

HENRIQUE, R. S. **Ecologia do movimento da rã-manteiga (*Leptodactylus latrans*) e da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 86, 2016.

HOARE, C. A. et al. Studies on *Trypanosoma grayi*. 2. Experimental Transmission to the Crocodile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 1, 1929.

HOARE, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. **The Journal of Protozoology**, v. 11, n. 2, p. 200-207, 1964.

HOPKINS, A. P.; HOVERMAN, J. T. Strobilurin fungicide increases the susceptibility of amphibian larvae to trematode infections. **Aquatic Toxicology**, p. 106864, 2024.

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36-51, 2011.

HYATT, A. D. et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.

IHEDIOHA, J. I.; OCHIOGU, I. S.; IHEDIOHA, T. E. Co-administration of Na-EDTA and diminazene aceturate (DA) to mice infected with DA-resistant *Trypanosoma brucei*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 2-3, p. 206-211, 2007.

IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Farroupilha, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, 2018, 205p.

ISAAK-DELGADO, A. B. et al. Morphological and molecular characteristics of hemoparasites in Vaillant's frogs (*Lithobates vaillanti*). **Parasitology Research**, v. 119, p. 1891-1901, 2020.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). The Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 21 de ago de 2023.

JANTAWONGSRI, K. et al. Altered immune response of the rice frog *Fejervarya limnocharis* living in agricultural area with intensive herbicide utilization at Nan Province, Thailand. **EnvironmentAsia**, v. 8, n. 1, 2015.

JAYAWARDENA, U. A. et al. Heavy metal mediated innate immune responses of the Indian green frog, *Euphlyctis hexadactylus* (Anura: Ranidae): Cellular profiles and associated Th1 skewed cytokine response. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 1194-1204, 2016.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 56-63, 2007.

JOHNSON, R. N.; YOUNG, D. G.; BUTLER, J. F. Trypanosome transmission by *Corethrella*

*wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 5, p. 918-921, 1993.

JOHNSRUDE, J. D. *et al.* Intraerythrocytic inclusions associated with iridoviral infection in a fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake. **Veterinary pathology**, v. 34, n. 3, p. 235-238, 1997.

JORDAAN, B. J.; PREEZ, L. H.; NETHERLANDS, E. C. Taxonomic re-evaluation of African anuran trypanosomes with the redescription and molecular diagnosis of *Trypanosoma (Trypanosoma) nelspruitense* Laveran, 1904 and *Trypanosoma (Haematomonas) grandicolor* Pienaar, 1962. **Parasitology**, v. 150, n. 6, p. 477-487, 2023.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2000, 368p.

JOSENDE, M. E. *et al.* Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015.

KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZKO, D. B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1, 1976.

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9900-9904, 2002.

KLAPHAKE, E. Bacterial and parasitic diseases of amphibians. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 597-608, 2009.

KOPRIVNIKAR, J.; REDFERN, J. C. Agricultural effects on amphibian parasitism: Importance of general habitat perturbations and parasite life cycles. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 4, p. 925-936, 2012.

LABBÉ, A. **Sporozoa**. Berlin, R. Friedlander und Sohn, 1899, 180p.

LAFONTE, B. E.; JOHNSON, P. T. J. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 19, p. 3700-3708, 2013.

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

LAJMANOVICH, R. C. *et al.* Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-12, 2015.

LANGERVELD, A. J. *et al.* Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. **Environmental Research**, v. 109, n. 4, p. 379-389, 2009.

LEAL, D. D. M. *et al.* Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States- Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 81, n. 2, p. 199-206, 2009.

LEIVE, L. Actinomycin sensitivity in *Escherichia coli* produced by EDTA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 18, n. 1, p. 13-17, 1965a.

LEIVE, L. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 53, n. 4, p. 745-750, 1965b.

LEMCKERT, F. Effects of toe-clipping on the survival and behaviour of the Australian frog *Crinia signifera*. **Amphibia-Reptilia**, v. 17, n. 3, p. 287-290, 1996.

LI, D. *et al.* Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 868-874, 2016.

