



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

Avaliação dos efeitos de perturbações antrópicas no perfil leucocitário de anuros

Patrício Getúlio Garcia Neto

SÃO LUIS/MA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

Avaliação dos efeitos de perturbações antrópicas no perfil leucocitário de anuros

Orientado(a): Patrício Getúlio Garcia Neto

Orientador(a): Gilda Vasconcellos de Andrade

Co-orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra

SÃO LUIS/MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Garcia Neto, Patrício Getúlio.

Avaliação dos efeitos de perturbações antrópicas no perfil leucocitário de anuros / Patrício Getúlio Garcia Neto. - 2018.
25 f.

Coorientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Orientador(a): Gilda Vasconcellos de Andrade.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Amphibia. 2. Imunofisiologia. 3. Leucócitos. 4. Stress. I. Andrade, Gilda Vasconcellos de. II. Guerra, Rosane Nassar Meireles. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pois sem seus esforços diários para que nada me faltasse durante toda minha vida eu não teria alcançado onde estou hoje. Eles são meus maiores exemplos de vida, de superação e dedicação a tudo aquilo que fazem, sempre dando o melhor possível para atingirem seus objetivos. E seguindo o exemplo deles eu dei o meu máximo para realizar este trabalho. Também sou extremamente grato aos meus queridos irmãos, Isaac e Isadora, que são fontes de inspiração para que em momentos difíceis eu me mantenha firme e dê o meu melhor para alcançar meus objetivos, pois um dos deveres de um irmão mais velho é servir de exemplo para os mais novos.

Existe uma extensa lista de pessoas, eventos e até mesmo animais aos quais eu deveria citar um por um, pois cada qual teve uma enorme contribuição neste trabalho ao seu próprio modo. Como seres humanos somos seres sociais e muito de quem somos resulta das nossas experiências diárias. Por isso o melhor que posso dizer aqui é que sou grato a tudo e a todos que tornaram a realização deste trabalho possível. Sinto muito não fazer jus a cada um de vocês nesta sessão, mas as experiências que tive ao longo do tempo na graduação sempre estarão comigo.

Agradeço ao PIBIC/CNPq pela bolsa concedida durante o processo de realização deste trabalho. E agradeço também ao SISBIO pela liberação da licença de coleta e à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA por conceder o certificado para a utilização dos animais capturados neste trabalho. Agradeço à FAPEMA pelo auxílio financeiro à orientadora Gilda V. Andrade (processo CBIOMA-03782/15) e também a Quercegen Agronegócios I LTDA pela permissão de trabalho de campo no sítio Aguahy e pelo apoio logístico.

RESUMO

Os anfíbios estão entre os grupos de vertebrados mais sensíveis a modificações ambientais por conta da dependência de muitas de suas espécies de um ambiente aquático para se reproduzirem, especialmente em regiões tropicais. Impactos ambientais podem causar sérios problemas para populações de anfíbios anuros e isso pode ser analisado dentro de uma perspectiva fisiológica. Para os vertebrados a resposta a um evento estressante é feita pela ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, que controla a liberação e secreção dos hormônios glicocorticoides, responsáveis por regularem em vários níveis a resposta ao estressor. Um de seus efeitos é garantir que leucócitos se mobilizem rapidamente para combater qualquer agente infeccioso que adentre no organismo durante o período de estresse. No entanto, essa resposta imune pode ser comprometida caso as condições desfavoráveis no ambiente permaneçam por um período além do que seria necessário para uma resposta imune aguda. Tendo em mente tal desregulação, o objetivo deste trabalho foi avaliar como o organismo de anuros adultos está sendo afetado pela antropização de seu habitat a partir das suas taxas de leucócitos. Foram amostrados ao todo 69 indivíduos adultos de *Physalaemus cuvieri* e *Scinax x-signatus*, divididos em dois tipos de habitat: os de baixa influência antrópica e os de alta. Nos indivíduos capturados foi feita a identificação e contagem diferencial e total de leucócitos. Indivíduos de *S. x-signatus* amostrados em áreas de alta influência antrópica apresentaram um aumento na quantidade de neutrófilos e diminuição na de linfócitos quando comparados aos indivíduos de áreas de baixa influência. Enquanto que indivíduos de *P. cuvieri* mostraram um perfil inverso, embora não tenha sido de maneira tão acentuada quando foi em *S. x-signatus*. Tais resultados mostram que a resposta imune de um indivíduo depende da espécie e do local em que ela se encontra. *Scinax x-signatus*, embora seja uma espécie considerada generalista, teve seu organismo afetado de acordo com o grau de antropização de seu habitat. Apesar de *P. cuvieri* não ter apresentado o mesmo tipo de perfil, sua resposta ainda assim pode significar um tipo de interação com seu ambiente externo, inclusive aclimação à nova realidade. Essas respostas permitiram ver a eficiência do perfil de leucócitos como indicador de impactos que o organismo esteja sofrendo por alterações no ambiente. Embora o uso dos perfis tenha sido bem sucedido neste trabalho, o uso de outros parâmetros fisiológicos é encorajado a fim de confirmar se não está havendo alguma resposta ao estressor ambiental, como as concentrações de corticosterona e testosterona plasmáticos.

