

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

**JANIELLA DE MOURA COSTA**

**PRIMEIRO REGISTRO DO *Batrachochytrium dendrobatidis*  
CAUSADOR DA QUITRIDOMICOSE EM *Rhinella jimi* Stevaux, 2002  
PARA A REGIÃO SEMI-ÁRIDA BRASILEIRA POR BIOLOGIA  
MOLECULAR E ANÁLISE MORFOLÓGICA**

**Picos- PI  
2018**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí**  
**Biblioteca José Albano de Macêdo**

**C837i** Costa, Janiella de Moura  
Primeiro registro do *batrachochytrium dendrobatidis* causador da quitridiomycose em *rhinella jimi* stevaux, 2002 para a região semi-árida brasileira por biologia molecular e análise morfológica / Janiella de Moura Costa.– 2018.  
CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. ( 34 f.)  
Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2019.  
Orientador(A): Prof. Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca

1. Chytridiomycota. 2. Amphibia-Piauí. I. Título.

**CDD 597.8**

**Janiella de Moura Costa**

**PRIMEIRO REGISTRO DO *Batrachochytrium dendrobatidis*  
CAUSADOR DA QUITRIDIOMICOSE EM *Rhinella jimi* Stevaux, 2002  
PARA A REGIÃO SEMI-ÁRIDA BRASILEIRA POR BIOLOGIA  
MOLECULAR E ANÁLISE MORFOLÓGICA**

Monografia apresentada ao curso de ciências biológicas como requisito para a obtenção do Grau de licenciado em Ciências biológicas – Pela Universidade Federal do Piauí – Campus Senador Helvidio Nunes de Barros, Picos.

**Orientador(a):** Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca

**Picos – PI  
2018**

Janiella de Moura Costa


**PRIMEIRO REGISTRO DO *Batrachochytrium dendrobatidis*  
CAUSADOR DA QUITRIDOMICOSE EM *Rhinella jimi* Stevaux, 2002  
PARA A REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRA POR BIOLOGIA  
MOLECULAR E ANÁLISE MORFOLÓGICA**


Monografia apresentada ao curso de ciências biológicas como requisito para a obtenção do Grau de licenciado em Ciências biológicas – Pela Universidade Federal do Piauí – Campus Senador Helvídio Munes de Barros.


**Orientador(a):** Dra. Marluce Gonçalves Fonseca


Aprovado em 08 1 12 2017

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.: Dra. Marluce Gonçalves Fonseca  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof.: Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro Silva  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof.: Dr. Paulo César de Lima Sales  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof.: Dra. Waldima Alves da Rocha  
Suplente  
Picos – PI  
2017

## DEDICATÓRIA

Dedicado a Deus, minha mãe, meu pai e toda a minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para superar todas as dificuldades que enfrentei durante esses quatro anos e meio de graduação.

A minha mãe Maria Nilza de Moura Costa por ser o meu exemplo me apoiar, sonhar, e persistir junto comigo para que continuasse a lutar pelo meu sonho. Obrigada mamãe por não desistir do meu sonho mesmo quando as coisas pareceram difíceis. Te amo.

Ao meu pai Getúlio Viana da Costa pelo apoio e exemplo ao longo de minha vida e vida acadêmica.

A minha orientadora Mariluce Gonçalves Fonseca, por aceitar ser minha orientadora, e minha inspiração, um dia quero ser uma profissional tão boa quanto ela.

Gostaria de agradecer infinitamente ao professor Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva pela ajuda e comprometimento durante a pesquisa, por sempre se mostrar disposto a ajudar, pela paciência, por ser um exemplo de professor e também por aceitar participar da minha banca.

A minha tia Edite de Moura Teixeira pelo incentivo, apoio e palavras de encorajamento ao longo da minha graduação.

A minha tia Maria Ivanilda de Moura pelos puxões de orelha que não permitiram que eu desistisse dos meus sonhos.

A minha querida avó Maria Borges de Moura Teixeira por me abrigar e me apoiar durante esses 4 anos e meio de graduação.

As minhas melhores amigas Jéssica Monteiro e Maria Daniela que estiveram comigo durante os momentos mais difíceis da minha caminhada, dando palavras de apoio, carinho, puxões de orelha sempre que necessário e incentivando sempre a nunca desistir.

A minha amiga Gerceline Ribeiro pelo incentivo, sorrisos, e palavras de apoio quando pensei em desistir, ou quando me senti desanimada, muito obrigada por ser esse anjo na minha vida amiga.