LINDNER, M.; MEDEIROS, R. M. V. Agricultura orgânica em assentamentos rurais: a produção de arroz na região metropolitana de Porto Alegre-RS. **Caderno de Geografia**, v. 33, n. 1, p. 400-409, 2023.

LINZEY, D. *et al.* Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, n. 2, p. 125-148, 2003.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.

LUEDTKE, J. A. *et al.* Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, v. 622, n. 7982, p. 308-314, 2023.

MACHADO, I. F.; MALTCHIK, L. Can management practices in rice fields contribute to amphibian conservation in southern Brazilian wetlands?. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 20, n. 1, p. 39-46, 2010.

MACKENZIE, K. Parasites as indicators of environmental change and pollution in marine ecosystems. **Qatar University Science Journal**, v. 19, 1999.

MACKERRAS, M. J.; MACKERRAS, I. M. The Haematozoa of Australian frogs and fish. **Australian Journal of Zoology**, v. 9, n. 1, p. 123-139, 1961.

MAGALHÃES, F. M. *et al.* Taxonomic review of South American Butter Frogs: Phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). **Herpetological Monographs**, v. 34, n. 1, p. 131-177, 2020.

MALTCHIK, L. *et al.* Can rice field channels contribute to biodiversity conservation in Southern Brazilian wetlands?. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 4, p. 1895-1914, 2011.

MANEYRO, R. *et al.* Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. **Iheringia, Série Zoologia**. v. 94, n. 1, p. 57–61, 2004.

MANWELL, R. D. The genus *Dactylosoma*. **The Journal of Protozoology**, v. 11, n. 4, p. 526-530, 1964.

MAO, J.; HEDRICK, R. P.; CHINCHAR, V. G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. **Virology**, v. 229, n. 1, p. 212-220, 1997.

MARTEL, A. *et al.* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 38, p. 15325-15329, 2013.

MARTIN, D. S.; DESSER, S. S. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. **Parasitology Research**, v. 77, n. 1, p. 18-26, 1991.

MARTIN, D. S. *et al.* Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18s rRNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 566-571, 2002.

MARTOF, B. S. Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. **Ecology**, v. 34, n. 1, p. 165-174, 1953.

MAY, R. M. Ethics and amphibians. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 403-403, 2004.

MAZZONI, R. *et al.* Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. **Diseases of aquatic organisms**, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.

MCALLISTER, C. T. *et al.* Hemoparasites (Apicomplexa: Hepatozoon; Kinetoplastida:

Trypanosoma) of Green Frogs, *Rana clamitans* (Anura: Ranidae) from Arkansas. **Journal of the Arkansas Academy of Science**, v. 74, n. 1, p. 37-40, 2020.

MCKENZIE, V. J.; STARKS, H. A. Blood parasites of two Costa Rican amphibians with comments on detection and microfilaria density associated with adult filarial worm intensity. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 824-829, 2008.

MEDKOUR, H. *et al.* New molecular approach for the detection of Kinetoplastida parasites of medical and veterinary interest. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 356, 2020.

MENDOZA-ROLDAN, J. *et al.* Mites and ticks of reptiles and amphibians in Brazil. **Acta Tropica**, v. 208, p. 105515, 2020.

MILLER, D.; GRAY, M.; STORFER, A. Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. **Viruses**, v. 3, n. 11, p. 2351-2373, 2011.

MOORE, I. T.; JESSOP, T. S. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 39-47, 2003.

MORAES, M. F. D. *et al.* Resposta do arroz em casa de vegetação a fontes de micronutrientes de diferentes granulometria e solubilidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 611-614, 2004.

MOREIRA, L. F. B.; KNAUTH, D. S.; MALTCHIK, L. Checklist of amphibians in a rice paddy area in the Uruguayan savanna, southern Brazil. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1014-1019, 2014.

MOREIRA, L. F. B.; MALTCHIK, L. Does organic agriculture benefit anuran diversity in rice fields?. **Wetlands**, v. 34, p. 725-733, 2014.

