

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB**

MARIA DANIELA RIBEIRO BARBOSA

**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS CHITRIDIOS EM TEGUMENTO DE *Rhinella jimi*
Stevaux, 2002 (ANURA BUFONIDAE)**

**Picos - PI
2017**

Maria Daniela Ribeiro Barbosa

**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS QUITRÍDIOS EM TEGUMENTO DE *Rhinella jimi*
Stevaux, 2002 (ANURA BUFONIDAE)**

Monografia apresentada como requisito para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas – Pela Universidade Federal do Piauí – Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

Orientadora: Dra. Mariluce Gonçalves
Fonseca

**Picos – PI
2017**

Ficha Catalográfica

B238i Barbosa, Maria Daniela Ribeiro.

Investigação de fungos Quitrídios em tegumento
de *Rhinella jimi* Stevaux, 2002 (Anura Bufonidae) /
Maria Daniela Ribeiro Barbosa.– 2017.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (52 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de
Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal do Piauí, Picos, 2017.

Orientador(A): Prof.^a Dra. Mariluce Gonçalves
Fonseca

1. Anfíbios. 2. *Rhinella jimi* Stevaux, 2002.
3. Fungos-Semiárido. I. Título.

CDD 616.969

MARIA DANIELA RIBEIRO BARBOSA

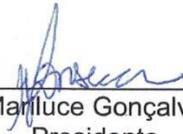
**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS QUITRÍDIOS EM TEGUMENTO DE *Rhinella jimi* Stevaux,
2002 (ANURA BUFONIDAE)**

Monografia apresentada como requisito para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas – Pela Universidade Federal do Piauí – Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

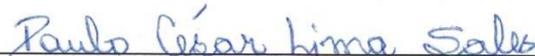
Orientadora: Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca

Aprovado em 12 / 07 / 2017

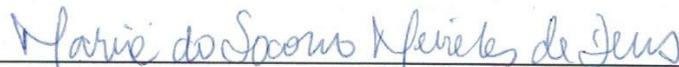
BANCA EXAMINADORA



Prof: Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca
Presidente



Prof.: Dr. Paulo César Lima Sales
Membro



Prof.: Dra. Maria Socorro Meireles de Deus
Membro

Prof.: Dra. Waldima Alves da Rocha
Suplente

PICOS – PI
2017

Dedicado a Deus, meu anjo da guarda Rafael, Família e Amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar até onde cheguei e não ter deixado fraquejar nos momentos de dificuldades.

A minha mãe guerreira Maria José que sempre me deu o apoio e me ajudou a lutar e acreditar mais em mim e sempre me estendeu a mão em todos os momentos.

A meu Pai Raimundo, as minhas irmãs Cláudia, Bárbara e Natália e aos meus irmãos Moises, Rafael, Daniel, Bruno e Matheus que estão sempre apoiando e me dando o amor necessário para seguir em frente e ir ao infinito.

A meu namorado Júnior por tolerar minhas loucuras e ter tido paciência comigo.

As minhas sobrinhas Franciele, Fernanda, Mirelly e Emanuelle que me ajudaram a estudar todos esses anos.

As minhas cunhadas Francisca, Luana e Laiane.

A minha madrinha Zuleide por transmitir a paz, as minhas madrinhas Luzilândia, Vera, Maria.

A todos os meus amigos que me ajudaram e torceram por mim, não poderia deixar em momento algum de agradecer a Maiara, Kele, Jessica, Janiella, Henrique, Kuenia, Clarice, Romário, Railson, Jussara, Michele, Lunara, Augusto César, Jailson Rodrigues, Terezinha, Debora, Larissa Lucena, Maria Joaquina, Gracilene Feitosa, Marcia, Grasielle Cunha, Erica Ravena, Ludmila aluna de estágio com vocês aprendi a construir laços eternos.

Obrigada por todos os momentos em que fomos estudiosos, brincalhões e cúmplices. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava, esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Agradeço a Professora Mariluce Fonseca por ter me auxiliado e me aceitado como orientanda te admiro muito e quero ser igual a você sempre aplicada.

Ao Professor Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, por me auxiliar nas pesquisas e ter mostrado ser muito comprometido com as pesquisas e incentivar os alunos a correr atrás dos seus objetivos.

Ao Professor Paulo Victor de Oliveira por ser uma pessoa extremamente aplicado e sempre preocupado com o aprendizado do aluno.

A Professora Patrícia da Cunha Gonzaga por transmitir paz e amor a profissão aos alunos.

A Professora Maria do Socorro Meireles de Deus, por ser uma professora que busca o saber e um maior aprendizado de seus alunos.

Ao Professor Paulo César Lima Sales pela disponibilidade e atenção para com os alunos sempre dando o auxílio necessário.

A Professora Marcia Maria Mendes Marques por ser um exemplo de como se deve ser um bom Professor, sempre com autoestima e aquele jeitinho que só ela tem em fazer todos ao seu redor sorrir e superar suas dificuldades.

Enfim agradeço a todos os Professores que tive na minha graduação Ana Carolina Landim Pacheco, Ana Paula Peron, Maria Carolina de Abreu, Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima, Artur Henrique Freitas Florentino de Souza, Victor de Jesus Silva Meireles, Eliane, Juscelino, Daniela, João Santos Andrade, Emarielle Pardal, Gislaine Brito. Agradeço a todos os Professores com quem passei esse ciclo e dizer que não esquecerei em momento algum de vocês, pois tudo o que aprendi devo a vocês.

Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos
(Autor desconhecido)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Espécimes investigadas no ambiente natural (A) Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (A1) e (B) Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (A2).	20
Figura 1.2: Realização do procedimento em região inguinal e membros (plantar) nos espécimes <i>Rhinella jimi</i>	21
Figura 1.3: análise por microscopia óptica realizada no Campus de Picos Laboratório de Pesquisa III	22
Figura 2.1: O ciclo de vida do <i>Bd</i> . Na porção substrato-independente do ciclo, os zoósporos flagelados são livres nadantes. Na porção substrato-dependente, os zoósporos se encistam e se desenvolvem em esporângios, que produzem e liberam novos zoósporos	32
Figura 2.2: Análise não invasiva do espécime <i>Rhinella jimi</i> por meio de swab estéril	35
Figura 2.3: Materiais utilizados para a extração do DNA de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 3.1: (A) Lesões vista Ventral. (B) Lesões na região membros posteriores e dorsal	47
Figura 3.2: Mudança de pigmentação nos espécimes <i>Rhinella jimi</i> . Erro! Indicador não definido.	

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 1 Investigação da ocorrência de fungos <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) em pele da região dorsal, ventral dos membros e região inguinal de <i>R. jimi</i> nas duas localidades por microscopia óptica.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Estudo de Campo Para Coleta de <i>Rhinella jimi</i> , Investigação de <i>bd</i> em Duas Localidades do Município de Picos.	20
2.2 Coleta e Preparo dos Swabs	21
2.3 Avaliação do Tegumento por Microscopia Óptica	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2 Investigação da ocorrência de fungos <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> em pele, membros e região inguinal de <i>Rhinella jimi</i> por Biologia Molecular.....	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Área de Estudo e Coleta do Material para Avaliação do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por Biologia Molecular nos Indivíduos de <i>Rhinella jimi</i>	34
2.2 Extração do DNA, seguindo o Protocolo <i>Salting Out</i>	35
2.3 Procedimentos Utilizados para Realização da Técnica de PCR (Reação De Cadeia Polimerase)	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4 CONCLUSÃO	39

REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO 3 Investigação de lesões compatíveis com quitridiomicose por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> em <i>Rhinella jimi</i>	41
RESUMO.....	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Análise da Quitridiomicose do Tegumento de <i>Rhinella jimi</i> para Detecção do <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Segundo Oliveira (2014), o Brasil dispõe a maior heterogeneidade de anfíbios do planeta. Diminuições de anfíbios em proporção mundial, vem sendo assinalado desde os meados de 1980, vários são as causas contribuinte para esse decréscimo, tais como: novos predadores introduzidos no ecossistema, mudanças climáticas, doenças infecciosas, destruição de habitats.

