



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS - CSHNB
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



LINARIA FRANCISCA DO NASCIMENTO PEREIRA

ANÁLISE DO TEGUMENTO E TECIDO QUERATINIZADO EM *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COMO PREDITORES DA QUITRIDIOMICOSE

PICOS - PIAUÍ

2021

LINARIA FRANCISCA DO NASCIMENTO PEREIRA

ANÁLISE DO TEGUMENTO E TECIDO QUERATINIZADO EM *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COMO PREDITORES DA QUITRIDOMICOSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Campus Senador Helvídio Nunes de Barros
Biblioteca Setorial José Albano de Macêdo
Serviço de Processamento Técnico

P436a Pereira, Linaria Francisca do Nascimento

Análise do tegumento e tecido queratinizado em *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) como preditores da quitridiomicose / Linaria Francisca do Nascimento Pereira – 2021.

Texto digitado

Indexado no catálogo *online* da biblioteca José Albano de Macêdo-
CSHNB

Aberto a pesquisadores, com as restrições da biblioteca

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal
do Piauí, Licenciatura em Ciências Biológicas, Picos-PI, 2021.

“Orientadora: Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca”.

1. Anuros-Piauí. 2. Quitridiomicose. I. Fonseca, Mariluce
Gonçalves. II. Título.

CDD 597.87

LINARIA FRANCISCA DO NASCIMENTO PEREIRA

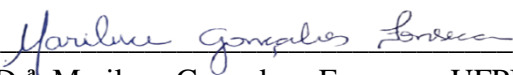
ANÁLISE DO TEGUMENTO E TECIDO QUERATINIZADO EM *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COMO PREDITORES DA QUITRIDIOMICOSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

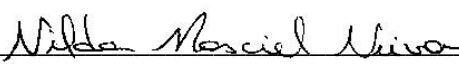
Orientadora: Profa. Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca

Aprovado em 12 de julho de 2021.

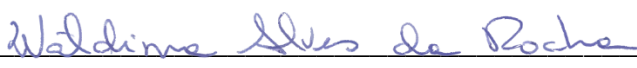
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Mariluce Gonçalves Fonseca - UFPI
(Orientadora)



Prof.^a Dr.^a Nilda Masciel Neiva - UFPI
(Membro)



Prof.^aDr.^a Wáldima Alves da Rocha - UFPI
(Membro)

Dedico este trabalho a minha família,
em especial a minha mãe, a maior
incentivadora das realizações dos
meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida. A minha família, em especial a minha mãe Francisca Maria do Nascimento, pelo apoio que serviu de alicerce para as minhas realizações. Aos meus irmãos, Aline dos Santos Pacheco e José Francisco do N. Brandão, pela amizade e atenção dedicadas quando sempre precisei. Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca, por todo incentivo e ensinamentos durante essa jornada. Também agradeço as minhas amigas Raiane Conrado e TÁCILA Raiane pelo excepcional apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado no decorrer de toda a pesquisa. Por fim, agradeço a todos que torceram por mim e que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste sonho, por toda força e carinho. A todos vocês muito OBRIGADA!

RESUMO

As populações de anfíbios têm apresentado uma redução severa nas últimas décadas, e as doenças infecciosas são um dos fatores dessa redução. A quitridiomocose, vem sendo apontada como a mais importante responsável pela mortalidade e declínio de populações de anfíbios causada pelo fungo aquático *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) que infecta o tecido cutâneo queratinizado de indivíduos adultos e formas larvais. Neste trabalho foram analisados espécimes adultos e girinos de *Leptodactylus macrosternum* quanto a presença de lesões compatíveis com a quitridiomocose. Para tanto, adultos de *L. macrosternum* foram coletados mensalmente por busca ativa entre agosto 2019 a fevereiro 2020. Os espécimes encontrados foram analisados por exame externo para identificação de lesões no tegumento da região dorsal, ventral e membros que caracterizam a quitridiomocose, posteriormente medidos no seu comprimento rostro-cloacal (CRC), fotografados e liberados no local onde encontrados. Para avaliação dos girinos foram utilizados lotes fixados coletados em 2014 e 2019, e submetidos a triagem do estágio de desenvolvimento, medidos no tamanho do corpo e cauda, e em seguida analisados quanto a anatomia externa do corpo, cauda e disco oral em microscópio estereoscópio. Todos os espécimes foram coletados em corpos d'água do *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, UFPI de Picos. Foram analisados 20 espécimes adultos (3 da estação seca e 17 da estação chuvosa) em que não apresentavam lesões compatíveis da doença quitridiomocose. As regiões dorsal, ventral e membros estavam com coloração padrão da espécie preservadas e tegumento íntegros. Os 48 girinos analisados encontravam-se em dois estágios de desenvolvimento larval 36 e 42, e não exibiam alterações compatíveis com as ocasionadas pelo fungo Bd. A análise macroscópica do corpo, cauda e disco oral dos girinos indicou estruturas queratinizadas preservadas e integras. O tamanho do corpo dos adultos e girinos também encontrava - se de acordo com o descrito para a espécie. Deste modo pode-se inferir que macroscopicamente tegumento e tecidos queratinizado dos adultos e girinos de *L. macrosternum* analisados não apresentaram sinais da quitridiomocose.

Palavras-chave: Anuros. Piauí. Quitridiomocose.