MÜLLER, K.; BRUNNBERG, L. Determination of plasma albumin concentration in healthy and diseased turtles: a comparison of protein electrophoresis and the bromocresol green dye-binding method. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 39, p. 79-82, 2010.

MUNRO, I. C. *et al.* A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2, 4-D. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 559-664, 1992.

NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 1-30, 2013.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

NERY, I. B. D.; CELLA, D. Arroz: uma descrição do mercado. **Revista Interface Tecnológica**, v. 19, n.2, p. 549-560, 2022.

NETHERLANDS, E. C. *et al.* Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 1, p. 135-141, 2015.

NETHERLANDS, E. C. *et al.* An overview of the Dactylosomatidae (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma kermi* n. sp. parasitising *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys gutturalis* from South Africa. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 11, p. 246-260, 2020.

NETO, A. A. O. **A cultura do arroz**. Brasília, Conab, 2015, 180p.

NEUMANN, A.; BROGDEN, G.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. Extracellular traps: an ancient weapon of multiple kingdoms. **Biology**, v. 9, n. 2, p. 34, 2020.

NEVES, P. V. *et al.* Use of polyclonal antibodies, electron microscopy and histopathology to detect iridovirus-like particles in bullfrogs. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 523-531, 2016.

NGUIFFO, D. N. *et al.* Microfilariae infestation of goliath frogs (*Conraua goliath*) from Cameroon. **Plos One**, v. 14, n. 5, p. e0217539, 2019.

NRC (National Research Council). Records and Information Control. In: **Amphibians: Guidelines for the Breeding, Care, and Management of Laboratory Animals**. Washington, National Academy Press, 1974, p. 108-114.

O'DONOGHUE, P. Haemoprotozoa: making biological sense of molecular phylogenies. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 3, p. 241-256, 2017.

OIE (Office International des Epizooties). Diseases listed by the OIE. **Aquatic Animal Health Code**, Paris, 2022. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access>>. Acesso em: 11 de abr de 2023.

OLIVEIRA, E. *et al.* New anuran amphibian host for *Hemolivia* sp. (Adeleorina: Karyolysidae) in the Neotropical region. **Annals of Parasitology**, v. 66, n. 4, 2020.

OLSON, D. H.; RONNENBERG, K. L. Global Bd mapping project: 2014 update. **FrogLog**, v. 22, p. 17-21, 2014.

PAPERNA, I.; MARTIN, C. The development and fine structure of *Lankesterella* cf. *dicroglossi* (Apicomplexa: Lankesterellidae) infecting frogs in Niger, West Africa. **Folia Parasitologica**, v. 48, n. 3, p. 178-186, 2001.

PAPERNA, I.; MATOS, A. P. A. Erythrocytic viral infections of lizards and frogs: New hosts, geographical locations and description of the infection process. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 68, n. 1, p. 11-23, 1993.

PAPERNA, I. *et al.* *Lankesterella poeppigii* n. sp. (Apicomplexa, Lankesterellidae) de *Bufo poeppigii* (Tschudi, 1845) del Perú. **Revista Peruana de Biología**, v. 16, n. 2, p. 165-168, 2009.

PARKER-GRAHAM, C.; CLAYTON, L. A.; MANGUS, L. M. Amphibian renal disease. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 215-230, 2020.

PASMANS, F.; MARTEL, A. Amphibian Taxonomy, Anatomy and Physiology. In: DIVERS, S. J.; STAHL, S. J. (Eds.). **Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery**, 3 ed. Saint Louis, Elsevier, 2019, p. 86-89.

PAULA, S. R. L. **Orizicultura: principais características atuais**. Biblioteca digital, BNDES, 2008, 6p.

PEREIRA, J. A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2002, 226p.

PERNAK, J. *et al.* Known triazole fungicides—a new trick. **RSC Advances**, v. 5, n. 13, p. 9695-9702, 2015.

PERRY, G. *et al.* Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 4, p. 547-555, 2011.

PESSIER, Allan P. Amphibians. In: SHARKEY, L. C.; RADIN, M. J.; SEELIG, D. (Eds.). **Veterinary Cytology**, Hoboken, John Wiley & Sons, 2021, p. 869-875.