De acordo com Ramalho (2015), patogenias bastante ocorrentes em anfíbios possuem origem bacteriana, fúngica e viral. Entre as de razão bacteriana estão as dermatosepticemia bacteriana, micobacteriose, flavobacteriose e clamidiose. O distúrbio viral mais comum é a ranovirose, entre as doenças fúngicas, prevalentemente estão as quitridiomicrose, zigomicose, cromomicose, ictiofoníase e saprolegniose. No meio dessas enfermidades prejudiciais, a quitridiomicrose é a de maior relevância para os anfíbios, uma vez que causa grande consequência e em companhia com a ranovirose está no índice de ataque mais expressivo de animais silvestres.

As variações de temperaturas podem também auxiliar na infecção por patógenos, sendo que diversas espécies são vulneráveis as micoses que é ocasionada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K.Nichols,1999 (*Bd*) (COSTA et al., 2012). O *Bd* já foi detectado em várias regiões do Brasil, sendo apontado como principal responsável pela diminuição da diversidade de anfíbios (ASSIS, 2011).

A pele dos anfíbios é um órgão que contribui para a sobrevivência, cujo principal função está relacionada com a respiração cutânea, osmorregulação, excreção e defesa contra predadores e microrganismos patógenos, como bactérias e fungos (OLIVEIRA, 2014).

A infecção ocorre principalmente através do contato da pele com água contaminada, animais e substratos infectados, sendo que espécies que depositam seus ovos em água devem ter maiores chances de contrair a quitridiomicrose. Por outro lado, espécies terrestres são menos expostas à quitridiomicrose (RAMALHO, 2015).

A identificação de *Bd* é observada em ambientes de água doce, com produção de hifas, que danificam a queratina e a celulose. Em anuros de vida livre

a forma de infecção do *Bd* é o zoósporo e a sua transmissão ocorre na presença de água, pois o zoósporo é flagelado e sensível a desidratação (BURKE, 2011). Durante o ciclo de vida, o zoósporo ao fixar ao tegumento do anfíbio amadurece e em seguida sofre o processo de encistamento, onde o zoósporo se encapsula e inicia a formação de estruturas ramificadas, chamadas hifas, que se prolongam sobre a pele, formando no final, um corpo reprodutor em forma de esfera, o zoosporângio, que futuramente sofrerá quebra provocando a liberação dos novos zoósporos (OLIVEIRA, 2014).

O fungo *Bd* afeta as células externa da pele, o patógeno fica limitado a camada externa, onde terá a formação dos esporângios e liberação dos novos zoósporos onde macroscopicamente, observa-se a descamação, na pele dos anfíbios infectados. Devido a importante função que a pele dos anfíbios tem na manutenção e equilíbrio osmótico, estudos sugerem que a infecção por *Bd* inibem a absorção de sódio comprometendo o carregamento de água e a osmorregulação cutânea provocando distúrbio severo, levando o animal a óbito (BURKE, 2011).

O fungo *Bd* infecta o tecido queratinizado de anfíbios tendo potencial de ser letal para indivíduos pós-metamórficos. Esse patógeno está relacionado a declínios populacionais em todo o mundo de espécies de anfíbios. Apesar das infecções cutâneas por *Bd* poderem matar metamorfos e adultos, a maior parte das larvas sobrevive quando infectada e pode servir como reservatório de zoósporos infecciosos (VIEIRA et al., 2013).

O *Bd* é um fungo patogênico com zoósporos aquáticos flagelados que infectam tecidos cutâneos queratinizados, em rãs adultas e estruturas orais em girinos, os zoósporos espalham e infectam anfíbios por contato próximo ou direto durante o acasalamento (AGUIAR, 2016).

Somente as partes bucais do disco oral de anuros nas fases larvais são queratinizadas sendo os locais de infecção por *Bd*. As estruturas que contém queratina em girinos saudáveis são uniformemente pretas metálicas e simétricas (VIEIRA et al., 2013).

As manifestações e lesões acometidas pelas infecções diversificam entre as espécies. No início da contaminação, a patologia e os comportamentos são assintomáticos, as infecções em nível avançado possuem as determinadas características que são anorexia, letargia, posturas inadequadas. Em relação ao tegumento os anfíbios acometidos com a infecção possuem muda excessiva e

despigmentação do tegumento, hiperqueratose, hiperplasia e úlceras podem ser percebido (HERNÁNDEZ, 2014).

Deste modo o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença do fungo *B. dendrobatidis* em espécies de *Rhinella jimi* Stevaux, 2002, por Microscopia Óptica, Biologia Molecular e Exame externo.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, A. B. **Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de Floresta Atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia Geral) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BURKE, J. C. **Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia-SP**. 2011. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Paulista, São Paulo, 2011.
- COSTA, T. R. N.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; TOLEDO L. F. Mudanças climáticas seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. **Revista da Biologia**, Brasil, v. 8, p. 33-37, jun. 2012.
- HERNÁNDEZ, C. A. A. Amphibian Chytridiomycosis: A threat to global biodiversity. **International Journal of Aquatic Science**, v. 5, p. 94-108, 2014.
- OLIVEIRA, C.L. **Análise in vitro da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999)**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- RAMALHO, A.C.O. **Correlatos ecológicos da quitridiomycose em anuros do Cerrado**. 2015. 53 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- AGUIAR, A. V. Sazonalidade, Fatores Ambientais e Comportamento do Anfitrião Vinculado ao Risco de Doença em Tadpoles de Córrego. **Herpetologica**, v. 72, n. 2, p. 98-106, 2016.
- VIEIRA, C. A.; TOLEDO, L. LONGCORE, J. E.; LONGCORE, J. R. Body length of *Hylodes cf. ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 1, p. 195-199, 2013.

CAPÍTULO 1

Investigação da ocorrência de fungos *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) em pele da região dorsal, ventral dos membros e região inguinal de *R. jimi* nas duas localidades por microscopia óptica.

RESUMO

O Brasil possui uma grande diversidade de anfíbios que abrangem três grupos principais que são as Ordens Anura, Urodela e Gymnophiona. Anfíbios vêm sofrendo declínio populacional, devido vários fatores como mudanças climáticas, destruição de habitats e introdução de novas doenças infecciosas, sendo que a patogenia mais descrita nos últimos anos é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* causador da quitridiomicose. Esses fungos afetam as células da epiderme onde terá a formação dos esporângios e liberação dos novos zoósporos. Em uma análise macroscópica pode-se observar a descamação e despigmentação da epiderme. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência do fungo quitridio em *Rhinella jimi* Stevaux, 2002, na pele da região dorsal, ventral dos membros e região inguinal, em duas localidades de Picos, Piauí. Indivíduos de *R. jimi* foram coletados no período de 2016 a 2017. Análise da presença ou não do fungo *Bd* foi feita pelo método de microscopia óptica. Não foram visualizados nenhuma presença de hifas ou até mesmo de estruturas aumentadas no substrato queratinizado, mesmo os indivíduos apresentando os sinais característicos para a presença do fungo zoósporicos.

Palavras-chave: Quitridídios, *Rhinella jimi*, Semiárido.