A minha prima Eliane por me incentivar e ajudar desde o início e também no decorrer da minha caminhada.

Ao meu irmão Geneilson pelas caronas sempre que precisei e por me proporcionar muitas risadas quando me sentia desanimada.

Aos meus amigos Romário Barros e Railson Carvalho pelas risadas de descontração nos corredores da UFPI.

As minhas amigas Clarice e Michele pela amizade que constituímos nesses anos de graduação.

Ao meu primo Lianey por me incentivar e contribuir para a realização desse sonho.

A professora Ana Carolina Landim Pacheco, por servir como um exemplo de profissional, e ter me ensinado a nunca desistir de meus objetivos e sempre me incentivar a continuar quando eu pensei em existir.

Aos meus padrinhos Francisco Alves (*in memoriam*) e Luzia (*in memoriam*) pela ajuda e incentivo antes mesmo desse sonho começar a se realizar.

Gostaria de agradecer a todos os professores que participaram da minha formação acadêmica. A todos o meu muito obrigado!!!

**O forte não é aquele que ganha sempre, mas sim aquele que em meio as quedas sempre se levanta e nunca desiste de lutar pelos seus objetivos.**

**(Autor desconhecido)**



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Fungos .....	15
3.2 Anfíbios.....	15
3.3 <i>Rhinella jimi</i> , Stevaux,2002 (Anura: Bufonidae).....	17
3.4 Declínio dos Anfíbios.....	17
3.5 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> ( <i>Bd</i> ).....	18
3.6 Quitridiomicose.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Área de Estudo.....	22
4.2 Preparação do swabe e Coleta de <i>Rhinella jimi</i> para identificação do <i>Bd</i> .....	22
4.3 Identificação por Biologia Molecular .....	23
4.3.1 Preparação do meio de cultura específico para fungos.....	23
4.3.2 Extração do DNA e PCR .....	24
4.3.2.1 Extração de DNA .....	25
4.4 Identificação de Quitridiomicose em <i>R. jimi</i> .....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Identificação do <i>Bd</i> nos ambiente A1 e A2 por exame óptico e biologia molecular.....	27
5.2 Quitridiomicose – A Doença.....	27
5.3 Identificação do <i>Bd</i> por Biologia Molecular.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	32

## RESUMO

O Brasil possui uma grande diversidade de anfíbios que abrangem três grupos principais que são as Ordens Anura, Urodela e Gymnophiona. Nos últimos anos os anfíbios tem sofrido reduções de suas populações que podem estar ligadas às mudanças climáticas, destruição de habitats ou introdução de novas doenças infecciosas. Entre as doenças infecciosas a quitridiomicose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) está entre as doenças mais listadas como responsável pelo declínio dos anfíbios. O fungo ataca a pele em adultos podendo acarretar na morte. Portanto o presente trabalho teve como objetivo identificar o fungo *Bd* em *Rhinella jimi* Stevaux, 2002, em duas localidades distintas de Picos-PI. Na qual os indivíduos da espécie *Rhinella jimi* foram coletados no período de 2016 a 2017, onde foi feito o swabe para a identificação ou não identificação por biologia molecular (PCR) e exame óptico. No exame óptico foi possível observar descamações e despigmentações na epiderme. Portanto através das análises foi possível a identificação do fungo *Bd* nos indivíduos de *Rhinella jimi* por biologia molecular, sendo o primeiro registro de *Bd* em adultos de *R. jimi* no Sul do Piauí, município de Picos.

**Palavras-chaves:** *Chytridiomycota*, *Amphibia*, *Piauí*

## ABSTRACT

Brazil has a great diversity of amphibians that cover three main groups that are the Orders Anura, Urodela and Gymnophiona. In recent years, amphibians have suffered reductions in their populations that may be linked to climate change, destruction of habitats or introduction of new infectious diseases. Among infectious diseases chytridiomycosis caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) is among the most listed diseases responsible for the decline of amphibians. The fungus attacks the skin in adults and can lead to death. Therefore the present work had as objective to identify the Bd fungus in *Rhinella jimi* Stevaux, 2002, in two different locations of Picos-PI. In that the individuals of the species *Rhinella jimi* were collected in the period from 2016 to 2017, where the swabe was made for the identification or not identification by molecular biology (PCR) and optical examination. In the optical examination it was possible to observe desquamations and depigmentations in the epidermis. Therefore, through the analysis, it was possible to identify the Bd fungus in the individuals of *Rhinella jimi* by molecular biology, being the first record of Bd in adults of *R. jimi* in the South of Piauí, municipality of Picos.