PINHEIRO, S. N. *et al.* Alternative primers to identify a range of apicomplexan parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 175, p. 105985, 2020.

PINHO, S. R. *et al.* Effects of the habitat on anuran blood parasites in the Eastern Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

PINTO-VIDAL, F. A. *et al.* Metabolic, immunologic, and histopathologic responses on premetamorphic American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) following exposure to lithium and selenium. **Environmental Pollution**, v. 270, p. 116086, 2021.

POLLO, F. E. *et al.* 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**, v. 24, p. 18179-18187, 2017.

POLLO, F. *et al.* Hemoparasites do not affect life-history traits and cellular immune response in treefrog hosts *Boana cordobae*. **Animals**, v. 13, n. 22, p. 3566, 2023.

PREISS, P. V. As dimensões do conhecimento agroecológico: a experiência dos agricultores familiares assentados em Viamão, RS. **Redes**, v. 25, n. 1, p. 104-134, 2020.

PROENÇA, D. N. *et al.* Characterization of the skin cultivable microbiota composition of the frog *Pelophylax perezii* inhabiting different environments. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2585, 2021.

QUARLES, W. Pesticides and amphibian decline. **Common Sense Pest Control**, v. 29, p. 1-20, 2015.

RAMAKRISHNAN, M. A. *et al.* The feasibility of using high resolution genome sequencing of influenza A viruses to detect mixed infections and quasispecies. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7105, 2009.

RENZO, F. *et al.* Is the amphibian *X. laevis* WEC a good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of the three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 220-226, 2011.

RODRIGUES, A. F. S. F. *et al.* Morphological and morphometric characterization of trypanosomes in *Leptodactylus lineatus* and *Osteocephalus* sp. (Anura) from Brazilian Midwest. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2019.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 56, n. 3, p. 442-448, 2003.

ROHR, J. R. *et al.* Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1772, p. 20131502, 2013.

ROMAN, D. L. *et al.* Effects of triazole fungicides on soil microbiota and on the activities of enzymes found in soil: A review. **Agriculture**, v. 11, n. 9, p. 893, 2021.

RUGGERI, J. *et al.* Discovery of wild amphibians infected with *Ranavirus* in Brazil. **Journal of wildlife diseases**, v. 55, n. 4, p. 897-902, 2019.

RUMSCHLAG, S. L. *et al.* Effects of pesticides on exposure and susceptibility to parasites can be generalised to pesticide class and type in aquatic communities. **Ecology letters**, v. 22, n. 6, p. 962-972, 2019.

RUSSO, A. G. *et al.* Discovery of novel viruses associated with the invasive cane toad (*Rhinella*

*marina*) in its native and introduced ranges. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 733631, 2021.

SALAKIJ, C. *et al.* Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, p. 116-126, 2002.

SALLA, R. F. *et al.* Differential liver histopathological responses to amphibian chytrid infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 142, p. 177-187, 2020.

SAMOJEDEN, C. G. *et al.* Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 11926, 2022.

SANCHOLLE, M.; WEETE, J. D.; MONTANI, C. Effects of triazoles on fungi: I. Growth and cellular permeability. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 21, n. 1, p. 31-44, 1984.

SANTOS, F. M. *et al.* Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0201357, 2018.

SCHEELE, B. C. *et al.* Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459-1463, 2019.

SEGALLA, M. V. *et al.* List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n.1, p. 121-216, 2021.

SILVA, J. B. *et al.* First detection of *Trypanosoma vivax* in dairy cattle from the northwest region of Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, p. 153-159, 2023.

SILVA, M. B. D. *et al.* Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 7, p. 1-11, 2020.

SILVA-DE LA FUENTE, M. C. *et al.* Review of the genus **Hannemania** (Acari: Leeuwenhoeekiidae) with description the two new species in amphibians from Chile. **Zootaxa**, v. 4200, n. 4, p. 580-590, 2016.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 79-86, 2005.