ABSTRACT

Amphibian populations have shown a severe reduction in recent decades and infectious diseases are one of the factors for this reduction. Chytridiomycosis has been identified as the most important responsible for the mortality and reduction of amphibian populations caused by the aquatic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), which infects the keratinized skin tissue of adult individuals and larval forms. In this work, adult and tadpole specimens of *Leptodactylus macrosternum* were analyzed as for the presence of lesions compatible with *chytridiomycosis*. For this purpose, adults of *L. macrosternum* were monthly collected through active search between August 2019 and February 2020. The specimens found were analyzed by external examination to identify lesions in the integument of the dorsal, ventral and limbs regions that characterize chytridiomycosis. These specimens were later measured according to their snout-vent length (SVL), photographed, and released back in the place where they were found. Regarding the assessment of the tadpoles, fixed lots collected in 2014 and 2019 were utilized, and submitted to the development stage triage. They were measured according to their body and tail size, and then analyzed as for the external anatomy of the body, tail and oral disc under a stereomicroscope. All specimens were collected from water bodies of the Senador Helvécio Nunes de Barros Campus, UFPI, in Picos. Twenty adult specimens (3 from the dry season and 17 from the rainy season) were analyzed. They did not present compatible lesions of the chytridiomycosis disease. The dorsal, ventral and limb regions were preserved with standard coloring of the species and intact integument. The 48 tadpoles analyzed were in two stages of larval development, 36 and 42, and did not show changes compatible with those caused by the Bd fungus. The macroscopic analysis of the body, tail and oral disc of the tadpoles indicated intact and preserved keratinized structures. The body size of adults and tadpoles was also in accordance with that described for the species. Thus, it can be inferred that, macroscopically, integument and keratinized tissues of the *L. macrosternum* adults and tadpoles analyzed did not show signs of chytridiomycosis.

Keywords: Anurans. Piauí. Chytridiomycosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Anfíbios	13
3.2 <i>Leptodactylus macrosternum</i> (Anura: Leptodactylidae).....	13
3.3 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd)	14
3.4 Quitridiomicose.....	15
4 METODOLOGIA.....	16
4.1 Área de estudo.....	16
4.2 Coleta e Avaliação dos adultos de <i>Leptodactylus macrosternum</i>.....	16
4.3 Coleta e Avaliação dos girinos de <i>L. macrosternum</i>	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Adultos.....	19
5.2 Girinos.....	20
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
APÊNDICE	--

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios da ordem Anura que apresentam maior diversidade de espécies no mundo são representados pelos sapos, rãs e pererecas. Cerca de 5.300 espécies desses animais são conhecidas no mundo, sendo 800 desse número de espécies no Brasil (HADDAD, *et al.*, 2008).

Grande número de espécies de anfíbios são exemplos de como os animais evoluíram de um ambiente predominantemente aquático para uma vida em ambiente terrestre. Assim, diz que essas espécies apresentam ciclo de vida bifásico, sendo a fase larval aquática e uma fase adulta ou pós-metamórfica terrestre. Por apresentarem a pele úmida e permeável auxiliando no seu processo de respiração cutânea e podendo ter a ocupação de dois habitats, aquáticos e terrestres, os anfíbios são considerados como indicadores sensíveis a inúmeros fatores ambientais (BLAUSTEIN, 1994).

Alterações climáticas é altamente suscetível quando concerne ao caso dos anfíbios, por serem animais ectotérmicos, sem controle de temperatura corporal. Assim, influenciando no metabolismo de forma direta e indireta desses animais e o seu tempo de metamorfose (NEWMAN, 1998). As populações de anfíbios apresentaram uma redução severa nas últimas décadas e as doenças infecciosas foram um dos fatores dessa redução. Porém, poluição e perda do habitat também influenciaram para a ocorrência desse declínio, que é a antropização (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

As doenças infecciosas em anfíbios podem ser por fungos, helmintos, bactérias, vírus, na qual podem estar causando essas alterações nas suas populações. Dentre essas doenças infecciosas, as ocasionadas por fungos têm apresentado indicio cada vez maior a essas populações (RAMALHO, 2015).

Um dos importantes nas últimas décadas é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, denominado popularmente como Bd. Um fungo queratinofílico causador da quitridiomiose, uma doença que vem sendo apontada como a mais importante responsável pela mortalidade e redução de populações de anfíbios (DE PAULA, 2011). O fungo Bd provoca infecções dentro das células na camada mais externa da pele dos anfíbios, ocasionando uma hiperplasia, alteração que consiste no aumento desarranjados das células e hiperqueratose, processo no qual há um aumento de queratina nessas células, deixando a pele dos animais mais rígida e densa do que o normal (VOYLES, *et al.*, 2009).

Deste modo, em animais infectados podem ser observadas lesões no tegumento e descoloração da pele, anorexia, letargia, uma postura anormal, convulsões e morte, sendo que na fase larval as anormalidades apresentam-se no disco oral de girinos, assim como a falta de

pigmentação. As alterações patogênicas causadas pela quitridiomiose são discretas, no entanto os sintomas mais aparentes são lesões na região ventral, dorsal, inguinal, nas patas e entre os dedos. Além da hiperplasia pode ocorrer necrose de célula pertencentes à epiderme, além de ulcerações que podem estar ligadas a bactérias de forma característico nos acúmulos de queratina ou nos esporângios vazios (DE PAULA, 2011).