Palavras-Chave: Imunofisiologia, Stress, Leucócitos, Amphibia.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.METODOLOGIA.....	3
3. RESULTADOS.....	6
4. DISCUSSÃO.....	8
5. CONCLUSÃO.....	10
6.REFERÊNCIAS.....	10
7.ANEXOS.....	15

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade de anfíbios do planeta, contando ao todo 1.080 espécies (SBH, 2016), no entanto também é o país com um dos maiores níveis de desmatamento do mundo (KARSTENSEN et al., 2013). Isso põe em risco sua própria diversidade, colocando em ameaça de extinção um vasto número de táxons, dentre elas os anuros por conta da vulnerabilidade de muitas de suas espécies aos impactos antrópicos (MACHADO et al., 1999).

Impactos ambientais podem influenciar de diversas maneiras os habitats naturais, trazendo alterações drásticas para a fauna e flora (MACHADO et al., 1999). Um dos tipos de habitat que mais podem ser afetados pela sua proximidade aos centros urbanos são os corpos de água doce (MCEWEN & WINGFIELD, 2003). Por exemplo, despejo de contaminantes químicos na água como resultados dos efluentes urbanos provoca a acidificação de rios, o que traz sérias consequências para os organismos que os habitam (CHAMBERS, 2009). Por isso o entendimento de como populações naturais são prejudicadas por atividades humanas se torna crítico na elaboração de planos de conservação que possam abranger todos os aspectos necessários para auxiliar na sobrevivência de grupos ameaçados (ROMERO & WIKELSKI, 2002; JANIN et al, 2012).

Quando ocorre uma exposição a fatores ambientais estressantes, ou mesmo infecções, o subsistema fisiológico dos vertebrados responsável por montar uma resposta adequada a isso e regular a homeostase interna é o eixo hormonal Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (MOORE & JESSOP, 2003). Essa resposta começa quando o hipotálamo, região do encéfalo que conecta os sistemas nervoso e endócrino, capta estímulos nervosos para a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que terá a função de agir na glândula pituitária (ou hipófise) para que ela secrete o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), e este sua vez irá estimular o córtex adrenal no rim para a liberação de glicocorticóides (AIRES, 2008). Esse tipo de hormônio pode regular em vários níveis a resposta do organismo aos fatores estressantes, como o aumento na concentração de glicose na corrente sanguínea (AIRES, 2008) ou até mesmo mudanças relacionadas à metamorfose em girinos (DAVIS, 2009).

Dentre os glicocorticóides temos a corticosterona, responsável por interagir com o sistema imune de vertebrados para balancear uma resposta inflamatória, redirecionando o recrutamento de células para o momento de adversidade (DAVIS & MAERZ, 2010). Isto se deve à plasticidade fenotípica do organismo, permitindo que o sistema imune se adeque a diferentes tipos de influências que possam vir do ambiente externo (DAVIS & MAERZ,

2009; DENVER, 1997). Por conta de seu papel na interação entre organismo e ambiente, essa via se torna um excelente objeto de estudo para avaliar como um indivíduo esteja respondendo a mudanças em seu ambiente (HOMAN et al., 2003; WINGFIELD & ROMERO, 2001).

A capacidade de conseguir dar uma resposta eficiente ao evento estressor depende do período de tempo ao qual o organismo ficará exposto (MORICI et al., 1997). A ativação da produção e secreção de glicocorticoides é para ser uma resposta curta, no período de dias, e não poderá ser mantida por muito mais tempo (ROMERO, 2004; WASSER et al., 1997). Caso a estimulação dessa via se torne crônica, isto é, quando o fator estressante se mantém por um período que ultrapasse semanas, isso pode vir a comprometer a regulação do eixo HPA, desestruturando o funcionamento de atividades importantes para o organismo (TEIXEIRA et al., 2012). Dentre as consequências dessa desregulação, a inibição do comportamento reprodutivo e a imunossupressão, tornando o organismo suscetível a infecções, são algumas das mais graves (TITON et al., 2017). A inibição da reprodução ocorre como uma forma de mobilizar os recursos energéticos para outros tecidos onde a necessidade é maior, pois a atividade reprodutiva é consideravelmente custosa para um organismo (ZERANI et al., 1991). A imunossupressão está associada com a inibição do desenvolvimento e ação de leucócitos (MARTIN et al., 2005; KIANK et al., 2006).

Estudos que analisam a interação entre o organismo e variáveis ambientais muitas vezes podem recorrer à produção do hormônio corticosterona como forma de avaliar se os indivíduos estudados estão sofrendo algum tipo de efeito negativo do ambiente, ou mesmo por condições simuladas em laboratório (GLENNEMEIER & DENVER, 2002; KIANK et al., 2006). No entanto, a análise laboratorial de hormônios de estresse, como a corticosterona, é dispendiosa, fazendo-se necessário explorar alternativas para analisar a resposta ao estresse (DAVIS et al., 2008). Uma opção viável é o uso da contagem diferencial de leucócitos na corrente sanguínea, pois essa metodologia requer apenas uma amostra sanguínea do indivíduo para a preparação de um esfregaço e o perfil obtido pode refletir a concentração de corticosterona plasmática (DAVIS & MAERZ, 2008; DAVIS & MAERZ, 2010; HOTA et al., 2013). Estudos anteriores mostram que quando há mais neutrófilos do que linfócitos na corrente sanguínea, isso pode ser sinal de estresse por fatores externos; essa redistribuição ocorre para que as células sejam realocadas onde são mais necessárias (DAVIS et al., 2010).