SLADKY, K. K.; NORTON, T. M.; LOOMIS, M. R. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in canyon tree frogs (*Hyla arenicolor*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 4, p. 570-575, 2000.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA<sup>®</sup> databasing paper. **BMC ecology**, v. 4, p. 1-11, 2004.

SOLÉ, M. *et al.* Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 2, p. 9–15, 2009.

SOUSA, I. S. F.; FERREIRA, C. M. Aspectos histórico-culturais do arroz e do feijão na sociedade brasileira. In: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. (Eds.) **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**, Brasília, Embrapa, 2021, p. 47-70.

SOUSA, M. A.; WEIGL, D. R. The viral nature of *Toddia Franca*, 1912. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 74, p. 213-230, 1976.

SPAGNOLO, V. *et al.* Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 1, p. 82-87, 2006.

SPODAREVA, V. V. *et al.* Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1-12, 2018.

STACY, N. I. *et al.* Whip-like heterophil projections in consecutive blood films from an injured gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) with systemic inflammation. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 162-165, 2017.

STACY, N. I.; RANLY, M.; PELTON, C. What is your diagnosis? Blood film from a Green turtle (*Chelonia mydas*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 193-194, 2017.

STEINEL, N. C.; BOLNICK, D. I. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 283198, 2017.

STEINMETZ, S.; BRAGA, H. J. Zoneamento de arroz irrigado por épocas de semeadura nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 429-438, 2001.

STUART, S. N. *et al.* Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

TEJEDOR-JUNCO, M. T. *et al.* Comparison between micro-hematocrit centrifugation technique and polymerase chain reaction (PCR) to detect *Trypanosoma evansi* in experimentally inoculated goats. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 1, p. 70-72, 2011.

TOTINO, P. R. R. *et al.* Apoptosis of non-parasitised red blood cells in *Plasmodium yoelii*

malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 686-690, 2013.

UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670-672, 2004.

ÚNGARI, L. P. *et al.* A new species, *Dactylosoma piperis* n. sp. (Apicomplexa, Dactylosomatidae), from the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae) from Mato Grosso State, Brazil. **Parasite**, v. 27, n. 73, 2020.

ÚNGARI, L. P. *et al.* New insights on the diversity of Brazilian anuran blood parasites: With the description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) from Leptodactylidae anurans. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 14, p. 190-201, 2021.

ÚNGARI, L. P. *et al.* Diversity of haemogregarine parasites infecting Brazilian anurans, with a description of new species of *Dactylosoma* (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae). **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 4, p. 1740-1755, 2022.

USDA. Marketing and Use of Rice. **Rice Sector at a Glance**, USA, 2024. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/topics/crops/rice/rice-sector-at-a-glance/>>. Acesso em: 08 de março de 2024.

VAN METER, R. J. *et al.* Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. **Environmental Pollution**, v. 193, p. 262-268, 2014.

VAN METER, R. J. *et al.* Agrochemical mixtures and amphibians: the combined effects of pesticides and fertilizer on stress, acetylcholinesterase activity, and bioaccumulation in a terrestrial environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1052-1061, 2019.

VILLAGRA-BLANCO, R. *et al.* Bovine polymorphonuclear neutrophils cast neutrophil extracellular traps against the abortive parasite *Neospora caninum*. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 235184, 2017.

VIOLA, L. B. *et al.* Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 55-65, 2009.

VOYLES, J. *et al.* Pathophysiology in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) during a chytridiomycosis outbreak. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35374, 2012.

WANDER, A. E.; SILVA, O. F.; FERREIRA, C. M. O arroz e o feijão no Brasil e no mundo. In: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. (Eds.) **Arroz e feijão: tradição e segurança**

**alimentar**, Brasília, Embrapa, 2021, p. 81-100.

WELLEHAN JR, J. F. X. *et al.* Characterization of an erythrocytic virus in the family Iridoviridae from a peninsula ribbon snake (*Thamnophis sauritus sackenii*). **Veterinary microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 115-122, 2008.

WELSH, H. H.; JR OLLIVIER, L. M. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's Redwoods. **Ecological Applications**. v.8, p.1118-1132, 1998.