**Keywords:** *Chytridiomycota, Amphibia, Piauí*

## 1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios se encontram divididos em três grupos que são as ordens Anura, Urodela e Gymnophiona. Esses três grupos são dotados morfologicamente de características muito diferentes entre si, na qual os anuros possuem como especialidade a locomoção através de saltos, possuindo patas posteriores bem desenvolvidas, corpo normalmente curto, sem a presença de cauda na sua fase adulta com olhos e cabeça grande. Já a ordem Urodela é dotada de animais com corpo mais alongado, patas anteriores e posteriores do mesmo tamanho, e com presença de cauda, enquanto que a ordem Gymnophiona tem corpo longo, não possui patas e tem olhos bastante rudimentares (WELLS, 2007)

A Ordem Anura é considerada como o grupo mais bem sucedido de anfíbios na qual possui a maior abundância e diversidade no planeta. Possuem diferenciação devido ao seu ciclo de vida bifásico, no qual a vida larval é comumente aquática e a vida adulta habita ambientes terrestres. São portadores de uma pele bastante fina, sensível e úmida, que é de extrema importância para manter a umidade e ajuda na respiração cutânea. Baseado na necessidade dos anfíbios de manter a pele úmida para auxiliar na respiração cutânea e serem ectodérmicos, isso leva a conclusão de que esses animais são influenciados por fatores do ambiente como a temperatura, a umidade e a pluviosidade. Portanto condições ambientais são importantíssimas para a atuação desses organismos (PREUSS, 2014).

A diminuição das populações de anfíbios já é um fenômeno em escala mundial, tendo reduções e extinções registradas desde os anos 1950, na qual a partir de 1980, um número cada vez mais elevado de estudos vem constatando reduções nas comunidades de anfíbios (SAITO, 2013).

O Brasil é um país dotado de uma grande diversidade de anfíbios. Reduções de populações dessa classe vem ocorrendo em proporção global, tendo vários fatores que acarretam nessa diminuição populacional, entre elas estão a presença de novos predadores introduzidos no ecossistema, mudanças climáticas, destruição de habitats e doenças infecciosas (OLIVEIRA,2014).

Entre as doenças infecciosas as mais comumente encontradas em anfíbios, são as causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas, na qual dentre as infecções bacterianas se destacam a adermatosepticemia bacteriana, flavo bacteriose, micro

bacteriose e clamidiose. Como doença viral comum a ranavirose, e entre as doenças fúngicas as principais são a zigomicose, cromo micose, saprolegniose icnofoníase e quitridiomocose (RAMALHO,2015).

Os fungos apresentam grandes contribuições para a indústria, principalmente para a farmacêutica e a alimentícia, mas atualmente esse reino em específico o Filo Chytridiomycota vem ocasionando problemas em grande escala para as populações de anfíbios em todo o mundo. O problema tem surgido através de fungos quitridios que tem atacado a pele de anfíbios em especial o *Batacochytrium dendrobatidis Bd* pertencente ao filo Chytridiomycota da Classe dos Chytridiomycetes (LONGCORE; PESSIER, NICHOLS, 1999).

As patogenias ocasionadas por fungos *Bd* tem apresentado uma ameaça cada vez maior para as comunidades de anfíbios. Nos últimos anos o Filo Chytridiomycota tem ganhado grande destaque por sua enorme capacidade patogênica, e os danos que causa na fauna de anfíbios no planeta, principalmente na fase larvária (FARRER et al.2011).

O quitrídio ataca o tecido queratinizado de anfíbios possuindo uma capacidade de letalidade bastante alta para indivíduos recém metamórficos. Esse patógeno se encontra como causa de declínios de populações de anfíbios em todo o planeta (VIEIRA et al., 2013).

Entre os patógenos detectados a quitridiomocose, vem sendo apontada como a doença mais emergente, que vem ameaçando as populações de anfíbios em carácter mundial, uma vez que esta doença vem acarretando a mortalidade em grande escala e declínio populacional, com perda de inúmeras espécies de anfíbios em todo o mundo, levando pesquisadores a sugerir que a quitridiomocose é o patógeno com maior responsabilidade sobre a perda da diversidade de anfíbios anuros já registrada (RAMALHO, 2015).