Animais ectotérmicos podem ser bons indicadores da qualidade do habitat em que vivem, ao se analisar sua resposta hormonal e seus efeitos quando expostos a condições de adversidade (HOPKINS et al., 1997). Isso é possível porque quando expostos a qualquer tipo

de estresse eles levam mais tempo do que endotérmicos para expressar essas respostas e mais tempo até que os níveis base de hormônios voltem ao normal, incluindo a proporção normal de leucócitos (DAVIS et al, 2008). Isso os torna bons candidatos a fim de se avaliar como condições ambientais podem estar afetando seus perfis leucocitários (CHAMBERS, 2009; DAVIS & MAERZ, 2011). Um bom exemplo de como a análise de leucócitos pode ser aplicada é analisando populações em locais que se encontram em paisagens de agricultura, pois eles são caracterizados por possuírem baixos níveis de umidade e altas temperaturas, fatores altamente estressantes para indivíduos que dependem de um ambiente úmido para sobreviverem (JANIN et al, 2012).

Considerando os possíveis efeitos da urbanização sobre as populações de anuros no aspecto fisiológico, torna-se necessário usar métodos de detectar possíveis alterações fisiológicas que os organismos estejam sofrendo devido à antropização. A utilização dos perfis de leucócitos é uma alternativa a ser usada a fim de verificar se a manutenção da homeostase interna de anuros está comprometida pelo ambiente de má qualidade por conta da conexão entre a resposta imunológica e o eixo hormonal de resposta ao estresse. Este trabalho visa comparar os perfis de leucócitos obtidos de populações de anuros em áreas com diferentes níveis de degradação a fim de inferir o possível efeito estressante que as mudanças ambientais de áreas mais antropizadas possam estar causando sobre essas populações. A hipótese a ser testada é de que em áreas mais perturbadas haverá fatores estressantes que irão induzir uma resposta imunológica nas populações que lá habitam, representada por uma maior proporção de neutrófilos e menor de linfócitos do que em indivíduos em áreas com menos sinais de degradação.

2. METODOLOGIA

2.1. Áreas de estudo

Entre fevereiro e maio de 2017, durante o período chuvoso, amostramos três áreas de baixa influência antrópica e outras três áreas de alta influência antrópica localizadas no estado do Maranhão, Brasil (Fig. 1).



Figura 1: Áreas de amostragem.

Para auxiliar na caracterização quanto ao nível de antropização, foi utilizado o programa de mapeamento QGIS 2.18.14 para o cálculo da cobertura vegetal considerando uma área total de 37.243m² para todos os pontos amostrais (Tabela 1). Os valores percentuais foram obtidos da proporção da área de vegetação para a área total. Foram consideradas áreas de baixa antropização quando seu percentual de cobertura vegetal era superior a 90%.

Pontos	Área Antropizada (m ²)	Área de Vegetação (m ²)	Cobertura Vegetal (%)
Alta Antrop. 01	22627	15666	41
Alta Antrop. 02	19268	19025	50
Alta Antrop. 03	13842	24451	64
Baixa Antrop. 01	275	38018	99
Baixa Antrop. 02	1148	37146	97
Baixa Antrop. 03	2102	36191	95

Tabela 1. Valores das áreas antropizadas e de vegetação, junto com a porcentagem de cobertura vegetal, dos pontos amostrais.

As áreas de baixa influência situavam-se longe de centros urbanos e possuíam pouca presença humana em seus arredores, isto é, pouco asfalto, iluminação artificial e moradias. Por sua vez, as áreas de alta influência estavam mais próximas de centros urbanos

e apresentavam sinais de desmatamento, além de muitas habitações humanas e alta iluminação artificial. É importante ressaltar que as áreas mais antropizadas não eram próximas de plantações, desconsiderando possíveis riscos de efeitos de agrotóxicos sobre as populações de anfíbios anuros (SILVA et al, 2013). O espaço de tempo entre cada expedição manteve-se o menor possível (desvio padrão de 5,82 dias), a fim de reduzir as chances de acontecimentos imprevisíveis ocorrerem e assim alterando a resposta imune de um momento para o outro (WINGFIELD, 2008).

2.2. *Espécies estudadas*

Escolhemos as espécies *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) e *Scinax x-signatus* (Hylidae) por serem nativas e de ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo comuns tanto em áreas conservadas como em áreas com distúrbios antrópicos (BARRETO & ANDRADE, 1995; RODRIGUES et al., 2004). Os machos de *P. cuvieri* geralmente vocalizam com o corpo parcialmente submersos na água de corpos d'água rasos (BARRETO & ANDRADE, 1995) ao passo que os machos de *S. x-signatus* podem vocalizar sobre macrófitas aquáticas, e também em troncos, arbustos e árvores (VIEIRA et al., 2007)

Os indivíduos que capturamos em campo eram todos machos em atividade de vocalização. Capturamos ao todo 33 espécimes de *P. cuvieri*, sendo 18 em áreas de menor influência antrópica e 15 em áreas de maior influência. Enquanto que para *S. x-signatus* foram ao todo 38 indivíduos, 18 em áreas de menor influência antrópica e 20 em áreas de alta influência. Para cada área capturamos no mínimo 5 indivíduos e no máximo 10 de cada espécie para serem feitas as comparações. Depositamos o material testemunho na Coleção de Herpetologia da Universidade Federal do Maranhão (HUFMA), números de tombo no ANEXO I. As licenças para execução do trabalho foram emitidas pelos órgãos competentes (SISBIO 2010/52321-7, CEUA 23115.005703/2016-16).