WERNER, J. K. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. **The Journal of parasitology**, p. 356-363, 1993.

WILSON, S. *et al.* Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught *Xenopus laevis*. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 635-640, 2011.

WONGSATHUAYTHONG, S. Detection of microfilariae in peripheral blood of monkeys by the microcapillary technique. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 10, p. 255-257, 1961.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, v. 47, n. 5, p. 921-923, 1969.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v. 27, n. 4, p. 384-6, 1970.

WOO, P. T. K.; ROGERS, D. J. A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 319-326, 1974.

WOO, P. T. K. Sensitivity of diagnostic techniques in determining the prevalence of anuran trypanosomes. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 19, n. 1, p. 24-26, 1983.

WRIGHT, K. Amphibian hematology. In: WRIGHT, K.; WHITAKER, B. (Eds). **Amphibian medicine and captive husbandry**. Malabar, Krieger Publishing, 2001, p. 129–146.

WRUBLESWSKI, J. *et al.* Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 360-368, 2018.

WU, S. *et al.* Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to *Xenopus tropicalis* embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 8-15, 2018.

YIN, X. H. *et al.* Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/Genetic**

**Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 680, n. 1-2, p. 2-6, 2009.

YOUNG, B. E. *et al.* **Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians**. Arlington, NatureServe, 2004, 60p.

YOUNG, S. *et al.* Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 478-492, 2012.

YUAN, D.; SHEN, V. Stability of ribosomal and transfer ribonucleic acid in *Escherichia coli* B/r after treatment with ethylenedinitrilotetraacetic acid and rifampicin. **Journal of Bacteriology**, v. 122, n. 2, p. 425-432, 1975.

ZAMORA-CAMACHO, F. J. *et al.* The effect of toe-clipping on locomotor performance and return rates in a frog. **South American Journal of Herpetology**, v. 28, n. 1, p. 38-46, 2023.

ZANG M. *et al.* Fundamentos e transição para a produção de base ecológica. *In*: ANGHINONI, I. *et al.* (Eds.) **Fundamentos, manejo e perspectivas da produção de arroz irrigado de base ecológica no Rio Grande do Sul**. Cachoeirinha, IRGA. 2020, p.11-12.

ZHANG, C. *et al.* Ecotoxicology of strobilurin fungicides. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140611, 2020.

ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. Proposal to transfer ‘*Aegyptianella ranarum*’, an intracellular bacterium of frog red blood cells, to the family Flavobacteriaceae as ‘*Candidatus Hemobacterium ranarum*’ comb. nov. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 568-573, 2004.

ZHANG, W. *et al.* Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. **Aquatic Toxicology**, v. 208, p. 62-70, 2019.

ZHELEV, Z. M.; POPGEORGIEV, G. S.; MEHTEROV, N. H. Haematological parameters of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from the region of the lead and zinc plant “Kardzhali” (South Bulgaria) and their use in the environmental quality assessment. **Acta Zoologica Bulgarica**. v. 67, n. 2, p. 271–282, 2015.

ZUASTI, A. *et al.* Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**, v. 2, n. 2, p. 93-99, 1989.

## APÊNDICE A – *Primers* e condições de PCR

As tabelas a seguir se referem à lista de *primers* (Tabela 1), assim como os volumes de reagentes (Tabela 2) e condições programadas no termociclador (Tabela 3) para as reações em cadeia da polimerase (PCR) realizadas no estudo.

Tabela 1 – Lista de *primers* empregados no estudo, com os genes alvo e descrição da sequência