ABSTRACT

Brazil has a large diversity of amphibians, encompassing three main groups that are the Anura, Urodela and Gymnophiona orders, amphibians have been suffering population decline, due to several factors such as climate changes, destruction of habitats and the introduction of new infectious diseases. The pathogenesis most described in recent years is caused by the *Batrachochytrium dendrobatidis* fungus that causes chytridiomycosis. These fungi affect the cells of the epidermis where they will have the formation of sporangia and release of the new zoóporos, in a macroscopic analysis can be observed the desquamation and depigmentation of the epidermis. The objective of the present work was to evaluate the occurrence of fungus Bd on the dorsal region, ventral limb and inguinal region of *Rhinella jimi* in the two localities of Picos, Piauí, Brazil, to evaluate the occurrence of chytrid fungus in *R. jimi* on the dorsal, ventral limb, and inguinal region of *R. jimi* in the two localities of Picos, Piauí. Methodology the individuals of *R. jimi* were collected from 2016 to 2017, the analysis of the presence or not of the fungus *Bd* was made by the optical microscopy method, were not visualized any presence of hyphae or even of increased structures in the keratinized substrate, even individuals presenting the characteristic signs for the presence of zoosporic fungus.

Key words: Chitridios, *Rhinella jimi*, Semi - arid.

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros vertebrados a ocupar o ambiente terrestre foram os anfíbios. Apesar desta conquista, os anfíbios não se estabeleceram completamente ao ambiente terrestre devido à grande dependência que apresentam em relação aos ambientes aquáticos ou úmidos para a sobrevivência e reprodução. A maior parte da respiração em anfíbios é feita pela pele, devendo ser mantida sempre permeável e frequentemente úmida. Essas particularidades fazem os anfíbios altamente vulneráveis à dessecação. Como meio de diminuir o risco de dessecação, anfíbios regularmente descansam durante o dia, evitando os raios solares e as altas temperaturas, entrando em atividade após o pôr-do-sol (HADDAD et al. 2008).

A palavra anfíbios (ANFI = duplo e BIOS = vida) se referem a organismos dependentes da água para sobreviver e se reproduzir. São chamados amnióticos aquáticos obrigatórios pois depositam seus ovos na água, apresentando dois ciclos de vida, a primeira é a fase larval denominada girino, que sofre modificações a metamorfose, e a segunda fase ocorre com o tempo o girino transforma em um anuro jovem possuindo aparência adulta, que vai aumentar de tamanho até começar a se reproduzir (VERDADE et al. 2010).

Os anfíbios abrangem três grupos principais que são as Ordens Anura, Urodela e Gymnophiona. Estes são morfologicamente muito distintos entre si. Os anuros são especializados em saltar, com patas traseiras bem desenvolvidas, corpos pequenos, ausência de cauda durante a fase adulta e olhos e cabeças grandes. A ordem Urodela é constituída por animais mais compridos, com patas dianteiras e traseiras com aproximadamente o mesmo tamanho e uma cauda comprida. A ordem Gymnophiona é composta por animais especializados na vida fossorial, possuindo o corpo alongado, ausência de patas e olhos rudimentares (WELLS, 2007).

Os anuros constituem o grupo mais bem-sucedido, de anfíbios com a fauna mais rica em diversidade no mundo. São diferenciados por possuir um ciclo de vida bifásico, sendo a fase larval comumente aquática e a fase adulta terrestre. Possuem a pele fina e úmida, essencial à manutenção da umidade e respiração cutânea. Inúmeras características dos anfíbios como a necessidade de conservar a

pele úmida para a efetuação da respiração cutânea e o fato de serem ectodérmicos são diretamente influenciadas por fatores ambientais como temperatura, umidade e pluviosidade. Essas condições ambientais podem ser fundamentais na atuação desses organismos (PREUSS, 2014).

A caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, possuindo uma grande biodiversidade. O bioma é pobremente mostrado em relação a anurofauna e revisões em relação a sistemática de anuros neotropicais. A escassez de informações naturalistas sobre a caatinga representa dificuldades adicionais para o estudo na região (VIEIRA et al. 2009).

A espécie *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) é um anuro conhecido na região do semiárido como sapo cururu ou sapo-boi. Possui grande distribuição no Nordeste do Brasil especialmente na Caatinga e vive em áreas próximas à habitação humana, lagoas, poças d'água, margens de riachos, estradas e rodovias. Possui hábito noturno, reprodução explosiva e alimentação composta principalmente por insetos. Adotam comumente uma estratégia de forrageador “senta e espera”, podendo ser considerado como um animal generalista e oportunista (SILVA, et al. 2010).

Os anuros são componentes significativos no fluxo de energia na cadeia trófica, tanto nos ecossistemas aquáticos como nos terrestres. Entretanto a importância da dieta destes animais vai mais além da satisfação de requerimentos energéticos, havendo possibilidade de serem componentes fundamentais de suas estratégias de defesa. Os Anuros possuem uma dieta com grande variedade de presas entre invertebrados e pequenos vertebrados (COSTA et al. 2016).

As doenças causadas por fungos vêm apresentando uma ameaça crescente a biodiversidade de espécies animais. Nos últimos anos uma única espécie que está dentro de um clado basal pouco reconhecido, ganhou destaque por sua capacidade patogênica, o Chytridiomycota, devido ao seu impacto na biodiversidade anfíbia global (FARRER et al. 2011).

Diversos membros da família Chytridiaceae são parasitas, infectando vegetais, algas, protistas e invertebrados. O *Batrachochytrium dendrobatidis* é o único membro da família Chytridiaceae que infecta os hospedeiros vertebrados. Este fungo invade as camadas queratinizadas da epiderme anfíbia em adultos e as partes bucais nas fases larvárias queratinizadas (GARMYN et al. 2012).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo de Campo Para Coleta de *Rhinella jimi*, Investigação de *bd* em Duas Localidades do Município de Picos.

Os espécimes de anfíbios *R. jimi* Stevaux (2002) deste estudo foram coletados em duas áreas antropizadas, sendo que o primeiro ambiente (A1) referente ao Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB) foram coletados um total de 25 anuros e no ambiente (A2) no Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (CHNSA) foram coletados a mesma quantidade de anuros, ambos ambientes situados na Cidade de Picos (Figura 1.1). Os espécimes foram submetidos a avaliação no próprio ambiente de estudo sendo que os critérios de investigação foram anuros apresentando descamações e despigmentação no tegumento, o material de interesse foi coletado com de auxílio de swab estéril, álcool 70%, pinça, luvas, após a coleta em campo os materiais foram levados e analisados no Laboratório de pesquisa III do campus SHNB. Foram realizadas coletas semanais por busca ativa. Um total de 50 espécimes foram analisados quanto a presença do fungo em cada localidade, em período noturno das 18 horas e 30 minutos as 22 horas.

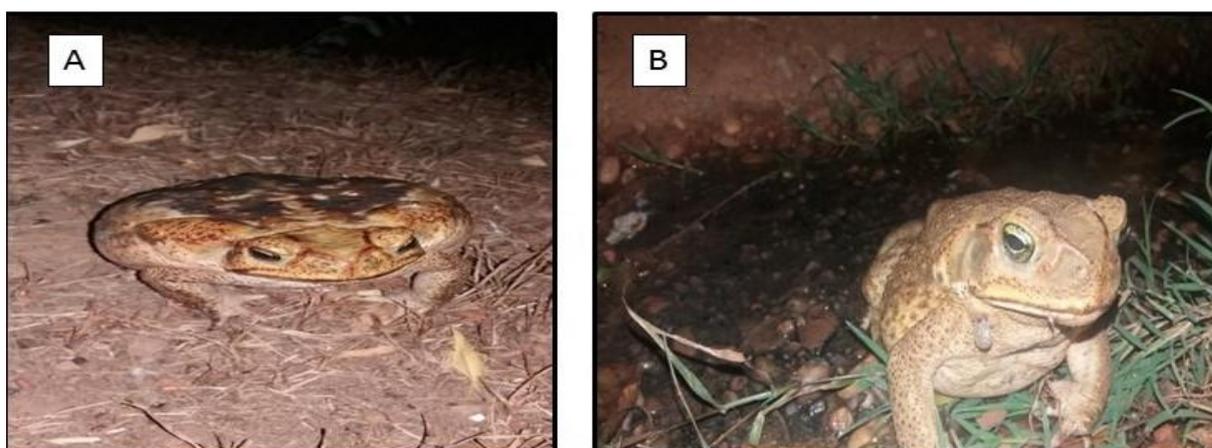


Figura 1.1: Espécimes investigadas no ambiente natural (A) Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (A1) e (B) Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (A2).