2.3. *Procedimentos Experimentais*

Após a captura acondicionamos individualmente cada anuro em sacos de pano umedecidos para não ressecarem. Depois das expedições nós os transportamos para o Laboratório de Herpetologia da UFMA onde fizemos todos os procedimentos experimentais. Primeiramente, para a eutanásia dos indivíduos foi usada pomada de lidocaína 5% passada no dorso e ventre dos indivíduos. Em seguida, a amostragem sanguínea foi feita por punção cardíaca (FALSO et al, 2015), obtendo uma quantidade de sangue para tocar uma lâmina de microscópio limpa. A obtenção dessa amostra foi feita até 15h após a captura do indivíduo no campo, a fim de garantir o máximo possível de semelhança com o perfil que havia antes da captura (MORICI et al, 1997). A fixação e coragem das lâminas foram feitas usando corante

Panótipo. A contagem de leucócitos foi realizada obedecendo a parâmetros estabelecidos por Andrew Davis (2011), usando a contagem diferencial de 100 leucócitos por lâmina para cada animal, de acordo com o seguinte processo: todas as lâminas foram vistas usando microscópio óptico sob 1000x de aumento, e os leucócitos foram identificados como neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos, sendo contados até que 100 leucócitos foram registrados para cada lâmina, assim obtendo as quantidades de cada tipo celular. Também foi realizada a contagem total de leucócitos, também fazendo uma contagem de até 100 células observadas no esfregaço sanguíneo, mas distinguindo apenas eritrócitos de leucócitos em dois campos de leitura separados para cada lâmina (TEIXEIRA et al., 2012). Todas as contagens foram feitas por um único observador e às cegas, com o auxílio de uma segunda pessoa para o manuseio das lâminas e bloqueando a visualização de suas identificações usando adesivos.

2.4. Análise de dados

A partir de análises estatísticas examinamos a possível interação entre ambas as contagens de leucócitos com as espécies e os locais nos quais foram capturadas. As contagens seriam as variáveis respostas, enquanto as espécies e locais as preditoras. Para isso realizamos duas análises multivariadas de variância permutacional (PERMANOVA), uma para cada tipo de contagem. Esse tipo de análise foi utilizada por comparar múltiplas variáveis sem que possuam uma distribuição normal, avaliando se há discrepâncias entre os grupos. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Obtivemos os valores das médias e desvios padrão das quantidades de cada tipo de leucócito encontrados na contagem diferencial, e dos valores totais de leucócitos e eritrócitos na contagem total. Também fizemos gráficos *boxplot* comparando as quantidades de cada tipo de leucócito de acordo com a área e espécie. Todos os testes, medidas e gráficos foram realizados utilizando o R 3.4.3.

3. RESULTADOS

3.1. Contagem Total de Leucócitos

Na contagem total de leucócitos a discrepância entre os valores das quantidades de eritrócitos e de leucócitos fica evidente para ambas as espécies (Tabela 2).

Espécie	Influência Antrópica	Eritrócitos	Leucócitos
<i>Scinax x-sginatus</i>	Baixa	96,25±5,322	3,75±5,322
	Alta	96,36±3,235	3,63±3,235
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Baixa	98,2±1,592	1,7±1,592
	Alta	97,6±2,028	2,4±2,028

Tabela 2: Médias e desvios padrão das contagens globais de leucócitos de *Scinax x-sginatus* e *Physalaemus cuvieri*.

O PERMANOVA para esse tipo de contagem não mostrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis (Tabela 3). Por conta disso pode-se inferir que não há variações significantes no total de leucócitos entre as áreas para ambas as espécies.

	G.L.	SomaSq	MédiaSq	Modelo F.	R ²	Pr(>F)
Espécie	1	89,72	89,716	4,0201	0,05885	0,053
Local	1	1,96	1,957	0,0877	0,00128	0,744
Espécie:Local	1	4,62	4,622	0,2071	0,00303	0,667
Resíduos	64	1428,26	22,317		0,93684	
Total	67	1524,56			1	

Tabela 3: Valores do PERMANOVA da Contagem Total de Leucócitos. G.L.: graus de liberdade. SomaSq: soma dos quadrados. MédiaSq: média dos quadrados.

3.2. Contagem Diferencial de Leucócitos

Na maioria dos indivíduos para ambas as espécies o perfil mais comum encontrado é representado por uma alta abundância de linfócitos, seguido por baixas quantidades de monócitos, eosinófilos, e neutrófilos, e por fim valores ínfimos de basófilos (Tabela 4).