A quitridiomocose causa um quadro de hiperplasia ou seja aumento desordenado de células epiteliais, além de hiperqueratose produção de queratina em excesso, fazendo com que a pele dos anfíbios se torne espessa e rígida ocasionando rapidamente na morte desses animais, uma vez que a pele é de extrema importância para os mesmos sendo responsável pela respiração cutânea, proteção contra outros agentes patógenos e impedindo a absorção de sais minerais de extrema importância

como sódio e potássio ocasionando em óbito por parada cardíaca. (VOYLES et al., 2009).

Deste modo o presente trabalho teve por objetivo identificar o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) nas espécies de *Rhinella jimi* de duas localidades do município de Picos, Sul do Piauí.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

A identificar a presença de fungos *Bd* em duas localidades do município de Picos-PI, por avaliação morfológica externa e a Técnica de Biologia Molecular.

### 2.2 Objetivo específico

2.2.2 Identificar a ocorrência do *Bd* em espécimes de *Rhinella jimi* no campus Senador Helvidio Nunes de Barros (CSHB);

2.2.1 Identificar a ocorrência *Bd* no conjunto habitacional Nossa Senhora de Aparecida, próximo ao bairro Passagem das Pedras em Picos-PI;

2.2.3 Validar a presença da quitridiomicose em *Rhinella jimi*, utilizando a técnica de PCR.

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Fungos

Os fungos fazem parte de um Reino com características diferenciadas das plantas e animais, na qual a sua diferença mais marcante é o seu modo de nutrição por absorção. Além dessa diferença estão entre as demais diferenciações a formação de estruturas filamentosas chamadas hifas, que fazem parte de uma estrutura denominada micélio e ainda estruturas especializadas na reprodução sexuada e assexuada, própria de cada taxonômico, em que a partir dessas se formam esporos. A maioria desses organismos se nutrem de matéria orgânica morta, sendo que diversas espécies podem apresentar comportamento parasita, atacando plantas, animais, algas, outros fungos e o homem. O Reino Fungi agrupa cinco grandes filios: Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota (SILVA, 2006).

Os fungos são organismos dotados de uma ampla capacidade de colonizar e explorar diversos substratos de organismos vivos e em decomposição. Esta capacidade diferenciada de exploração e colonização se deve em grande parte as características físicas na qual o organismo está exposto e também a necessidade nutricional necessária para seu desenvolvimento (PEREIRA, 2012).

O filo Chytridiomycota (Chitridiomycetos) é um dos filios que contem aproximadamente 1.000 espécies (LUTZONI et al. 2004). Este filo é predominantemente aquático, podendo ser encontrado também em ambientes terrestres sendo estes úmidos, ou em solos mais secos podendo ser encontrados na forma de uma estrutura resistente conhecida popularmente como “chapéu”. São sapróbrios, mas também podem ser parasitas de plantas, algas, outros fungos, microrganismos ou anfíbios (NASCIMENTO; PIRES-ZORATTELLI, 2009).

### 3.2 Anfíbios

Na atualidade os anfíbios se encontram classificados em três ordens: Gymnophiona ou Ápode (representados pelas cobras-cegas ou Cecílias que não possuem pernas nem cauda), a ordem Caudata ou Urodela (caracterizados por apresentar quatro pernas e cauda longa e são representados pelas salamandras) e a



ordem Anura (que possui a presença de quatro pernas e não tem cauda, sendo representadas por sapos, rãs e pererecas) (CANTO, 2012).

A classe Amphibia conta com aproximadamente 6.638 espécies catalogadas, sendo encontradas atualmente no Brasil cerca de 1080 espécies de anfíbios, na qual 849 são anuros que se encontram divididos em 20 famílias, apenas uma espécie de salamandra que está incluída na ordem Caudata ou Urodela e 36 espécies de Cecílias que se enquadram dentro da ordem Gymnophiona ou Ápode. (SEGALLA et al, 2016).

Os anfíbios se caracterizam por apresentar pele com uma camada bastante fina de queratina que fornece pouca proteção a esses animais contra a desidratação. No geral também não apresentam escamas e sua pele é fina e permeável, mantendo a umidade pela ação de glândulas mucosas, essas características se tornam de grande importância para permitir as trocas gasosas que ocorrem entre o ar e os vasos sanguíneos que irrigam a pele, uma vez que estes também possuem respiração cutânea (LINHARES, 2014).

O termo “anfíbio” é direcionado para os membros desta classe, pelo fato de que a maioria deles vivem as primeiras fases da vida dentro da água (larvas que normalmente são chamadas de girinos) e tem uma segunda fase na qual as larvas se desenvolvem transformando-se em indivíduos adultos terrestres que passam a respirar por pulmões. Porém nem todos os anfíbios passam por tais transformações. Existem algumas espécies que permanecem a vida toda na água, enquanto outras não vivem na água em nenhuma fase da vida (ORR, 2009).