O ciclo do *B. dendrobatidis* está caracterizado pela formação de zoósporos flagelados aquáticos que são liberados na água e infectam o tecido cutâneo queratinizados em rãs adultas e em estruturas queratinizadas do disco oral dos girinos, neste caso os zoósporos se espalham formando hifas e infectam os anfíbios, através de contato próximo ou direto durante o acasalamento (VALENCIA-AGUILAR, *et al.*, 2016). Na fase larval dos Anuros, somente na região bucal do disco oral são queratinizadas, sendo o local de infecção pelo o Bd. Em girinos saudáveis, as estruturas que contêm queratina são igualmente pretas metálicas e simétricas (VIEIRA, *et al.*, 2013).

O *Batrachochytrium dendrobatidis* infecta o tecido queratinizado de anfíbios tendo potencial de ser letal para indivíduos pós-metamórficos causando declínios populacionais de anfíbios em todo o mundo. Porém, mesmo que as infecções cutâneas ocasionadas pelo o Bd possa matar recém-metamórficos e adultos, a maior parte das larvas sobrevive quando infectada, podendo servir também como reservatórios de zoósporos infecciosos (VIEIRA, *et al.*, 2013).

A espécie *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro 1926) é uma rã de estrutura média, uma das espécies mais abundantes sendo encontrada em diversos tipos de ambientes, tanto no solo quanto vocalizando dentro d'água (HEYER, *et al.*, 2008).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo analisar a ocorrência da infecção pelo fungo *Bratrachochytrium dendrobatidis* em adultos e girinos de *Leptodactylus macrosternum* no tegumento e tecidos queratinizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a ocorrência de lesões por quitridiomicose em adultos e girinos de *Leptodactylus macrosternum* coletados no *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1- Identificar em adultos de *Leptodactylus macrosternum* lesões compatíveis com a quitridiomicose por exame externo no corpo em vistas dorsal, ventral e membros;

2.2.2- Identificar a presença de lesões externas no disco oral, corpo e cauda de girinos de *L. macrosternum*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anfíbios

Os anfíbios se divergem em três linhagens, sendo elas: Anura que são os sapos, rãs e pererecas, Caudata as salamandras e Gymnophiona conhecidas como cecílias e cobras-cegas (FROST, 2016). Dentre a grande biodiversidade os anfíbios são considerados como os primeiros vertebrados a conquistar o ambiente terrestre, mesmo essa conquista não sendo totalmente precisa, uma vez que os anfíbios possuem uma dependência ao ambiente aquático quando em estado larval (girino) e ambientes úmidos para a sobrevivência e reprodução (HADDAD *et al.*, 2008).

Devido à elevada dependência que os Anuros têm da qualidade ambiental, impactos humanos no ambiente fazem do grupo os animais mais suscetíveis a modificações. Uma vez que os anfíbios são animais ectotérmicos de pele permeável e conseqüentemente, são vulneráveis a condições ambientais, no qual podem vir a afetar sua distribuição e uso de seu habitat (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

No Brasil, a Mata Atlântica é o bioma que possui o maior número de espécies de anfíbios anuros (HADDAD; PRADO, 2005). Encontram-se em categoria de ameaça e diversos fatores são relacionados, como: a perda do habitat, mudanças na qualidade ambiental e doenças infecciosas (RAMALHO, 2015).

3.2 *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae)

A espécie *Leptodactylus macrosternum*, foi descrita por Miranda-Ribeiro em 1926, em sua sistemática é especificado por pertencer a ordem Anura, família Leptodactylidae e ao gênero *Leptodactylus*. Os anfíbios Anura da família Leptodactylidae passaram a ser composta somente por quatro gêneros: *Scythrophrys*, *Hidrolaetere*, *Paratelmatobiuse* e *Leptodactylus*, este se subdividindo em três subfamílias, sendo elas: Leiuperinae, Leptodactylinae e Paratelmatobiinae (SANTOS, 2015).

A espécie de *Leptodactylus macrosternum* abrange um número em populações abundantes, por ser uma espécie de rãs de médio porte, onde os machos medem entre 90-120 mm, enquanto que as fêmeas medem entre 80-110 mm. Os indivíduos desta espécie possuem uma grande atividade forrageadora, sendo encontradas em diferentes tipos de habitats, tanto em

ambientes florestais tropicais úmidas, savana, campos e áreas secas (HEYER, *et al.*, 2008). Espécimes de *L. macrosternum* são encontrados durante todo o ano, tanto em áreas com grande índice de chuvas quanto em áreas de altas temperaturas (DA COSTA, *et al.*, 2016).

Popularmente conhecida como “rã manteiga”, a espécie *L. macrosternum* possui características como dorso acinzentado com marcas longitudinais proeminentes, hábito noturno, e tem como habitat preferencial corpos de águas lânticos como banhados, arroios, e canais, mas que também são encontradas vivendo sob o solo em meio às gramíneas (FROST, 2016). Sua reprodução ocorre em corpos d’água temporários, sendo comumente encontradas, em lagoas, pequenos lagos ou áreas alagadas. Depositam seus ovos em ninhos de espumas na superfície de lagos onde seus girinos se desenvolvem. A espuma auxilia na proteção contra dessecação e predadores, fornecendo também a oxigenação dos ovos, sendo uma possível adaptação a ambientes secos (PRADO, *et al.*, 2005).