Espécie	Influência Antrópica	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
<i>Scinax x-siginatus</i>	Baixa	93,3±3,712	1,1±1,64	2,8±1,745	2,5±1,617	0,05±0,235
	Alta	84,7±7,779	4,65±3,216	5,05±4,11	4,6±3,218	0,9±1,774
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Baixa	76,5±10,528	4,8±5,367	9,7±4,57	8,8±4,119	0,1±0,323
	Alta	81,1±14,728	3,95±4,936	7,5±6	7,2±5,26	0,15±0,366

Tabela 4: Médias e desvios padrão da contagem diferencial de leucócitos de *Scinax x-siginatus* e *Physalaemus cuvieri*.

No PERMANOVA (Tabela 5) realizado o valor de *p* foi significativo na variável Espécie (0,001) e na interação Espécie:Local (0,007). Isso sugere que as diferenças encontradas nas quantidades de leucócitos entre as áreas de alta e baixa influência antrópica dependem da espécie que está sendo analisada.

	G.L.	SomaSq	MédiaSq	Modelo F.	R ²	Pr(>F)
Espécie	1	2666,5	2666,49	17,2670	0,17802	0,001
Local	1	116,4	116,41	0,7538	0,00777	0,424
Espécie:Local	1	1076,8	1076,82	6,9730	0,07189	0,007
Resíduos	72	11118,7	154,43		0,74232	
Total	75	14978,5			1	

Tabela 5: Valores do PERMANOVA da Contagem Diferencial de Leucócitos. G.L.: graus de liberdade. SomaSq: soma dos quadrados. MédiaSq: média dos quadrados.

Os resultados do PERMANOVA são refletidos nos gráficos *boxplot* (Figura 2). A partir deles é possível perceber que em *S. x-signatus* há uma diferença nas quantidades de linfócitos de acordo com o tipo de área em que o indivíduo foi capturado, sendo menores em áreas de alta influência antrópica do que nas de baixa. Outra diferença visível é na proporção de neutrófilos, apresentando um perfil oposto ao dos linfócitos: maiores quantidades em áreas de alta influência e menores em áreas de baixa influência; uma tendência semelhante ocorre em monócitos e eosinófilos. Enquanto *P. cuvieri* apresentou um perfil oposto ao que foi encontrado em *S. x-signatus*, isto é, aumento na quantidade de linfócitos e diminuição na de neutrófilos em áreas de alta influência antrópica.