ASSIS (2012) afirma que os anfíbios são animais bastante sensíveis às mudanças do ambiente. Essa vulnerabilidade dos mesmos às mudanças ocorridas no ambiente pode estar relacionada às características da pele, uma vez que esse substrato é muito permeável e pode permitir a passagem de elementos contidos no ambiente, estando esses animais mais sujeitos a infecções por microrganismos.

Em contraste com isso esses animais possuem um sistema imune bastante sofisticado, além de uma pele que funciona como uma espécie de barreira de proteção contra predadores e microrganismos causadores de doenças. Também sendo capaz de secretar moléculas compostas de veneno, bioativas que possuem ação antimicrobiana. A superfície da pele dos anfíbios é continuamente úmida pela ação do muco secretado pelas glândulas mucosas que pode ter um papel de termo regulação (ASSIS, 2011).

### **3.3 *Rhinella jimi*, Stevaux,2002 (Anura: Bufonidae)**

A espécie *Rhinella jimi* faz parte da família bufonidae e é um anfíbio de grande porte, conhecido vulgarmente no semiárido como sapo cururu ou sapo boi, possuindo uma amplificada distribuição, principalmente no bioma da caatinga, habitando áreas próximas as habitações humanas, lagoas, poças, margens de riachos, estradas e rodovias. Apresentando uma dieta principalmente constituída por insetos invertebrados e até mesmo pequenos vertebrados (OLIVEIRA, 2014).

Os indivíduos dessa espécie são dotados de uma pele espessa e coberta por glândulas, que se encontram no antebraço, pés, cloaca, e parte posterior da cabeça, se distribuindo geograficamente por toda a região nordeste do brasil (STEVAUX,2002).

Os *Rhinella jimi* possuem cerca de 103,0 mm (milímetros) e como já foi citado podem ser encontrados principalmente em ambientes antropizados. A sua coloração dorsal tem um fundo em diferentes tonalidades de marrom e bege com manchas negras, porém alguns indivíduos podem apresentar uma linha de coloração clara verticalmente no dorso. As glândulas paratóideas são bem desenvolvidas, e a sua superfície ventral é de coloração creme com pequenos pontos em marrom, com a presença ou não, de manchas acinzentadas (BENÍCIO E FONSECA, 2014).

### **3.4 Declínio dos anfíbios**

Desde da década de 1980 vem havendo uma diminuição em grande escala na população de anfíbios, essa diminuição se deve a fatores como aparecimento de novos predadores no ecossistema habitado por estes animais, a destruição do seu ambiente, poluição causada por agentes químicos, alterações no clima ou doenças infecciosas (COLLINS, 2010).

Nos últimos anos populações de anfíbios tem sofrido uma significativa diminuição ou até mesmo extinção, na qual pelo menos 43% (quarenta e três por cento) das espécies de anfíbios tem sofrido declínio, 32,5 % (trinta e dois virgula cinco por cento) estão sendo globalmente ameaçadas, 34% (trinta e quatro por cento) foram extintas e 88 se encontram passíveis e ou possivelmente extintas. No Brasil cerca de 20 espécies de anuros estão sofrendo um razoável número de diminuição em suas

populações, onde na maioria dos casos esses declínios populacionais se encontram relacionados à ocorrência de novos patógenos (ASSIS,2011).

Entre as doenças infecciosas as mais comumente encontradas em anfíbios, são as causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas, na qual dentre as infecções bacterianas se destacam a adermatosepticemia bacteriana, flavo bacteriose, micro bacteriose e clamidiose. Como doença viral comum a ranavirose, e entre as doenças fúngicas as principais são a zigomicose, cromo micose, saprolegniose e icnofoníase e quitridiomucose (RAMALHO,2015).