3.3 *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

O *Batrachochytrium dendrobatidis* foi descrito em 1998 como um fungo patógeno do gênero *Batrachochytrium*, do filo Chytridiomycota, classe Chytridiomycetes e da ordem Chytridiales (RAMALHO, 2015).

Dentre os divergentes grupos de patógenos infectantes de anfíbios, está o *B. dendrobatidis*, se destacando como um dos fatores casuais de declínios das espécies de anfíbios (KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDE, 2001; HARP; PETRANKA, 2006). O *B. dendrobatides*, também conhecido como Bd, é um fungo causador da quitridiomíose, doença que resulta em alterações patogênicas contidas e lesões (DE PAULA, 2011). A distribuição das lesões causadas pelo *B. dendrobatidis* nas larvas (girinos), se dá na epiderme queratinizada presente no disco oral dos mesmos (MARANTELLI, *et al.*, 2004).

Análises e estudos afirmam que a quitridiomíose é responsável pela maior perda de biodiversidade de vertebrados já detectada. É uma doença infecciosa resultante, que vem ameaçando a população mundial de anfíbios no âmbito das alterações populacionais em espécies desses indivíduo, mortalidade, extinção e enorme declínio. Estudos apontam que mais de 516 espécies de anfíbios já forma infectados pelo fungo em que as taxas de mortalidade são altas (RAMALHO, 2015).

3.4 Quitridiomicose

Nas espécies de anfíbios Anura as doenças infecciosas destacam-se por possuírem etiologia viral, fúngica e parasitária. Dentre as doenças infecciosas, a quitridiomicose é a de maior importância para os anfíbios, pois causa grande impacto na lista de doenças mais relevantes de animais silvestres (RAMALHO, 2015).

A quitridiomicose é uma doença causada pela infecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Nos anfíbios a doença causa alterações hiperqueratose da epiderme e sua descoloração. Essa doença se ocasiona na despigmentação do disco oral em girinos e anormalidades do mesmo (BERGER, *et al.*, 1998, 1999; BERGER, *et al.*, 2005).

Os primeiros casos de quitridiomicose foram detectados na América Central (Panamá) e Austrália (Queensland) durante a realização de um estágio de monitoramento de fauna e foi nesse mesmo período, quando foi registrada mortalidade em massa em diversas espécies de anfíbios Anura, aparentemente não era associada pela a causa de distúrbios ambientais. A doença é considerada como a principal causadora do aniquilamento da biodiversidade de espécie de anfíbios, na qual acaba sendo uma ameaça nessas populações (RAMALHO, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) N° 62270-1 em corpos d'água e pequenas poças do *campus* universitário Senador Helvídio Nunes de Barros, UFPI, Picos (Figura 1A). De acordo com ABREU e LIMA (2000) o município de Picos está localizado na região centro-sul do estado do Piauí, que tem clima semiárido com uma temperatura média anual de 27,3 °C e localização 07° 04' 37" latitude Sul e 41° 28' 01" longitude Oeste (Figura 1B).

Figura 1: A – Local das coletas; **B** – Mapa do Piauí e seta indica o município de Picos.



Fonte: ufpi.com.br.

Fonte: Google maps, 2001.

4.2 Coleta e Avaliação dos adultos de *Leptodactylus macrosternum*

As coletas dos espécimes adultos foram realizadas mensalmente por busca ativa entre agosto 2019 a fevereiro 2020, a qual correspondem as estações seca e chuvosa no estado do Piauí, em período das 22:00 horas as 00:00 horas, devido a espécie possuir hábito noturno.

Os espécimes adultos coletados foram submetidos ao exame externo para identificação quanto a presença de lesões que caracterizam a quitridiomiose. Posteriormente, os espécimes foram medidos no seu comprimento rostro-cloacal (CRC) com auxílio do paquímetro digital

(precisão 0,001mm), fotografados (Figura 2) e logo em seguida liberados no local onde encontrados.

Figura 2: Espécime adulto de *L. macrosternum* analisado.



Fonte: Autor, 2020.

4.3 Coleta e Avaliação dos girinos de *L. macrosternum*

Para análise quanto a ocorrência de lesões externas que caracterizasse a doença quitridiomíose nos girinos avaliados deste trabalho, visto que os mesmos são difíceis de serem coletados, foram estudados um lote de girinos previamente coletados em fevereiro de 2014 e girinos coletados em março de 2019 em um ambiente de lagoa temporária, formada por acúmulo de água da chuva no *campus* de Picos (Autorizado SISBIO/ICMBio N° 62270-1).

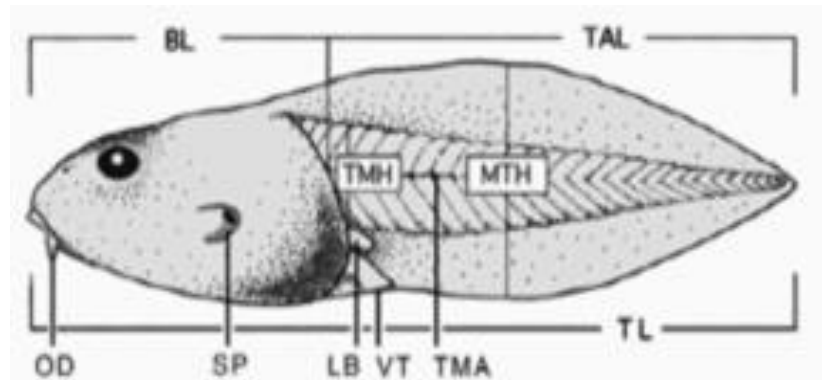
A avaliação dos girinos de *L. macrosternum* foi realizada no laboratório de pesquisa III (Biodiversidade) sendo analisados um total de 48 espécimes. Empegada a metodologia de identificação visual com auxílio da lupa estereomicroscópica (Figura 3), os girinos foram submetidos inicialmente a uma triagem utilizando-se placas de Petri grande e pinças delicadas, fazendo a identificação do estágio de desenvolvimento segundo GOSNER, 1960. Após a triagem, foram medidos quanto ao tamanho do corpo e cauda (Figura 4). Posteriormente, analisados quanto a anatomia externa do corpo, cauda e disco oral, local onde o fungo comumente coloniza provocando alterações externas nos girinos.