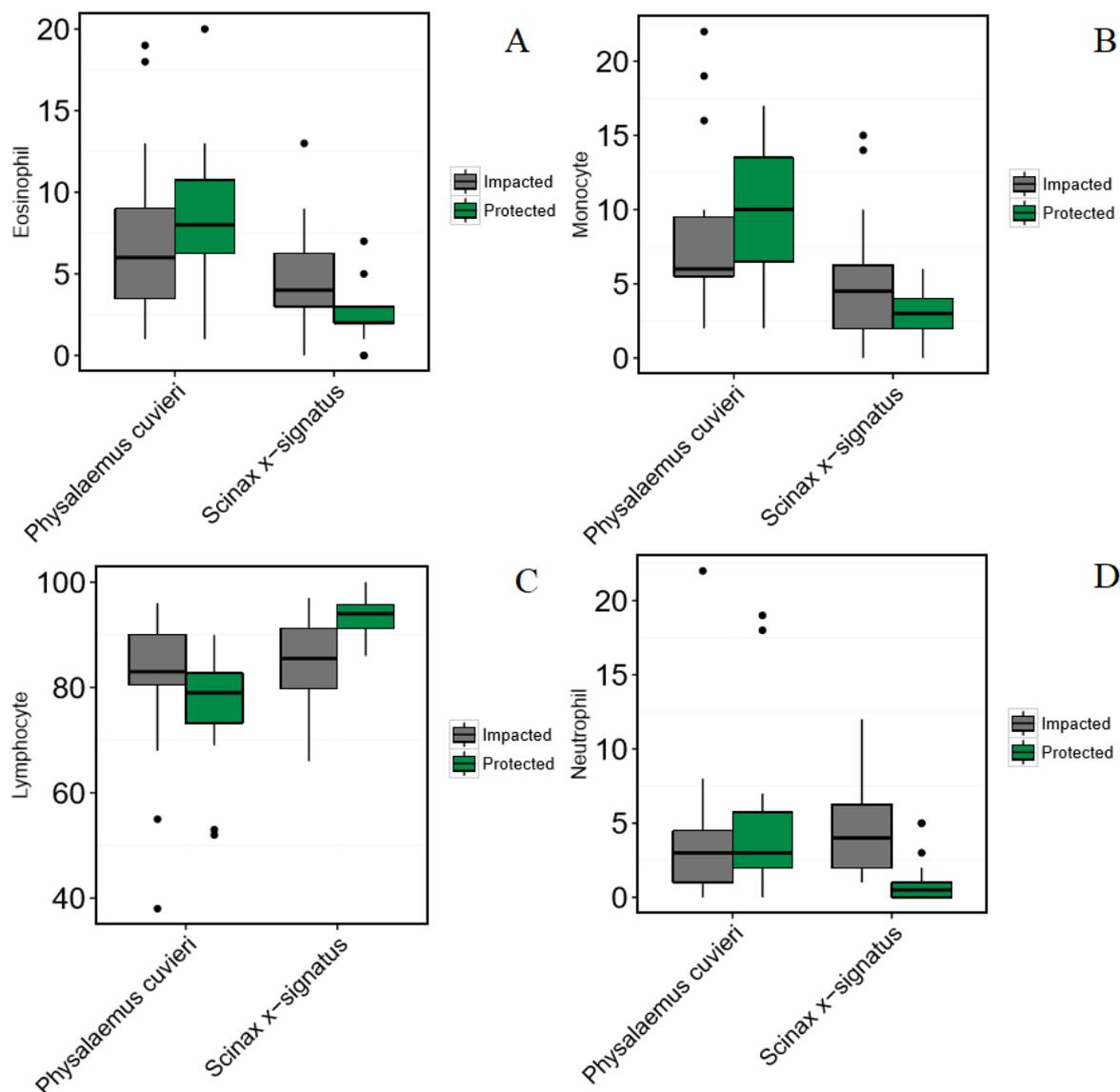


Figura 2. Gráficos de comparação das medianas de cada tipo de leucócito. As linhas horizontais representam os valores de mediana, as caixas os quartis, os pontos são os *outliers* e as linhas verticais são as linhas *whisker*. A – Comparação dos valores de eosinófilos. B - Comparação dos valores de monócitos. C - Comparação dos valores de linfócitos. D - Comparação dos valores de neutrófilos.

4. DISCUSSÃO

Uma mobilização constante de neutrófilos na circulação periférica pode comprometer o funcionamento de sistemas fisiológicos relacionados, pois tal resposta indica um estímulo constante do eixo hormonal de resposta ao estresse (ASSIS et al., 2017). Alguns dos efeitos negativos dessa indução, representada pelo aumento na circulação de glicocorticoides, é a imunossupressão (BARSOTTI et al., 2017) e a inibição de outras atividades dispendiosas para o organismo, como a reprodução (TITON et al., 2017). Existem vários tipos de possíveis sequelas para o estresse crônico e por isso diversas formas de se

detectar ele nos organismos dos indivíduos das populações-alvo, por isso a utilização do perfil de leucócitos pode vir a ser uma dessas ferramentas de detecção.

Avaliando os perfis de leucócitos de *S. x-signatus* pode-se confirmar a sensibilidade dos indivíduos capturados a perturbações ambientais no nível imunológico. Percebe-se isso ao comparar os níveis de linfócitos aos dos outros leucócitos, especialmente neutrófilos, havendo um aumento na proporção destes últimos comparado ao de linfócitos em áreas com alta influência antrópica, evidenciando um estresse do organismo a fatores externos (FALSO et al., 2015). Tal padrão na resposta leucocitária já foi encontrado em estudos anteriores que mostravam uma relação entre o aumento na concentração de neutrófilos com o estresse sofrido pelos espécimes estudados (ASSIS et al., 2017; DAVIS & MAERZ, 2008). Alguns dos fatores que podem estar causando esse tipo de reação imunológica são os fluxos adjacentes de pessoas (ALMASI et al., 2015). Outro fator que poderia induzir o perfil da resposta imune encontrada em *S. x-signatus* seria a presença de ectoparasitas, tais como carrapatos (LUZ et al., 2015), mas estes tão pouco tiveram sua presença evidenciada nos indivíduos capturados.

Indivíduos de *P. cvieri* apresentaram um perfil oposto ao que foi encontrado em *S. x-signatus*, mostrando uma resposta que era esperada em áreas de alta influência antrópica em áreas de baixa influência. Tal resultado pode ser por conta da quantidade de *outliers* encontrados nas análises, influenciando nas médias finais dos perfis leucocitários. Além disso, deve-se levar em consideração também que *P. cvieri* é uma espécie amplamente distribuída e de hábito generalista (BARRETO & ANDRADE, 1995), portanto, certa aclimação a ambientes antropizados não pode ser descartada.

Apesar de terem sido encontrados indivíduos que apresentavam um perfil evidenciando uma condição de estresse, isso não chegou a causar uma inibição do comportamento reprodutivo em ambas as espécies, pois todos os anuros capturados eram machos vocalizando. Isso mostra que o grau de estresse que enfrentavam nas áreas avaliadas não era alto o suficiente para comprometer o funcionamento das funções reprodutivas. Tal resultado pode ser explicado pelo nicho amplo das espécies estudadas (BARRETO & ANDRADE, 1995; RODRIGUES et al, 2004), pois já teriam se aclimado às condições adversas de seus habitats modificados o suficiente para garantirem a sobrevivência de suas populações, embora ainda assim possam demonstrar certo nível de estresse. No entanto não se pode esperar o mesmo resultado em espécies de nicho mais restrito, pois estas podem apresentar uma resposta mais acentuada às mudanças ambientais (HOPKINS et al, 1997).