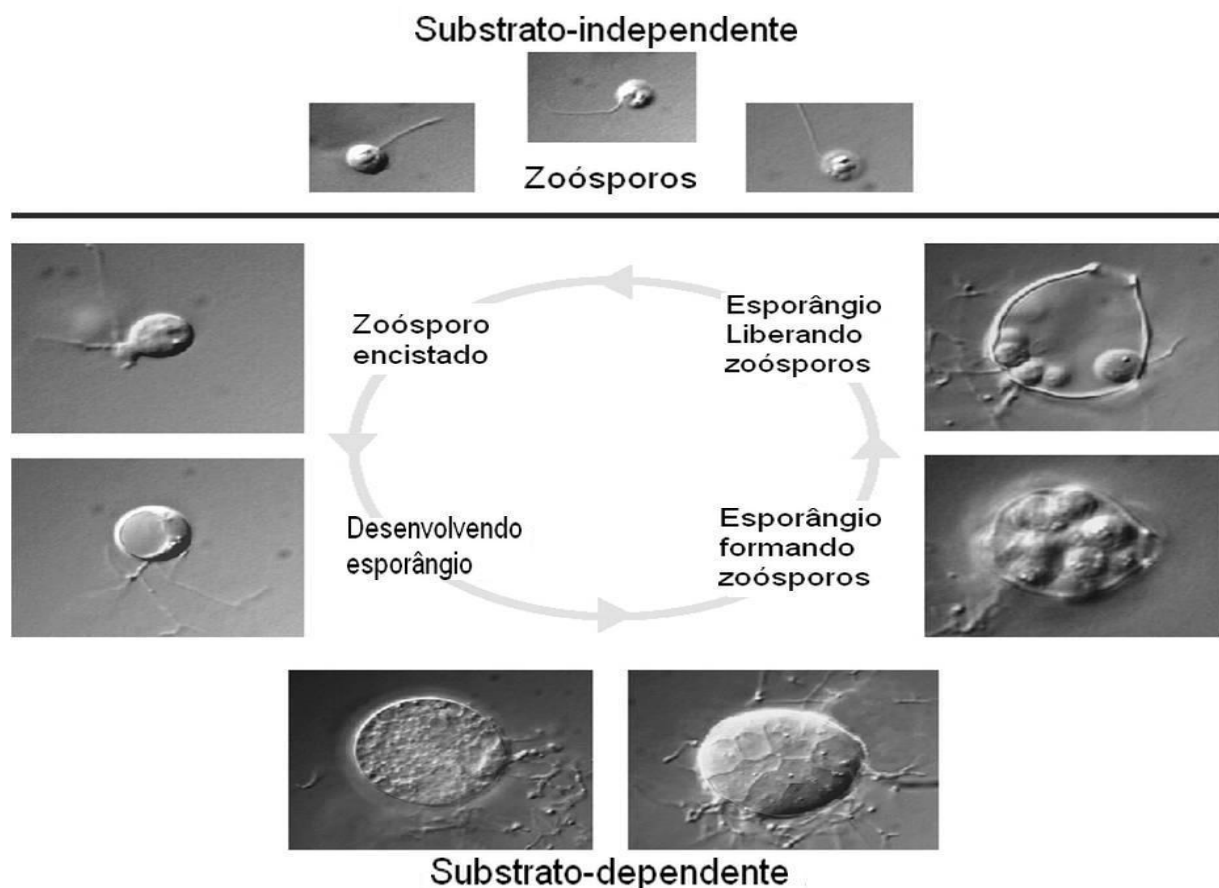
As prováveis causas do declínio dos anfíbios podem ser o resultado da ação isolada ou em conjunto de uma série de fatores que vão desde a perda e mudança do habitat, mudanças climáticas, aumento de radiação ultravioleta, poluição industrial e por agrotóxicos, introdução de espécies exóticas e doenças emergentes como o fungo *Batachochytrium dendrobatidis* (CONDEZ, 2008).

Segundo ARANTES (2010) as mudanças climáticas favorecem de maneira significativa o aparecimento da quitridiomucose (doença causada pelo fungo *Batachochytrium dendrobatidis*. Uma vez que os anfíbios são animais sensíveis às mudanças ocorridas no ambiente, possibilitando a ocorrência de epidemias. Essa vulnerabilidade às modificações do ambiente, provavelmente está relacionada com as características particulares de sua pele, que é um órgão bastante permeável, de maneira a permitir a passagem de elementos encontrados no ambiente, fazendo com que esses indivíduos estejam sujeitos a contrair infecções causadas por microrganismos.

### **3.5 *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)**

O *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) é um tipo de fungo que pertence ao filo chytridiomycota, faz parte da classe Chytridiomycetes e está na ordem Chytridiales (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS,1999). É um fungo com zoósporos que vivem em ambiente aquático, são dotados de flagelo e são capazes e infectar tecidos da pele queratinizados, em rãs adultas e em girinos afeta as cavidades orais em girinos (AGUIAR, 2016). É um dos únicos integrantes da família Chytridiaceae que possui a capacidade de infectar indivíduos vertebrados. Esse respectivo fungo é capaz de invadir as camadas queratinizadas da pele dos anfíbios adultos e em fases larvais ataca as cavidades orais queratinizadas (GARMYN et al.2012).