Figura 3: Pesquisadora realizando análise macroscópica de girinos de *Leptodactylus macrosternum*.



Fonte: Arquivo pessoal da pesquisadora, 2019.

Figura 4: Medidas de aferição do comprimento corpo e cauda de girinos, segundo cartilha para a morfologia de girinos anuros.



Fonte: Ronald Altig, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Adultos

Foram analisados 20 espécimes adultos de *Leptodactylus macrosternum*, sendo 3 na estação seca com média comprimento rostro-cloacal de 89,56 mm, e 17 na estação chuvosa com média de 80,13 mm (Tabela 1).

Tabela 1: Média do comprimento rostro-cloacal (CRC) dos espécimes adultos de *L.macrosternum* analisados nas estações seca e chuvosa.

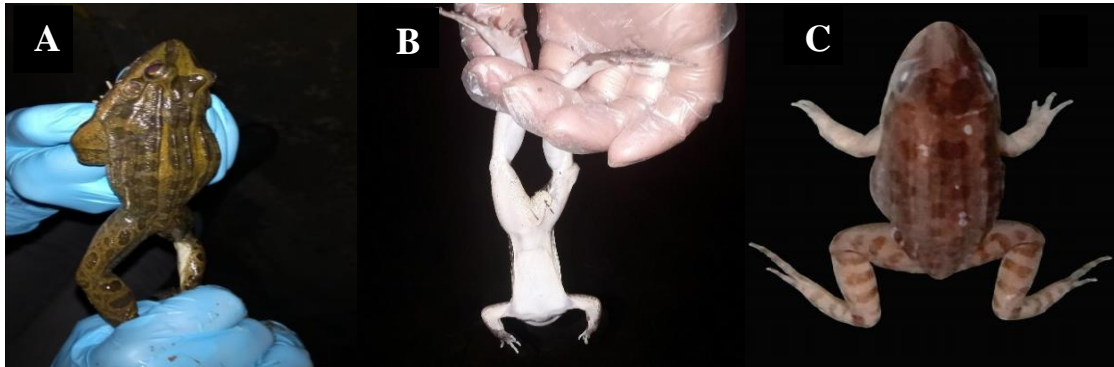
ESTAÇÃO	MÉDIA CRC (mm)
SECA	89,56
CHUVOSA	80,13

Fonte: Autor, 2021.

Os espécimes adultos coletados e analisados deste trabalho, não apresentavam lesões externas da doença quitridiomocose. As regiões dorsal, ventral e membros estavam com coloração e tegumentos íntegros do padrão para a espécie (Figura 5 A, B e C).

Nos adultos, o fungo se aloja nas células epidérmicas da região pélvica e se nutrem do estrato córneo (BERGER, *et al.*, 2005). Quando infectados pelo *B. dendrobatidis*, tal infecção é caracterizada por provocar hiperqueratose e desprendimento da pele, interrompendo as trocas gasosas normais, causando um desequilíbrio que pode resultar em uma parada cardíaca e morte (VOYLES, *et al.*, 2007; VOYLES, *et al.*, 2009).

Figura 5: Espécime adulto de *Leptodactylus macrosternum* em vista dorsal (A) e ventral (B); juvenil normal em vista dorsal, publicado em trabalho sobre estudos de albinismo em *L. macrosternum* (C).



Fonte: (A) e (B) - Autor, 2019; (C) – Fonseca, *et al.*, 2021.

5.2 Girinos

Foram analisados 48 girinos de *Leptodactylus macrosternum*. 46 deste total correspondem aos girinos coletados em fevereiro de 2014 em estágio 36 de desenvolvimento larval (GOSNER,1960). A média do tamanho do corpo foi de 15,32 mm de comprimento e cauda com média de 23,62 mm. Os outros 2 correspondem aos girinos coletados em março de 2019 em estágio 42 de desenvolvimento (GOSNER, 1960), com seus membros anteriores e posteriores totalmente formados, olhos e narinas já aparentes. A média do tamanho do corpo destes foi 14,62 mm e média da cauda de 13,33 mm de comprimento (Tabela 2).

Tabela 2: Média do comprimento do corpo e cauda dos girinos de *L. macrosternum* analisados em estágios 36 e 42 de desenvolvimento.