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

2.2 Coleta e Preparo dos Swabs

Para a investigação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* foram utilizados Swabs estéreis sendo que os mesmos foram utilizados nos membros (plantar) e região inguinal dos espécimes *R. jimi* coletados (Figura 1.2) com o auxílio de luva, máscara, pinça, tubos de ensaio contendo álcool 70% e etiquetas para o controle. Foi utilizado um swab para cada indivíduo e colocados em meio de cultura rico em álcool 70%. No ambiente foi realizado a verificação externa dos indivíduos adultos de *Rhinella jimi* se apresentavam despigmentação e descamações nos indivíduos.



Figura 1.2: Realização do procedimento em região inguinal e membros (plantar) nos espécimes *Rhinella jimi*. Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

2.3 Avaliação do Tegumento por Microscopia Óptica

Nos espécimes que apresentavam descamação de pele da região dorsal, ventral e membros esta foi removida e acondicionada em microtubos de polietileno 0,8ml contendo álcool 70%. Posteriormente foi submetida a análise por microscopia óptica (Figura 1.3), este procedimento não foi evasivo.

Esta análise foi realizada colocando a pele descamada sob lamina e lamínula dos 50 indivíduos analisados, e observada se havia alguma forma do fungo Bd. Esta análise foi realizada no município de Picos e as peles coletadas

foram enviadas e os resultados foram observados e confirmados pelo Professor José Ribamar Rocha do Campus Petrônio Portela de Teresina, no Laboratório de Micologia da UFPI.



Figura 1.3: Análise por microscopia óptica realizada no Campus de Picos Laboratório de Pesquisa III. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ambiente (A1), Campus UFPI – Picos, Piauí, foi possível encontrar um total de oito dos 25 espécimes coletados nesse ambiente apresentando descamações da pele e lesões evidentes nos membros (plantar) e região ventral. Já no segundo ambiente do Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (A2), os anuros coletados não apresentavam nenhuma lesão visível, específicas do *Bd*, porém os indivíduos apresentavam ectoparasitas da Família Ixodidae conhecido popularmente como carrapato, sendo que esses se alimentam de sangue, linfa e restos teciduais e representam um grupo de grande importância como vetores de doenças infecciosas devido utilizarem diversos hospedeiros e serem cosmopolitas podendo levar estes indivíduos a óbito e assim a uma possível diminuição dos espécimes *R. jimi*.

Nas análises por microscopia óptica das peles descamadas obtidas dos indivíduos coletados no ambiente (A1), não foram visualizados nenhuma presença de hifas ou até mesmo de estruturas aumentadas no substrato queratinizado, mesmo os indivíduos apresentando os sinais característicos para a presença do fungo zoóspóricos.

Os zoósporos é o principal meio para a dissipação do *Batrachochytrium dendrobatidis*, mas sua característica hábil para infeccionar o hospedeiro possui limitações pelo tempo necessário de encistamento e pela curta distância que pode se deslocar-se. Em água parada, os zoósporos se dispersam menos de 2cm antes de converte-se em cisto, sugerindo que não podem se deslocar à longas distâncias para encontrarem um hospedeiro. O *Batrachochytrium dendrobatidis* podem disseminar-se com facilidade de anfíbio para anfíbio, por meio de contato próximo ou direto no acasalamento, nos amontoamentos de girinos, ou em outros conjuntos de ações desses indivíduos que causem a aglomeração desses vertebrados. Por outro lado, acredita-se que se o *Batrachochytrium dendrobatidis* é atraído por componentes solúveis liberados pelo tegumento, os zoósporos conseguiriam disseminar-se mais do que o originalmente previsto, contribuindo desta forma a propagação do patógeno (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE et al., 2004).

Especulam que ambientes mais quentes atrapalham a disseminação do patógeno, por que o *Batrachochytrium dendrobatidis*, não possuiria o tempo

necessário para completar o seu ciclo de vida antes da troca da epiderme (BERGER et al., 2005).

Os resultados do presente estudo indicaram resultados negativos para *Bd* anfíbios do Semiárido Nordeste. Esta é uma nova infecção que vem se expandindo notoriamente, mas pela carência de estudos nesta região do estado do Piauí, foi idealizada a investigação pela importância dos anfíbios para o controle de vetores que causam danos à saúde humana e por fazerem parte da cadeia alimentar de outros indivíduos evitando um descontrole no ecossistema, fortalecendo mais pesquisas nesta área.

4 CONCLUSÃO

Apesar de não ter encontrado o fungo *Bd* em espécimes *R. jimi*, foi possível encontrar algumas descamações de pele e a mudança da coloração nos espécimes de *R. jimi* sendo estas características um indicativo da presença do quitridio no tegumento dos anfíbios acometidos com a doença. O fungo pode ainda não ter colonizado as regiões de clima Semiárido, mas é de grande importância esta preocupação e controle da doença, pois o fungo tem importante função na morbidade e mortalidade dos anfíbios principalmente os anuros que são a maior diversidade da classe Amphibia. É importante que se tenha mais estudos no Município de Picos, Piauí e a utilização de técnicas mais sensíveis e precisas, visando manter o ecossistema em equilíbrio.

REFERÊNCIAS

- BRITO, S. V.; FERREIRA, F. S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; COSTA, J. G. ALMEIDA, W. O.; COUTINHO, H. D. Phototoxic and modulatory effects of natural products from the skin of *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 82-87, 2012.
- BERGER, L.; MARANTELLI, G.; SKERRAT, L.F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n.1, p.47- 50, 2005.
- COSTA, D. F. S.; OLIVEIRA, J. C. D.; OLIVEIRA, J. F.; CHAVES, M. F.; SILVA, J. N.; SOUSA, T. P. Dieta de *Leptodactylus macrosternum* (Amphibia; Anura; Leptodactylidae) no Sertão da Paraíba, Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 4, p. 123-128, 2016.
- FARRER, R. A.; WEINER, L. A. BIELBY, J. GARNER, F. W. BALLOUX, F.; CLARE, F.; ANDERSON, L. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 46, p. 18732-18736, 2011.
- GARMYN, A.; VAN ROOJI, P.; PASMANS, F. HELLEBUYCK, T.; VAN DEN BROECK, W.; HAESEBOUCK, F. Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **PLoSOne**, v. 7, n. 4, p. 350-380, 2012.
- HADDAD, C. F. B.; GIOVANELLI, J. G. R.; ALEXANDRINO, J. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. **Dimensão Zoológica**, São Paulo, v. 11. 2008.
- PIOTROWSKI, J.; ANNIS, S. L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, v. 96, n. 1, p. 1-15, 2004.
- PREUSS, J. F. **Ocorrência de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de mata atlântica de interior no sul do Brasil**. 2014. 68 f. Dissertação (mestrado em ciências ambientais) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Santa Catarina, 2014.
- SALES, D. L. **Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.
- SILVA, L. A. M.; SANTOS, E. M.; AMORIM, F. O. Predação oportunística de *Molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera: Molossidae) por *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) na Caatinga, Pernambuco, Brasil. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 215-218, 2010.

SILVA, A. O. **Análise comparativa dos nichos espacial e alimentar de anuros em áreas de Caatinga e Mata Atlântica de Sergipe, Brasil.** 2014.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 161-172, 2010.

VIEIRA, W. L. S.; ARZABE, C.; SANTANA, G. G. Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri Paraibano, Nordeste do Brasil. **Oecologia Australis**, v. 11, n. 3, p. 383-396, 2009.