O ciclo referente a vida do *Bd* acontece em duas etapas assexuadas, onde na primeira o zoósporo é móvel flagelado e se encontra distribuído na água e na segunda é imóvel (ARELLANO, 2013). O *Bd* se nutre e forma uma estrutura de tamanho aumentado denominada esporângio, podendo desenvolver estruturas chamadas de rizoides para facilitar a fixação. Na parte interna dos zoosporângios após ocorrer maturação poderão ser encontrados novos zoósporos já formados, estes podem ser liberados através de papilas que podem ser encontradas na parede dos zoosporângios. (PREUSS, 2014). Os zoósporos após serem liberados vão procurar um novo substrato disponível na água para iniciar novamente o seu ciclo (JAMES; VILGALYS, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida o *Bd*. Na fase independente do ciclo, os zoósporos possuem flagelos e são nadantes livres. Na fase dependente, os zoósporos formam cistos e se transformam em esporângios, que produzem e liberam novos zoósporos. **Fonte:** OLIVEIRA, 2014.

Em ambientes de água parada os zoósporos são capazes de percorrer longas distâncias antes que ocorra o processo de encistamento, indicio de que os zoósporos

tem a capacidade de se disseminar por grandes extensões até encontrar o substrato de um hospedeiro (DE PAULA; CARTÃO-DIAS, 2011).

O principal meio de dispersão do *Bd* acontece principalmente através dos zoósporos, porém sua capacidade de infectar seus hospedeiros tem limitação dependendo do tempo necessário para a formação de cistos e a distância na qual eles conseguem se disseminar (PREUSS, 2014).

A disseminação do *Bd* pode ocorrer de forma fácil de um anfíbio para outro através do contato direto durante o acasalamento, no período de amontoamento e girinos, ou quando esses indivíduos estão em conjunto em ações de aglomeração, porém é provável que o *Bd* também possa ser atraído por substâncias solúveis liberados pela pele, onde os zoósporos conseguiriam se disseminar mais do que o esperado, ajudando à propagação do fungo (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE et al., 2004).

O *Bd* é apontado como o fungo causador da quitridiomíose, doença vista como o fator principal da redução e morte de populações de anfíbios. Este fungo tem grande abundância de distribuição, infectando uma gama de hospedeiros, e essa abundância na sua distribuição aumenta o sucesso do número de hospedeiros (LAMBERTINI, 2016)

### **3.6 Quitridiomíose – A doença**

A quitridiomíose é uma doença micótica causada pelo fungo *Batachochytrium dentrobatidis* que lesiona o tegumento de indivíduos pós metamorfoseados, porém é pouco específica com relação a hospedeiros, mas possui muita eficiência em sobreviver no ambiente em caso de escassez eventual de anfíbios (HERNÁNDEZ et al., 2014).

As infecções ocasionadas por *Bd* ocorrem dentro das células nas camadas mais externas da pele. Quando há infecção por quitridiomíose acontecem alterações celulares chamadas hiperplasia que consiste no aumento de células desordenadas e hiperqueratose, processo na qual há o aumento de queratina nas células tornando dessa forma a pele dos animais infectados bem mais espessa e rígida do que o normal. Essas alterações no tegumento são logicamente fatais para os anfíbios uma vez que é através da sua pele que eles realizam as trocas gasosas e absorvem sais

minerais de extrema importância (eletrólitos) como sódio e potássio provocando distúrbios severos, levando esses animais a morte (Voyles et al.,2009).

As alterações patogênicas causadas pela quitridiomicose, no geral são discretas, porém os sintomas mais aparentes são lesões na região, ventral, dorsal, inguinal, nas patas e entre os dedos. Além de hiperplasia pode ocorrer necrose de células pertencentes à epiderme, além de ulcerações que podem estar ligadas a bactérias de forma particular nos acúmulos de queratina ou nos esporângios vazios. Referente aos sintomas clínicos é possível observar em animais infectados descolorações da pele, uma postura anormal, letargia, anorexia, respostas demoradas em relação à estímulos, convulsões e morte. Sendo que na fase larval as anormalidades se apresentam no disco oral de girinos como a falta de pigmentação por exemplo (DE PAULA, 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