MEDIDAS	MÉDIA (mm)	
	ESTÁGIO 36	ESTÁGIO 42
CORPO	15,32	14,62
CAUDA	23,62	13,33

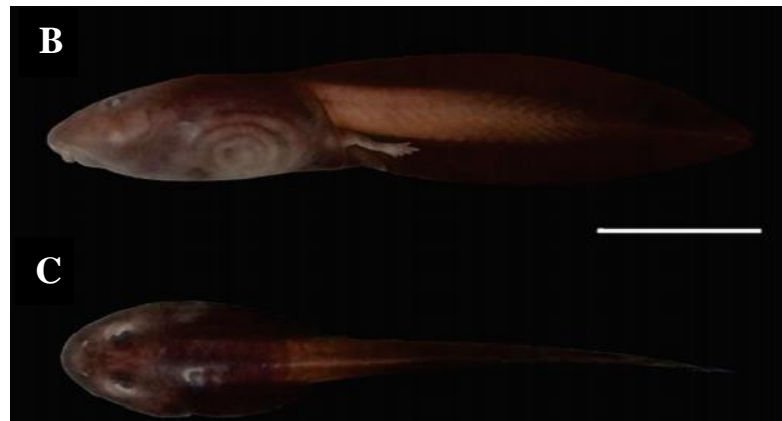
Fonte: Autor, 2021.

A partir do estágio 35 os girinos normais de *L. macrosternum* apresentam características como: coloração castanho-escuro com pequenas manchas por todo o corpo; forma do corpo elíptico ou ovoide, com região ventral transparente sendo possível visualizar o intestino espiralado; focinho arredondado; disco oral anteroventral; narinas pequenas, dorsais, e levemente mais próximas dos olhos do que do focinho (ARAÚJO, 2015) (Figura 6 A, B e C).

Figura 6: (A) - Girino de *L. macrosternum* analisado em estágio 36 de desenvolvimentos; girino de *L. macrosternum* com características morfológicas externas normais (B) e (C).



Fonte: Autor, 2019.



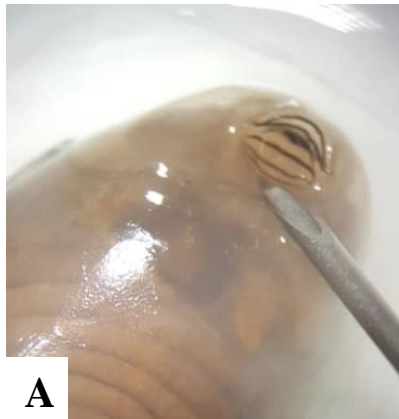
Fonte: Fonseca, *et al.*, 2021.

Nos girinos, apenas o aparato bucal é queratinizado, assim sendo o único local susceptível à infecção pelo Bd, podendo vir ocasionar despigmentação no corpo e deformidades na cauda (RAMALHO, 2015). Nos girinos analisados deste trabalho não foi observado lesões que caracterizasse a doença quitridiomíose, todos os girinos estavam normais, sem alteração na morfologia externa e aparato bucal (Figura 7A). Em todos os estágios, a partir do momento em que o disco oral forma os dentículos, todos os girinos analisados se mantiveram com a mesma característica, isto é, 2-3 o número de dentículos anteriores e posteriores (GOSNER, 1960).

Nos girinos, quando infectado o Bd provoca a perda do tecido queratinizado do aparato bucal, causando efeitos negativos no desenvolvimento (VOYLES, *et al*, 2011). Portanto, as alterações presentes no disco oral de girinos infectados apresentam essas características (Figura

7B), devido ao fato do Bd ser um fungo queratinofílico, provocando essa alteração na cavidade oral. Isso pode prejudicar o desenvolvimento dos girinos, no que os mesmos podem acabar morrendo por não conseguir se alimentar.

Figura 7: **A-** Aparato bucal de girino *L. macrosternum* saudável; **B** Aparato bucal de girino infectado por *B. dendrobatidis*, publicado em trabalho sobre estudo de Diagnóstico do fungo Quitídio.



A

Fonte: Autor, 2019.



B

Fonte: Lambertini, *et al.*, 2013.

Carnaval, *et al.* (2006) constatam em estudo, que em 41 espécies de anfíbios brasileiros avaliados houve infecções por *B. dendrobatidis* confirmadas, e tais espécies estão reservadas a áreas da Mata Atlântica, nas regiões Sul e Sudeste do País. Sendo nessas regiões de onde provém a maior parte dos relatos de declínios de populações de anuros no Brasil (OLIVEIRA, 2014). Lesões do disco oral interferem abruptamente no desenvolvimento larval das espécies impedindo sua alimentação e em consequência podem morrer e não chegarem a completar metamorfose.

Segundo Ramalho (2015), o Bd tem prospecção por temperaturas mais frias para sobrevivência e reprodução, apresentando um ótimo crescimento em regiões cuja variação de temperatura é 17 °C a 25 °C. Portanto, em regiões com média anual de temperatura mais altas (>25 °C) e que a média diária se mantenha estável durante todo o ano, pode resultar em perda ou redução na probabilidade de infecção pelo o fungo Bd nos anfíbio.

O fungo Bd pode se disseminar de anfíbio para anfíbio por contato próximo ou direto no acasalamento, nos agrupamentos de girinos, ou em que outros comportamentos que causem aglomerações dos animais. Por outro lado, acredita-se que se o Bd for atraído por comportamentos solúveis liberados pela pele, os zoósporos poderiam deslocar-se mais do que

originalmente previsto, favorecendo desta forma a disseminação do patógeno (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, *et al.*, 2004).