WELLS, K.D. Phylogeny, classification, and morphological evolution. In: WELLS, K. D. **The Ecology and behavior of amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007.p. 1-81.

CAPÍTULO 2

Investigação da ocorrência de fungos *Batrachochytrium dendrobatidis* em pele, membros e região inguinal de *Rhinella jimi* por Biologia Molecular.

RESUMO

A quitridiomicose é uma das doenças mais emergentes, que vem ameaçando a população mundial de anfíbios e é causada por uma espécie de fungo denominado *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tendo como objetivo analisar a ocorrência de fungos *Bd* em pele da região dorsal, ventral dos membros e região inguinal de *R. jimi* nas duas localidades por Biologia Molecular. A extração de DNA seguiu o protocolo Salting out, assim foi feita a leitura desse material na máquina Real Time (PCR), após todas as ciclagens, o mesmo foi transferido para o gel de agarose ocorrendo a corrida do mesmo, que foi analisado posteriormente. Através das análises não foi possível detectar a ocorrência de *Bd* na espécie *R. jimi*, nas duas localidades (A1 e A2) estudadas.

Palavras-chave: Vulnerabilidade, Tegumento, Anuro.

ABSTRACT

The chytridiomycosis is one of the most emerging diseases that threatens the world population of amphibians and is caused by a fungus species called *Batrachochytrium dendrobatidis*, with the objective of analyzing the occurrence of *Bd* fungi in the skin of the dorsal region, Ventral region of the limbs and inguinal region of *R. jimii* in both locations by Molecular Biology. The extraction of DNA followed the Salting out protocol, after which the material was read on the Real Time (PCR) machine. After all the cycling, the same was transferred to the agarose gel, which was analyzed. Posteriorly. Through the analysis it was not possible to detect the occurrence of *Bd* in the species *R. jimii*, in the two localities (A1 and A2) studied.

Key words: Vulnerability, Integument, Anuran.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil algumas espécies de anuros aparentam sofrer com a diminuição de suas de suas populações, sendo que ocorrem em biomas do cerrado e na Floresta Atlântica. Vários casos de decaimento populacional de anfíbios estão atrelados ao surgimento de novos patógenos (ASSIS, 2011).

Dentre os patógenos encontrados a quitridiomycose é uma das doenças mais emergentes, que vem ameaçando a população mundial de anfíbios e é causada por uma espécie de fungo denominado *Bd*, pois estes vem causando a mortalidade em massa e declínio populacional e a perda de diversas espécies de anfíbios do mundo. Alguns pesquisadores sugerem que a quitridiomycose é o maior responsável pela perda da diversidade de anuros já detectada (RAMALHO, 2015).

Os primeiros relatos do fungo em população de anfíbios na Mata Atlântica são datados de 1981 e estariam correlacionados aos primeiros declínios da população de anuros no Brasil. As mudanças que vem ocorrendo devido à ação humana, nessas áreas naturais, pode contribuir para um cenário excelente à disposição de doenças em alta escala (ASSIS, 2011).

O *Bd*, foi encontrado em mais de 500 espécies de anfíbios em todo o território global. Apesar da sua documentada atribuição no declínio de populações de anfíbios, sua atividade espacial e temporal, é mal conhecida (FAJARDO et al., 2016).

Em um mundo, globalizado, as disfunções infecciosas emergentes são um indício de ameaças crescente à variedade biológica e pode ter um efeito rápido e generalizado sobre a vida animal, levando espécies ao desaparecimento (SCHEELE, 2016).

Os anuros são vulneráveis as mudanças climáticas, e essas modificações de temperatura ameaçam a sobrevivência das espécies de anfíbios. As principais doenças são ocasionadas por infecção a pele desses vertebrados (ASSIS, 2012).

O *Bd*, é o exclusivo membro do Filo Chitridiomycota, com capacidade de causar doenças em vertebrados. O ciclo de vida do *Bd* possui duas etapas fundamentais, a fase móvel no qual é distribuído pela água, o zoósporo é flagelado e a fase imóvel, desempenhado por talo monocêntrico, que acontece para concluir o ciclo assexuado (Figura 2.1) (ARELLANO, 2013). O fungo *Bd* absorve nutrientes

formando uma estrutura aumentada e fechada o esporângio, o mesmo pode desenvolver rizoides que facilitará na fixação, e na sua parte interna após a maturação irão ser encontrados novos zoósporos formados (PREUSS 2014).

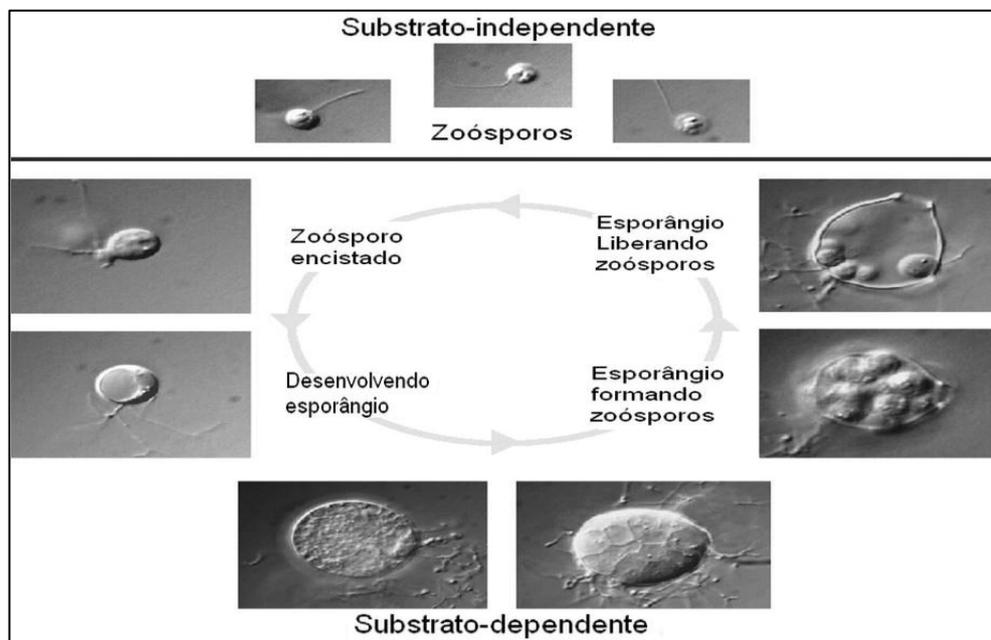


Figura 2.1: O ciclo de vida do *Bd*. Na porção substrato-independente do ciclo, os zoósporos flagelados são livres nadantes. Na porção substrato-dependente, os zoósporos se encistam e se desenvolvem em esporângios, que produzem e liberam novos zoósporos.

Fonte: OLIVEIRA, 2014.

O fungo *Bd* é o gerador da quitridiomiose, fator principal da diminuição e mortalidade de populações de anfíbios. O *Bd* é abundantemente distribuído, infecta uma extensa gama de hospedeiros. Estas particularidades aumentam o sucesso hospedeiro (LAMBERTINI, 2016).

Os estudos com fungos zoospóricos contribuem de forma significativa para o conhecimento de sua diversidade (ZOTTARELLI; ROCHA, 2007). Esse grupo tem ampla importância ambiental, pelo fato de várias espécies continuarem microscópicas posteriormente ao seu aumento e, logo, são os primeiros fungos a estrear o processo de degradação de material orgânico como quitina, queratina, celulose e hemicelulose. Embora saiba-se que esses fungos são amplamente disseminados em distintos ambientes, ainda há muito o que desvendar a respeito desse grupo. Isso porque técnicas empregadas para isolamento e cultivo de outros fungos comumente não agradam as necessidades dos Chitridiomycetes para

crecerem em laboratório, atenuando o interesse de pesquisadores em especializarem-se nesses fungos (SILVA; COELHO 2006).