Levando em conta a contagem total de leucócitos para ambas as espécies, não houve diferenças significativas nas quantidades encontradas nem por espécie nem por tipo de área. A única ressalva que pode ser feita é em relação à proporção encontrada em *P. cuvieri*, havendo um leve acréscimo na proporção de leucócitos em áreas com impacto antrópico maior, o que pode ser percebido no valor de p quase significativo (0,053) do PERMANOVA da contagem global na variável espécie. Entretanto isso evidenciaria mais uma distinção interespecífica das quantidades totais do que uma resposta a depender do tipo de área em que os indivíduos estavam.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos visualizar como populações de anuros de diferentes espécies que habitam áreas antropizadas podem responder no nível imunológico às variáveis ambientais desfavoráveis. Pode-se notar o quanto um ambiente com alta influência antrópica pode afetar o sistema imune observando o caso da *Scinax x-signatus*. Em áreas com vários sinais de degradação indivíduos dessa espécie apresentaram seu sistema imune reagindo ao estresse pelo aumento nas proporções de leucócitos associados com a resposta imunológica inata. Apesar de apresentarem esse tipo de perfil imunológico, as populações dessa espécie não mostraram uma inibição de seu comportamento reprodutivo, já que todos os espécimes capturados eram machos vocalizando. Isso indica que o estresse nessas áreas não é o suficiente para prejudicar outras funções fisiológicas para as populações analisadas. No caso do *Physalaemus cuvieri* é necessário expandir sua amostragem para outras áreas a fim de averiguar se os resultados de seus perfis permanecerão os mesmos, não sendo tão influenciado por ambientes degradados quanto *S. x-signatus*. Torna-se interessante no futuro acrescentar outros tipos de marcadores biológicos, tais como hormônios e a eficiência fagocítica, pois dada a complexidade da resposta imunológica nos vertebrados, aumenta-se a confiança no resultado quanto mais parâmetros estiverem sendo analisados.

6. REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. Fisiologia. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Vol. 1. 1232 p.
- ALMASI, B.; BÉZIER, P.; ROULIN, A.; JENNI, L. Agricultural land use and human presence around breeding sites increase stress-hormone levels and decrease body mass in barn owl nestlings. *Oecologia*, vol. 179, p. 89-101
- ASSIS, V. R.; TITON, S. C. M.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G. T.; MASSOCO, C. O.; GOMES, F. R. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): Effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. *J. Exp. Zool.*, p. 1-14. 2017.
- BARRETO, L.; ANDRADE, G. V. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, vol. 16, p. 67-76. 1995.
- BARSOTTI, A. M. G.; ASSIS, V. R.; TITON, S. C. M.; JUNIOR, B. T.; FERREIRA, Z. F. S.; GOMES, F. R. ACTH modulation on corticosterone, melatonin, testosterone and innate immune response in the tree frog *Hypsiboas faber*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, vol. 204, p. 177-184. 2017.
- CHAMBERS, D. Abiotic factors underlying stress hormone level variation among larval amphibians. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 2009.
- DAVIS, A. Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Comp Clin Pathol*, vol 18, p. 181-186, 2009.
- DAVIS, A. K.; FERREIRA, A.; KEEL, K.; MAERZ J.C. Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comparative Clinical Pathology*, 19, p. 49-55, 2010
- DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, p. 613-617, 2008.
- DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. *Journal of Experimental Zoology*, Georgia, 311A, p. 697-704, 2009.
- DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *International Journal of Zoology*, 10, p. 8, 2010.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22, p. 760–772, 2008.

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. 2011. Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 45 (1), p. 40-44, 2011.

DENVER, R. J. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and Behavior*, vol. 31, p. 169-179, 1997.

FALSO, P. G.; NOBLE, C. A.; DIAZ, J. M.; HAYES, T. B. The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 212, p. 73-83. 2015.

GLENNEMEIER, K. A.; DENVER, R. J. Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipienstadpoles* to intraspecific competition. *J Exp Zool*, 292, p. 32–40, 2002.

HOMAN, R. N.; REGOSIN, J. V.; RODRIGUES, D. M.; REED, J. M.; WINDMILLER, B. S.; ROMERO, L. M. Impacts of varying habitat quality on the physiological stress of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Animal Conservation*, vol. 6, p. 11-18, 2003.

HOPKINS, W. A.; MENDONÇA, M. T.; CONGDON, J. D. Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 108, p. 237-246, 1997.

HOTA, J.; DAS, M.; MAHAPATRA, P. K. Blood Cell Profile of the Developing Tadpoles and Adults of the Ornate Frog, *Microhyla ornata* (Anura: Microhylidae). *International Journal of Zoology*, p. 1-14, 2013.

JANIN, A.; LÉNA, J. P.; DEBLOIS, S.; JOLY, P. Use of stress-hormone levels and habitat selection to assess functional connectivity of a landscape for an amphibian. *Conservation Biology*, vol. 26, n° 5, p. 923-931, 2012.

KARSTENSEN, J.; PETERS, G. P.; ANDREW, R. M. Attribution of CO₂ emissions from Brazilian deforestation to consumers between 1990 and 2010. *Environ. Res. Lett.*, vol. 8, 7pp. 2013.

KIANK, C.; HOLTFRETER, B.; STARKE, A.; MUNDT, A.; WILKE, C.; SCHUTT, C. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure

to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun*, 20, p. 359-368, 2006.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H. ; SILVA, H. R. Patterns of parasitismo by *Amblyomma rotundatum* (Ixodidae) on *Rhinella schneideri* (Bufonidae) in islands of São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, vol. 35, nº 6, p. 579-582. 2015

MACHADO, R. A.; BERNARDE, P. S.; MORATO, S. A. A.; ANJOS, L. Análise comparada da riqueza de anuros entre duas áreas com diferentes estados de conservação no município de Londrina, Paraná, Brasil (Amphibia, Anura). *Revta. Bras. Zool.*, vol. 16, p. 997-1004. 1999.