Regiões com características climáticas de temperaturas mais altas, aumentam o *turnover* da epiderme e reduzem o crescimento do fungo (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE *et al.*, 2004), e diante disso especula-se que ambientes mais quentes desfavorecem a dispersão e infecção nos anfíbios pelo o patógeno, porque o fungo não possuiria tempo hábil para completar o seu ciclo antes da troca de epiderme (BERGER, *et al.*, 2005).

No entanto, Benício, *et al.* (2019) publicaram o primeiro relato da prevalência do Bd por meio de biologia molecular em anfíbios do município de Picos. No estudo o fungo foi identificado em espécimes adultos de *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa*, todos sem lesão visível em tegumento e membros. Estas espécies apresentam hábitos terrestres de ambientes úmidos, podendo estar servindo como potenciais reservatórios de Bd em regiões de clima semiárido.

Estes dados sugerem uma possível adaptação do Bd não mais como um agente causador de infecções em potencial, mas utilizando essas espécies de reservatório para sua dispersão.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como finalidade verificar a ocorrência de lesões por quitridiomicose em adultos e girinos de *Leptodactylus macrosternum*, espécie endêmica no município de Picos no Piauí.

A avaliação por exame externo do tegumento e membros dos espécimes adultos de *L. macrosternum* não apresentavam lesões compatíveis com a doença quitridiomicose.

A análise macroscópica do corpo, cauda e disco oral dos girinos indicou estruturas preservadas e integras dos tecidos queratinizados, não exibiam alterações compatíveis com as ocasionadas pelo fungo Bd.

Os resultados obtidos reforçam a importância de mais estudos em populações de adultos e girinos tanto de *L. macrosternum* quanto de outras espécies de anuros do município de Picos, utilizando-se o exame externo e metodologias complementares específicas como coleta de *swab* para crescimento e isolamento do fungo e por biologia molecular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIG, Ronald. A primer for the morphology of anuran tadpoles. **Herpetological conservation and biology**, v. 2, n. 1, p. 71-74, 2007.
- ARAÚJO, F. F. S. **História natural de *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) em áreas da Caatinga nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil**. 66 f. Unidade Acadêmica em Ciências Biológicas, Campus de Patos, 2015.
- BENÍCIO, R. A. *et al.* **Worrying News for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians**. *Tropical Conservation Science* v. 12. p. 1–6, 2019.
- BERGER, L. *et al.* Chlamydia pneuminae in free ranging giant barred frog (*Myxophyes iterates*) from Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2378-2380, 1999.
- BERGER, L. *et al.* **Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America**. *Theoretical Population Biology*, v. 95, n. 15, p. 9031–9036, 1998.
- BERGER, L. *et al.* Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachichytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n. 1, p. 47-50, 2005.
- BLAUSTEIN, A. R. Chicken little or Nero's fiddle: a perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.
- BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecological Letters**, v. 5, n. 4, p. 597-608, 2002.
- BRITO, S. V. *et al.* **Phototoxic and modulatory effects of natural products from the skin of *Rhinella jimi* (Stevauxy, 2002)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 1, p. 82-87, 2012.
- CARNAVAL, A.C.O.Q. *et al.* Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain forest. **Ecohealth**, v. 3(1), p. 41-48, 2006.
- CHAVES, M. F. **Caracterização histológica e biologia reprodutiva de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae), nordeste do Brasil**. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. p. 85. 2016.
- COSTA, T. R. N; CARNAVAL, A. C. O. Q; TOLEDO, L. F. **Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros**. *Revista da Biologia* 8, p. 33-37, 2012.
- DA COSTA, D. F. S. *et al.* 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.

DA SILVA VIEIRA, Washington Luiz; ARZABE, Cristina; SANTANA, Gindomar Gomes. **Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri Paraibano, Nordeste do Brasil.** *Oecologia Australis*, v. 11, n. 3, p. 383-396, 2009.

DE PAULA, C. D. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica:** estudo prospectivo. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians.** Mc-Graw-Hill, New York, 1986.

FARRER, R. A. *et al.* **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.

FONSECA, M. G.; PICHELI, K.; GAREY, M. V. Albinism in *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae) in south Piauí, northeast Brazil. **Herpetology Notes**, v. 14, p. 731-733, 2021.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference** . v. 6.0. American Museum of Natural History, Nova York, EUA. 2016.

GARMYN, A. *et al.* **Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*,** PLoS ONE, v. 7, n. 4, 2012.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica** 16(3):183-190, 1960.

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.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. **Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil.** *Bioscience* 55:207-217, 2005.

HARP, E. M.; PETRANKA, J. N. Ranavirus in wood frog (*Rana sylvatica*): potential source of transmission within and between ponds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 307-318, 2006.

HARRIS, Reid. N. *et al.* **O patógeno anfíbio *Batrachochytrium dendrobatidis* é inibido pelas bactérias cutâneas das espécies de anfíbios.** *EcoHealth*, v.3, n.1, p.53, 2006.

HEYER, R.; REICHLE, D.; AQUINO, L. *Leptodactylus Ocellatus.* **IUCN Red List of Threatened Species**, v. 2, IUCN, 2008.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R.; BELDE, L. K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 681-684, 2001.

LAMBERTINI, C. *et al.* **Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*.** *Métodos em Herpetologia*. *Herpetologia Brasileira*, v. 2 (1), p. 12–17, 2013.