Atualmente, o PCR em tempo real, apesar de caro, é o método mais utilizado, por ser rápido, não invasivo, altamente sensível e por possuir especificidade maior do que qualquer outro método de diagnóstico disponível (HYATT et al. 2007).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo e Coleta do Material para Avaliação do *Batrachochytrium dendrobatidis* por Biologia Molecular nos Indivíduos de *Rhinella jimi*

Os espécimes de *Rhinella jimi* deste estudo foram coletados em duas áreas antropizadas, no primeiro ambiente (A1) o Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB) foram coletados um total de 25 anuros e no segundo ambiente (A2) o Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (CHNSA) foram coletados a mesma quantidade de anuros, ambos ambientes situados na cidade de Picos. Os espécimes foram submetidos a avaliação no próprio ambiente de estudo os critérios de investigação foram anuros que apresentavam descamação e despigmentação do tegumento, o material de interesse foi coletado com auxílio de swab estéril, álcool 70%, pinça, luvas, após a coleta em campo os materiais foram levados e armazenados no laboratório de pesquisa III e a análise do swab foi realizado no Laboratório de Pesquisa I.

Foram coletados um total de 50 espécimes de anuros. As análises moleculares consistiram da extração do DNA dos swabs por meio do Protocolo Salting out. Para obtenção e manipulação do Mix foi utilizado o fluxo laminar pois é um ambiente estéril e livre de contaminação. Neste local de forma alguma deve ser manipulado DNA. Quando o mix ficou pronto este foi distribuído em placa de PCR e adicionado o DNA e levados para a ciclagem na máquina 7500 Fast Real-Time, depois de todo esse procedimento o gel foi confeccionado, e foi realizado o preparo de 5 µL da amostra de DNA e adicionado 1 µL de gel red, para corar e ser possível visualizar a corrida do DNA.

Para a investigação quanto a presença do fungo, foi realizada coletas dos *R. jimi* por busca ativa no período de 2016 a 2017, compreendendo a estação chuvosa para avaliação ao fungo *Bd*. As buscas foram noturnas e os anuros analisados foram submetidos a análise no próprio habitat.

Os animais investigados foram fotografados e submetidos a análise do fungo. A análise consistiu em se fazer SWAB do tegumento de membros e região inguinal dos espécimes coletados em A1 e A2 (Figura 2.2). O SWAB destas

regiões foi separadamente colocado em meio de cultura rico em álcool 70% e conservados em refrigerador -20 °C até o momento do uso.

A análise da presença ou não do fungo foi feita PCR – Reação de Cadeia Polimerase no laboratório de Biologia Molecular de Picos com o auxílio do Professor doutor e pesquisador Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, campus Picos.



Figura 2.2: Análise não invasiva do espécime *Rhinella jimi* por meio de swab estéril

Fonte: Elaborado pelo autor

2.2 Extração do DNA, seguindo o Protocolo *Salting Out*

I – Material em tubo de ensaio > centrifugado > descarte do sobrenadante > microtubo de 2 ml > Adição de 180 µL do tampão ATL e 20 µL de Proteinase K > vortexado > incubação 56°C por 40 minutos.

II – Adição de 750 µL de NaCl 5.4 M > misturado no vortex > centrifugação (9000 x g por 5 minutos) > descarte do sobrenadante.

III – Adição de 1000 µL de etanol absoluto > centrifugação (9000xg por 2 minutos) > descarte do sobrenadante

IV – Adição de 700 µL de etanol 70% > centrifugação (9000xg por 2 minutos) > descarte do sobrenadante > tubo segue em aquecimento (55°C por 10 minutos)

V – Amostras de DNA foram diluídas em 50 µL de água ultrapura e armazenadas em freezer convencional

2.3 Procedimentos Utilizados para Realização da Técnica de PCR (Reação De Cadeia Polimerase)

A capela de Fluxo laminar foi utilizada para a manipulação do Mix do PCR, pois o ambiente deve está livre de contaminação do meio ambiente, para garantir a segurança da manipulação, é feito somente o Mix do PCR no fluxo este é um método de amplificação de DNA sem o uso de um organismo vivo.

Os tubos com DNA não podem entrar na capela de fluxo laminar, os reagentes da PCR que foram manipulados na capela foram o Primer, Master Mix e H₂O. Esses reagentes foram multiplicados pelo número de amostras que foram utilizadas, e sempre deve ser feita duas amostras a mais. Uma para Controle sem DNA e outra para Erro Amostral.

Após todo o procedimento dentro do Fluxo Laminar, o Mix foi distribuído em uma quantidade de 15 µL na placa de PCR e adicionado 5 µL de DNA. Para o controle negativo adicionou-se 5 µL de água no Mix, para ficar com o volume de 20 µL. Estes devem ser levados para ciclagem na máquina 7500 Fast Real-Time. E a ciclagem do PCR foi a 95 graus por 5 minutos, 40 ciclos de 95 graus por minutos, 56 graus por um minuto, 72 graus por 1 minuto e um passo final de 72 graus por 5 minutos.

Para preparo do Gel de Agarose foi pesado 1,2% de agarose e adicionado 100 ml de TBE 0,5 x novo Ferrer uma solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), ácido bórico e EDTA e colocado na base para solidificar, deve ser completado a cuba onde é feito o gel com TBE 0,5 µL.

Para fazer a corrida do gel foi preparado 5 µL da amostra de DNA e adicionado 1 µL de gel red (corante), na cuba como o DNA tem carga negativa vai correr para o lado positivo em razão da fonte de energia aplicada. Depois de realizar a corrida do DNA no gel, as bandas formadas foram visualizadas aplicando luz Ultravioleta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível a detecção do fungo *Bd* em tegumento de *R. jimi*, em ambas técnicas utilizadas a Microscopia óptica e por PCR- Reação de Cadeia Polimerase. De acordo com (BERGER, et al., 2005), especulam que ambientes mais quentes atrapalham a disseminação do patógeno, por que o *Bd*, não possuiria o tempo necessário para completar o seu ciclo de vida antes da troca da epiderme.

Segundo Boyle, et al. (2007), a detecção molecular surgiu da necessidade de uma forma não invasiva de detectar *Bd* em anfíbios com maior sensibilidade e rigor. A especificidade e a sensibilidade fazem da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) uma técnica robusta para a detecção de quitrídios numa variedade de amostras, permitindo o processamento de um grande número destas num curto espaço de tempo.

O anuro *R.jimi* é empregue na medicina tradicional para tratamento de doenças, tanto humanas quanto veterinárias (inflamações, infecções e ferimentos) (FERREIRA et al., 2009). Estudos recentes já descrevem atividades microbiológicas para extratos adquiridos desses animais, que provam ação antileishmânia e antitripanossoma, além de reagir com diferentes linhagens bacterianas e apresentar atividade citocida (TEMPONE, et al., 2008; BRITO, et al., 2012). Estudos apresentam as gorduras animais sendo indicadas para o tratamento de muitas enfermidades incluindo processos inflamatórios causados ou não por infecções (COSTA NETO; ALVES, 2010; FERREIRA et al., 2009, 2011, 2012).

Nos dias de hoje, o PCR quantitativo (PCR em tempo real), independentemente de ser caro, é o método mais empregado, por ser acelerado, não invasivo (possibilita detecção múltipla de animais vivos), extremamente sensível e por possuir especificidade maior do que qualquer outro método de diagnóstico disponível (BOYLE et al. 2007).

Entender o patógeno, os efeitos sobre os organismos, a amplitude de atuação e a dinâmica de interação com seu hospedeiro é bastante difícil. Para se ter uma ideia, o *Bd* vive exclusivamente no tegumento dos anfíbios adultos e na peça bucal dos girinos, alimentando-se de queratina. A queratina é uma substância que as células da pele fabricam e que serve como proteção e ornamento. Nossas

unhas e nossos cabelos, por exemplo, são compostos de queratina. Mas o Bd é um fungo que ataca apenas os anfíbios (VERDADE, et al., 2010).