MARTIN, L. B.; GILLIAM, J.; HAN, P.; LEE, K.; WIKELSKI, M. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 140, p. 126-135, 2005.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, vol. 43, p. 2-15, 2003.

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

MORICI, L. A.; ELSEY, R. M.; LANCE, V. A. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *The Journal of Experimental Zoology*, vol. 279, p. 156-162, 1997.

RODRIGUES, M. T.; CARAMASCHI, U.; MIJARES, A. 2004. *Scinax x-signatus*. IUCN Red List of Threatened Species. In: IUCN 2009. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/56005/0>. Acessado em 14 de Setembro de 2017.

ROMERO, L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TRENDS in Ecology and Evolution*, vol. 19, nº5, 249-255, 2004.

ROMERO, L. M.; WIKELSKI, M. Exposure to tourism reduces stress-induced corticosterone levels in Galápagos marine iguanas. *Biological Conservation*, vol. 108, p. 371-374, 2002.

SILVA, H. S. V. P.; LOIOLA, C.; PEREIRA, S. R. F.; SANTOS, R. L.; ANDRADE, G. V.; NUNES, G. S. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). *Pesticidas: r. ecotoxicol. E meio ambiente*, v. 23. 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA - SBH. 2016. Brazilian amphibians: List of Species. <http://www.sbherpetologia.org.br>. (Último acesso em 15/11/2017).

TITON, S. C. M.; ASSIS, V. R.; JUNIOR, B. T.; CASSETTARI, B. O.; FERNANDES, P. A. C. M.; GOMES, F. R. Captivity effects on immune response and steroid plasma levels of a Brazilian toad (*Rhinella schneideri*). *J. Exp. Zool.*, p. 1-12. 2017.

TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; ROCHA, G. C.; ANTONUCCI, A. M.; FRANÇA, F. M.; MARCANTONIO, A. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FERREIRA, C. M. Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. *Pesq. Vet. Bras.*, vol. 32, p. 91-98, 2012.

VIEIRA, W. L. S.; ARZABE, C.; SANTANA, G. G. Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri paraibano, nordeste do Brasil. *Oecol. Bras.*, vol. 11, nº3, p. 383-396, 2007.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern Spotted Owl. *Conservation Biology*, vol. 11, nº 4, p. 1019-1022, 1997.

WINGFIELD, J. C. Comparative endocrinology, environment and global change. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 157, p. 207-216, 2008.

WINGFIELD, J. C.; ROMERO, L. M. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In: McEwen, B.S., Goodman, H.M. (Eds), *Handbook of Physiology; Section 7: The Endocrine System; Volume IV: Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms*. *Oxford Univ. Press*, New York. 211-234, 2001.

ZERANI, M.; AMABILI, F.; MOSCONI, G.; GOBBETTI, A. Effects of captivity stress on plasma steroid levels in the green frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 98, nº ¾, p. 491-496, 1991.

ANEXO I

Lista de tombo dos espécimes capturados

Nº	ESPÉCIE	LOCAL	DATA	COLETOR
2153	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	14/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2154	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	14/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2155	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	14/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2156	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	14/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2157	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	30/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2158	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	30/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2159	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	30/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2160	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	02/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2161	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	02/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2162	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2163	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2164	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	09/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2165	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	09/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2166	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	09/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2167	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	29/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2168	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	29/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2169	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	29/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2170	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	04/04/2017	Garcia Neto, P. G.
2171	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	04/04/2017	Garcia Neto, P. G.
2172	<i>Scinax x-signatus</i>	Bacanga (UFMA), São Luís, MA, Brasil	04/04/2017	Garcia Neto, P. G.
2173	<i>Scinax x-signatus</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2174	<i>Scinax x-signatus</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2175	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2176	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves,

				R. T. S.
2177	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2178	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2179	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2180	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2181	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2182	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Campus UFMA, Pinheiro, MA, Brasil	13/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2183	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2184	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2185	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2186	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2187	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2188	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2189	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2190	<i>Scinax x-signatus</i>	Purão dos Pirrós, Pinheiro, MA, Brasil	14/05/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.; Alves, R. T. S.
2191	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2192	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2193	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2194	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2195	<i>Scinax x-signatus</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	23/03/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.

2196	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2197	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2198	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2199	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2200	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2201	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2202	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Quebra-Pote, São Luís, MA, Brasil	15/03/2017	Garcia Neto, P. G.
2203	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2204	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2205	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2206	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2207	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2208	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2209	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2210	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Paço do Lumiar, MA, Brasil	11/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2211	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2212	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2213	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2214	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2215	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2216	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2217	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2218	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2219	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2220	<i>Scinax x-signatus</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	21/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2221	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2222	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.

2223	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2224	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2225	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2226	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2227	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2228	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2229	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.
2230	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Sítio Aguahy, São José de Ribamar, MA, Brasil	22/04/2017	Garcia Neto, P. G.; Silva, A. F. C.