- LIMA, I. M. M. F., ABREU, I. G., & LIMA, M. G. **Semiárido piauiense: Delimitação e regionalização** (Piauí Semiárido: Delimitation and Regionalization). Carta CEPRO. Teresina, PI. Halley, 18, p.162–183. 2000.
- MARANTELLI, G.; BERGER L.; SPEARE R. & KEEGAN L. **Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development**. Pacific Conservation Biol, v. 10 (1), p. 173–179. 2004.
- NEWMAN, R. A. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. **Oecologia** 115 (1-2), p. 9-16. 1998.
- OLIVEIRA, C. L. **Análise in vitro da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis***. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Brasília, Brasília, 2014.
- PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, L. S.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2004.
- PRADO, C. P. A., *et al.* **Breeding activity patterns , reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil**. Amphibia-Reptilia, 26 (2): 211-221, 2005.
- RAMALHO, A. C. O. **Correlatos ecológicos da quitridiomiose em anuros do Cerrado**. 2015. 53 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília. Brasília, 2015.
- SANTOS, J.S. **A ultraestrutura dos espermatozoides de algumas espécies da família Leptodactylidae (Amphibia: Anura)**. 2015. 100 f. Tese (Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2015.
- SILVA, A. O. *et al.* **Análise comparativa dos nichos espacial e alimentar de anuros em áreas de Caatinga e Mata Atlântica de Sergipe, Brasil**. 2014.
- VALENCIA-AGUILAR, A. *et al.* Seasonality, environmental factors, and host behavior linked to disease risk in stream-dwelling tadpoles. **Herpetologica**, 72(2): 98-106, 2016.
- VERDADE, V.K. *et al.* **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, C.A.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; Body length of *Hylodes ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73: in press, 2013.
- VOYLES, J.; E.B. ROSENBLUM & L. BERGER. **Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity**. Microbes and Infection, 13(2011): 25-32, 2011.
- VOYLES, J. *et al.* Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. **Disease of Aquatic Organisms**, 77(2): 113-118, 2007.

VOYLES, J. *et al.* Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, p. 582– 585, 2009.

WELLS, K.D. **Phylogeny, classification, and morphological evolution.** In: **WEELS, K.D. The Ecology and behavior of amphibians.** Chicago; The University, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Morfometria dos adultos contendo o comprimento rostro-cloacal (CRC), medidos com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,001 mm).

Tabela 3: Medida Comprimento rostro-cloacal (CRC) de espécimes adultos *L. macrosternum* analisados na estação seca.

Espécime	CRC (mm)
01	94,32
02	102,11
03	72,26

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 4: Comprimento rostro-cloacal (CRC) de espécimes adultos *L. macrosternum* analisados na estação chuvosa.

Espécime	CRC (mm)
01	97,73
02	65,01
03	95,91
04	82,23
05	92,03
06	58,21
07	63,98
08	64,63
09	55,38
10	74,10
11	71,25
12	112,80
13	83,80
14	95,27
15	93,22
16	58,26
17	99,30

Fonte: Autor, 2020.

APÊNDICE B. Morfometria dos girinos contendo as principais medidas (mm): comprimento do corpo e cauda, medidos com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,001 mm).

Tabela 5: Comprimento corpo e cauda dos girinos (G) de *L. macrosternum* em estágio 36 de desenvolvimento.

Girinos em estágio 36	Comprimento do corpo (mm)	Comprimento da cauda (mm)	Girinos em estágio 36	Comprimento do corpo (mm)	Comprimento da cauda (mm)
G 01	16,15	25,29	G 24	16,82	25,23
G 02	15,46	17,85	G 25	15,16	21,43
G 03	15,41	26,71	G 26	16,26	22,78
G 04	15,61	26,22	G 27	15,51	20,04
G 05	14,09	24,35	G 28	16,23	24,04
G 06	14,35	25,05	G 29	15,30	19,67
G 07	15,17	23,93	G 30	16,14	23,64
G 08	15,40	21,79	G 31	15,49	24,65
G 09	15,15	24,52	G 32	14,31	21,93
G 10	16,86	25,84	G 33	16,47	24,93
G 11	15,57	24,54	G 34	16,71	25,17
G 12	15,27	25,87	G 35	14,20	23,46
G 13	15,12	24,15	G 36	13,99	25,00
G 14	14,98	22,79	G 37	14,46	24,32
G 15	16,55	20,01	G 38	14,89	24,18
G 16	14,92	22,81	G 39	14,75	25,46
G 17	14,61	24,96	G 40	16,29	27,16
G 18	16,11	22,46	G 41	15,37	19,44
G 19	15,93	23,75	G 42	15,10	24,13
G 20	15,43	26,89	G 43	13,51	21,83
G 21	15,68	20,80	G 44	15,36	23,61
G 22	14,06	20,91	G 45	15,29	25,48
G 23	15,98	25,40	G 46	13,16	22,17

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 6: Comprimento corpo e cauda dos girinos (G) de *L. macrosternum* em estágio 42 de desenvolvimento.

Girinos em estágio 42	Comprimento do corpo (mm)	Comprimento da cauda (mm)
G 01	16,76	15,90
G 02	12,49	10,77

Fonte: Autor, 2020.



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

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(x) Monografia
() Artigo

Eu, Linária Francisca do Nascimento Pereira, 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 **ANÁLISE DO TEGUMENTO E TECIDO QUERATINIZADO EM *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) COMO PREDITORES DA QUITRIDIDIOMICOSE** 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, 12 de Agosto de 2021.

Linária Francisca do Nascimento Pereira

Assinatura

Linária Francisca do Nascimento Pereira

Assinatura