No presente estudo a avaliação por Biologia Molecular para detecção do *Bd* nos espécimes de *R.jimi* de A1 e A2 não foi possível e todos os resultados foram negativos isto pode ter ocorrido, devido sua fragilidade e especificidade de dispersão do fungo Bd, devido ao clima Semiárido Nordeste, ou até mesmo pelo fato de que a espécie *Rhinella jimi*, ser predominantemente de vida terrestre.

4 CONCLUSÃO

Na análise por Biologia Molecular não foi possível detectar o fungo *Bd*, nas duas localidades A1 e A2. É importante novas pesquisas sejam realizadas para controle e prevenção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, pois estes estão envolvidos na morbidade e mortalidade de anfíbios que pode atuar como reservatório potencial para transmissão da doença fúngicas nos anfíbios neotropicais.

REFERÊNCIAS

- ARELLANO, M. L. **Susceptibilidad y sensibilidad de algunas especies de anuros a la infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis***. 2013. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- ASSIS, A.B. **Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de Floresta Atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia Geral) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BERGER, L.; MARANTELLI, G.; SKERRAT, L.F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n.1, p. 47- 50, 2005.
- BOYLE, A. H. D; OLSEN, V. BOYLE, D. B.; BEGER, L.; OBENDORF, D. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.
- BRITO, S. V.; FERREIRA, F. S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; COSTA, J. G. M.; ALMEIDA, W. O.; COUTINHO, H. D. M. Phototoxic and modulatory effects of natural products from the skin of *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22: 82-87, 2012.
- COSTA NETO, E. M.; ALVES, R. R. N. **Zooterapia**: os animais na medicina popular brasileira. Recife, 1. ed. Pernambuco, Brasil, NUPEEA, 2010.
- FAJARDO, G. R.; TOLEDO, L. F.; MOTT, T. Saltar para uma armadilha: alta prevalência de fungos chytrid nos microhábitats preferidos de um sapo especialista em bromélias. **Doenças dos organismos aquáticos**, v. 121, n. 3, p. 223-232, 2016.
- FERREIRA, F. S.; BRITO, S. V.; RIBEIRO, S. C.; ALMEIDA, W. O.; ALVES, R. R. N. Zootherapeutics utilized by residents of the community Poco Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 21, 2009.
- FERREIRA, F. S.; SILVA, N. L. G.; MATIAS, E. F. F.; BRITO, S. V.; OLIVEIRA, F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; ALMEIDA, W. O.; ALVES, R. R. N. Potentiation of aminoglycoside antibiotic activity using the body fat from the snake *Boa constrictor*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 503-509, 2011.

FERREIRA, F. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; COUTINHO, H. D. M.; Almeida, W. O.; Alves, R. R. N. The trade in medicinal animals in northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-20, 2012.

HYATT, A. D.; BOYLE, D. G.; OSLEN, V.; BOYLE, D. B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K. HERP, M.; HINES, H.; PHILOTT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLEASON, F.; COLLING, A. Diagnostic assay and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diases of Aquatic Organisms*, v. 73, n. 1, p. 75-192, 2007.

LAMBERTINI, C. Variação fenotípica local no fungo anfíbio-matador prediz a dinâmica da infecção. **Ecologia Fúngica**, v. 20, p. 15-21, 2016.

RAMALHO, A. C. O. **Correlatos ecológicos da quitridiomycose em anuros do Cerrado**. 2015. 53 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SCHEELE, B. C. Amplificação reservatório-hospedeiro do impacto da doença em um anfíbio ameaçado. **Biologia da Conservação**, 2016.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica, São Paulo, out. 2006.

TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N. N.; ANDRADE J. R. H. F.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* paratoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2008.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 161-172, 2010.

ZOTTARELLI, C. L. A. P.; ROCHA, M. Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), SP, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Minas Gerais, v.21, n.1, p.125-136, jan./mar. 2007.

CAPÍTULO 3

Investigação de lesões compatíveis com quitridiomicose por *Batrachochytrium dendrobatidis* em *Rhinella jimi*

RESUMO

A quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, sendo um fungo aquático. Fungos estes envolvidos na diminuição e desaparecimento de anfíbios em todo o mundo. Este trabalho objetivou análise de lesões ocasionadas por *Bd* em 50 espécimes de *Rhinella jimi* coletados. O tegumento foi analisado por meio de exame externo da pele descamada e por análise da despigmentação. Através destas análises foi possível detectar a ocorrência de lesões característica da quitridiomicose como a descamação de pele e membros e despigmentação da pele da região dorsal em 16% dos indivíduos analisados no local A1.

Palavras chave: Lesão, Exame externo, Pele.

ABSTRACT

Chytridiomycosis is a disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, being an aquatic fungus. These fungi is response by the decrease and disappearance of amphibians around the world. This work aimed was analyzed lesions caused by bd in the *Rhinella jimi* collected. The Skins were analyzed by external exam of the desquamated skin and by analysis of the depigmentation. The analysis, it was not possible to detect the occurrence of usions compatible of the chitrydiomocosis disease (Bd) in 16% of specimes evaluated in location A1.

Keywords: Lesion, External exam, Skin.

1 INTRODUÇÃO

O Semiárido Nordestino é visto ainda como uma região de poucas pesquisas devido às condições socioeconômicas. No entanto, apresenta atributos peculiares com possibilidades de convivência adequada com o ecossistema (COUQUEIRO 2012).

Em relação aos anfíbios, a situação para o semiárido nordestino é decepcionante pela pouca quantidade de trabalhos sobre as espécies ocorrentes demonstraram que a caatinga é um dos ecossistemas brasileiros menos evidenciados para os anuros (NOJOSA; SANTOS 2005).

A quitridiomicose anfíbia é símbolo de como o início de doenças fúngicas auxilia no grande desaparecimento da biodiversidade durante a atual extinção em massa. Dentro do filo fúngico primitivo e diversificado de Chytridiomycota, os dois originadores causais da quitridiomicose são os *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e *Batrachochytrium Salamandrivorans* (Bsal) divergiu cerca de 67 milhões de anos atrás, para se tornarem os únicos tipos que ganharam destaque por terem se adaptado para colonizar Vertebrados. Entretanto, esses agentes patogênicos demonstram variedade de espécies hospedeiras distintas, com Bsal infectando principalmente uma única Ordem de hospedeiros, os Caudatos (salamandras), enquanto Bd infecta mais 700 espécies em todas as três ordens de Anphibia (FARRER et al., 2017).

A quitridiomicose tem conquistado grande destaque no meio científico, a partir da década dos 1990, pela sua possível associação com a mortandade em massa de anfíbios. Trata-se de uma infecção tegumentar, transmissível por água e ocasionada pelo fungo *Bd*, reconhecido como o primeiro Quitridiomiceto a parasitar vertebrados e originalmente descrito como um gênero novo. A quitridiomicose lesiona fundamentalmente os indivíduos pós-metamorfoseados, no entanto possui pouca especificidade por hospedeiros e uma eficiente habilidade de sobrevivência no ambiente na escassez eventual de anfíbios. Quitridiomicose é uma enfermidade micótica do tegumento, sensibilizando os anfíbios e originalmente iniciou nos anos 90, provavelmente, como uma nova patologia relatada pela primeira vez em 1998.

Apesar de que a doença tenha sido tase de estudo em vários países o instrumento de contaminação mantém-se inexplorado (HERNÁNDEZ et al., 2014).

A quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo *Bd*, sendo um fungo aquático. Fungos estão envolvidos na diminuição e desaparecimento de anfíbios em todo o mundo. As populações de anfíbios acometidos com essa doença possuem corpos enfraquecidos, com deformações e grande prevalência de irregularidade. A quitridiomicose foi identificada como doença emergente devido a sua disseminação atual em novas populações, sendo mencionada como o fator principal da extinção em escala global de anfíbios. (AGOSTINE et al., 2015)

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes de anfíbios *Rhinella jimi* deste estudo foram coletados em duas áreas antropizadas, sendo que o primeiro ambiente (A1) o Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB) foram coletados um total de 25 anuros e segundo ambiente (A2) o Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (CHNSA) foram coletados a mesma quantidade de anuros, estes foram submetidos a avaliação no próprio ambiente de estudo, os critérios de investigação foram anuros que apresentavam descamação e despigmentação do tegumento.

No período compreendidos entre os meses de maio e junho de 2017 através de busca ativa nas duas localidades (A1 e A2) um total de 50 espécimes foram analisados quanto a presença do fungo em cada localidade, com o auxílio de luva, máscara, pinça, tubos de ensaio contendo álcool 70% e etiquetas para o controle, em período noturno a partir das 18 horas e 30 minutos as 22 horas.

2.1 Análise da Quitridiomiose do Tegumento de *Rhinella jimi* para Detecção do *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Os espécimes utilizados para análise foram submetidos ao exame externo quanto a presença de lesões ocasionados pelo fungo. Foram fotografados e analisados quanto a pigmentação do tegumento, descamação da pele e lesões evidentes na região inguinal e membros (plantar) (Figura 3.1 A e B).

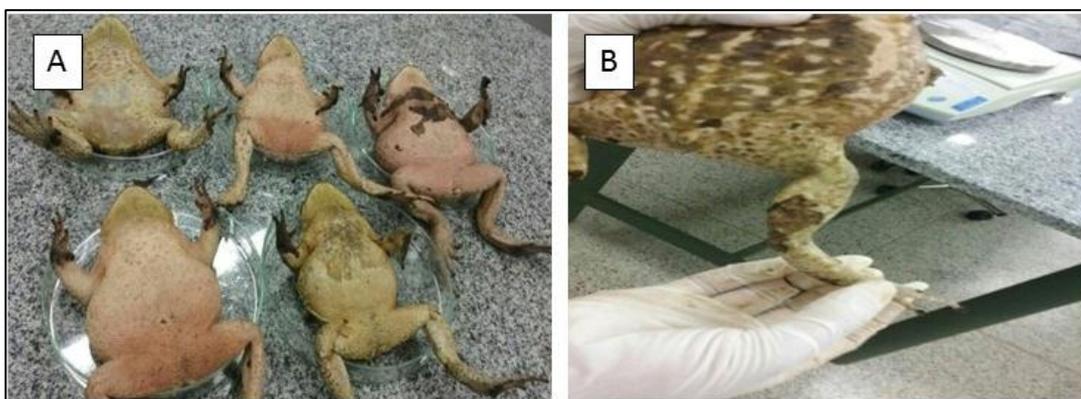


Figura 3.1: (A) Lesões vista Ventral. (B) Lesões na região membros posteriores e dorsal

Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Estes anfíbios que apresentavam a descoloração visível e o tegumento descamados foram submetidos a microscopia óptica no laboratório de pesquisa III, no Campus de Picos e encaminhadas também ao Professor José Ribamar Rocha do Laboratório de Micologia UFPI, Campus Petrônio Portela, de Teresina. Em ambas as análises por microscopia óptica o *Bd* não foi detectado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 50 espécimes de *R.jimi* coletados em A1 e A2 foi possível encontrar um total de oito espécimes de anuros apresentando descamações da pele e lesões evidentes nos membros e região ventral 16%. No A2, os anuros coletados não apresentavam nenhuma lesão visível, específicas da quitridiomicose, porém os indivíduos apresentavam ectoparasitas da Família Ixididae (Carrapato), sendo que esses parasitas se alimentam de sangue, linfa e restos teciduais e representam um grupo de grande importância como vetores de doenças infecciosas devido utilizarem diversos hospedeiros e serem cosmopolitas podendo levar estes indivíduos a óbito e assim a uma possível diminuição dos espécimes *R.jimi*.

Os espécimes *R.jimi* analisados por meio de exame externo, apresentavam, uma despigmentação visível da pele quando comparados com outro indivíduo de coloração característica normal. Estas alterações podem confundir com outras espécies de *Rhinella* (Figura 3.2) houve uma grande perda da pele principalmente nos membros (plantar), e região inguinal.



Figura 3.2: mudança de pigmentação nos espécimes *Rhinella jimi*. **Fonte:** Elaborado pelo Autor (2017).

Dentre os vertebrados terrestres, os anfíbios são um grupo de animais que possui grande sensibilidade as variações dos fatores ambientais, esses organismos são ectotérmicos, a sua temperatura interna do corpo varia de acordo com a temperatura ambiente, diferente dos tetrápodes endotérmicos, que conseguem manter uma temperatura corporal interna constante pela produção metabólica de calor. Os anfíbios se nutrem principalmente de insetos e consomem uma quantidade massiva destes organismos por ano. A retirada desses anfíbios em um ambiente deve, portanto, acarretar em desequilíbrio ecológico (TOLEDO et al., 2010).

As análises por meio de exame externo indicou lesões compatíveis com quitridiomicose caracterizada pela descamação da pele principalmente dos membros, região inguinal e mudança de pigmentação dos espécimes. Apesar de não ser detectada por métodos usuais, novas tecnologias devem ser desenvolvidas para comprovar a presença do fungo *Bd*.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que apesar de ser encontrada as lesões características de quitridiomicose, aparentemente não há indícios da ocorrência deste fungo nas localidades estudadas. Apesar de não ter indícios da presença de fungos quitridios nos anfíbios analisados é necessária uma observação mais detalhada utilizando técnicas mais avançadas para a confirmação e o uso de técnicas moleculares podem auxiliar na comprovação do *Batrachochytrium dendrobatidis* na região de Picos, Piauí.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M. G.; BURROWES, P. A. Infection patterns of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agro-ecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, v. 14, n. 2, p. 113-126, 2015.

COUQUEIRO, J. R. O semiárido brasileiro: lugar de vida do/a camponês/a. *Revista Eletrônica Entrelaçando*, v. 1, n. 6, p. 47-60, 2012.

FARRER, R. A.; MARTEL, A.; VERBRUGGHE, E.; ABOUELLEIL, A.; DUCATELLE, R.; LONGCORE, J. E.; CUOMO, C. A. Genomic innovations linked to infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nature Communications*, v. 8, p. 14742, 2017.

HERNÁNDEZ, C. A. A.; DOSTA, M. D. C. M. PARTIDA, A. H.; ALBERTO, J.; TORRES, R.; MEJIA, J. C.; ANDRADE, R. D. L. Amphibian Chytridiomycosis: A threat to global biodiversity. *International Journal of Aquatic Science*, v. 5, p. 94-108, 2014.

NOJOSA, D. M. B.; SANTOS, E. M. Herpetofauna da área de Betânia e Floresta, Pernambuco. *Análise das variações da biodiversidade do bioma Caatinga*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 275-289, 2005.

TOLEDO, L. F.; CARVALHO, S. P.; SANCHEZ, C.; ALMEIDA, M. A.; HADDAD, C. F. B. A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios/The review of the Brazilian Forest Act: harmful effects on amphibian conservation. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 4, p. 35, 2010.



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- Tese
- Dissertação
- Monografia
- Artigo

Eu, Maria Daniela Ribeiro Barbosa, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação Investigação de fungos Quitrídios em tegumento de *Rhinella jimi* Stevaux, 2002 (Anura Bufonidae) de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 29 de Janeiro de 2018.

Maria Daniela Ribeiro Barbosa
Assinatura