Alvo		<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Referência
Kinetoplastida rDNA LSU	28S	F2	ACCAAGGAGTCAAACAGACG	Medkour <i>et al.</i> , 2020
		R2	GTTGGCACGAAATCCTTCC	
Kinetoplastida ITS1		TRYP1R	GGAAGCCAAGTCATCCATCG	Desquesnes; Ravel; Cuny, 2002
		TRYP1S	CGTCCCTGCCATTTGTACACAC	
Apicomplexa rDNA	18S	APICO_F	CCAGTAGTCATATGCTTGTC	Pinheiro <i>et al.</i> , 2020
		APICO_R	ATCTAAGAATTTACCTCTGAC	
		APICO_NESTED_ R	CAGACTTGCCCTCCAATTG	
Hepatozoon rDNA	18S	Hep300	GTTTCTGACCTATCAGCTTTTCGACG	Ujvari; Madsen; Olsson, 2004
		Hep900	CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC	
Onchocercidae COX1		COIntF	TGATTGGTGGTTTTGGTAA	Casiraghi <i>et al.</i> , 2001
		COIntR	ATAAGTACGAGTATCAATATC	
Anaplasmataceae rDNA	16S	P16SF	CAAGCTTAACACATGCAAGTC	Zhang; Rikihisa, 2004
		P16SR	TACGCCAATAATTCGAACAAC	
Anaplasmataceae rDNA	23S	Ana23S-212f	ATAAGCTGCGGGGAGTTGTC	Dahmani <i>et al.</i> , 2015
		Ana23S-753r	TGCAAAAGGTACGCTGTCAC	
Hemoplasma rDNA	16S	CA776F	AGCAAATGGGATTAGATACC	Boes <i>et al.</i> , 2012
		KRv	ATCGCTGGTTTGTAACACAT	
Ranavirus MCP		MCP 4F	GACTTGGCCACTTATGAC	Mao; Hedrick; Chinchar, 1997
		MCP 4R	GTCTCTGGAGAAGAAGAA	
DNA Virus Polymerase	DNA	Cons lower	CCCGAATTCAGATCTCNGTRTCNCCR TA	Hanson <i>et al.</i> , 2006
		HV	CGGAATTCTAGAYTTYGCNWSNYTN TAYCC	

Tabela 2 – Quantidades de reagentes (expressos em µl) utilizados para cada PCR (volume final de 25 µl) realizada no estudo

Alvo	Master mix	<i>Primer</i> *	Água	Amostra**
------	------------	-----------------	------	-----------

Kinetoplastida 28S LSU	12,5	2,5	5	2,5
Kinetoplastida ITS1	12,5	5	0	2,5
Apicomplexa 18S	12,5	2,5	5	2,5
Hepatozoon 18S	12,5	2,5	5	2,5
Onchocercidae COX1	12,5	1,25	7,5	2,5
Anaplasmatataceae 16S + 23S	12,5	1,25	5	2,5
Hemoplasma 16S	12,5	1,25	7,5	2,5
Ranavirus MCP	12,5	2,5	5	2,5
DNA Virus DNA Polymerase	12,5	2,5	5	2,5

\* Quantidade final utilizada de cada primer em uma concentração de 10  $\mu$ M

\*\* Quantidade utilizada para os controles positivo e negativo; para as amostras do estudo, este volume foi convertido em fragmentos de FTA card de 1,5 mm

Fonte: a própria autora.

Tabela 3 – Condições de temperatura e tempo programadas no termociclador para cada PCR realizada no estudo

Alvo	Ativação da enzima		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Ciclos	Extensão final	
	°C	min	°C	s	°C	s	°C	s		°C	min
Kinetoplastida 28S rDNA LSU	95	10	95	60	53	30	72	60	40	72	10
Kinetoplastida ITS1	95	10	94	30	55	30	42	30	35	72	10
Apicomplexa 18S rDNA	95	10	95	50	56	60	72	90	35	72	10
Hepatozoon 18S	95	10	95	60	53	60	72	90	35	72	10
Onchocercidae COX1	95	10	94	45	52	45	72	90	40	72	10
Anaplasmatataceae 16S + 23S rDNA	95	10	94	60	55	60	72	120	35	72	7
Hemoplasma 16S rDNA	95	10	94	60	54	60	72	60	35	72	10
Ranavirus MCP	95	10	95	45	48	45	72	45	35	72	5
DNA Virus DNA Polymerase	95	10	93	30	56	120	72	180	35	72	4

Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE B** – Artigo científico

Disponível a partir de 2026 ou no momento da publicação.