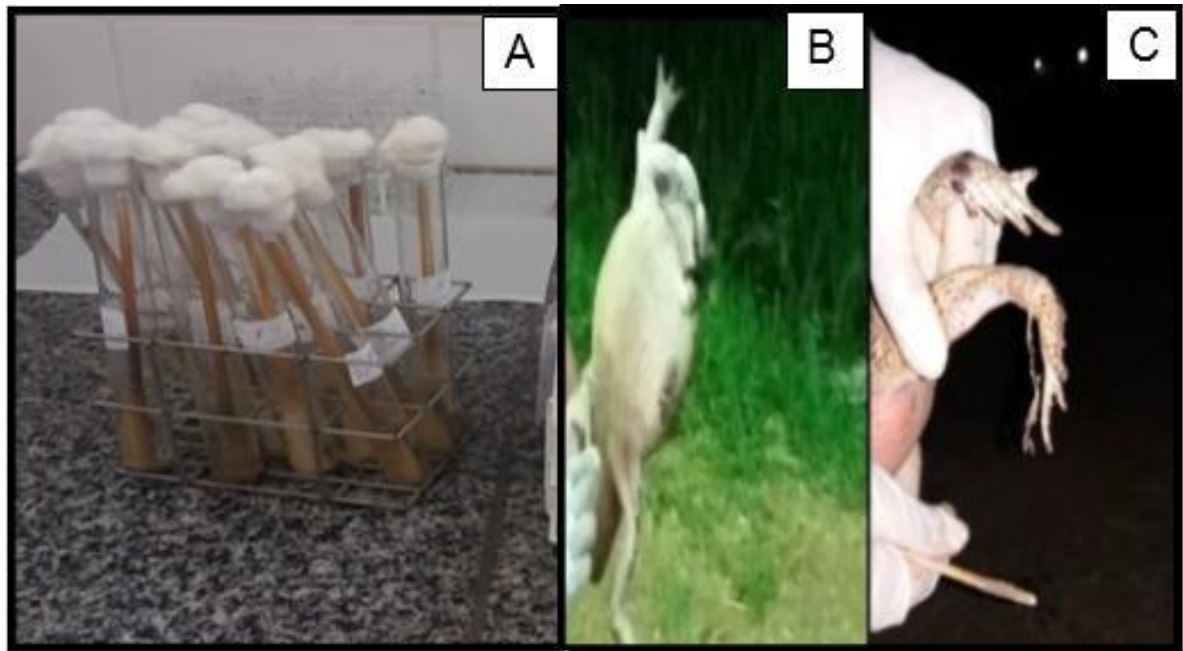
### 4.1 Área de Estudo

O presente trabalho foi realizado em 2 localidades, Campus Senador Helvidio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí-UFPI, Bairro Junco (ambiente A1) e no Conjunto Habitacional Nossa Senhora Aparecida (CHNSA) (ambiente A2).

### 4.2 Preparação do swabe e Coleta de *Rhinella jimi* para identificação do *Bd*

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Microbiologia, Pesquisa I e III na qual os anfíbios da espécie *Rhinella jimi* foram coletados no ambiente (A1) e no ambiente (A2) sob autorização Fundação Chico Mendes SISBIO, IBAMA licença nº.22508-2.

As coletas foram realizadas sempre no período entre 20:00 horas e 00:00 horas (horário em que a incidência desses animais é maior) nas respectivas áreas de estudo (A1) e (A2) no período de 2016 a 2017, com ajuda de um kit para swabes etiquetados (Figura 2). Foram feitas coletas semanais ativas, onde após a captura do animal *in situ* foi feita uma avaliação externa do animal com o intuito de observar descamações e lesões na pele e em seguida foi realizada a coleta do material. A análise consistiu em deslizar o swabe de três a cinco vezes na região dorsal, ventral, inguinal, nas patas dianteiras e traseiras e entre os dedos do animal, locais onde comumente o *Bd* coloniza (Figura 2). Logo em seguida o animal foi libertado no mesmo ambiente em que foi capturado.



**Figura 2.** Kit utilizado para realização de swabe (A) e swabe realizado no Campus Senador Helvidio Nunes de Barros ambiente A1 (B) e Conjunto Habitacional Nossa Senhora de Aparecida ambiente A2 (C). **Fonte:** autoria propria (2017) e BARBOSA (2017).

Ao todo foram coletados para a pesquisa 6 espécimes (seis) de *Rhinella jimi*, sendo 3 (três) no ambiente (A1) e 3 (três) no ambiente (A2), posteriormente o material foi encaminhado para o laboratório de Pesquisa III e I, onde foram realizados os testes para biologia molecular.

### 4.3 Identificação por Biologia Molecular

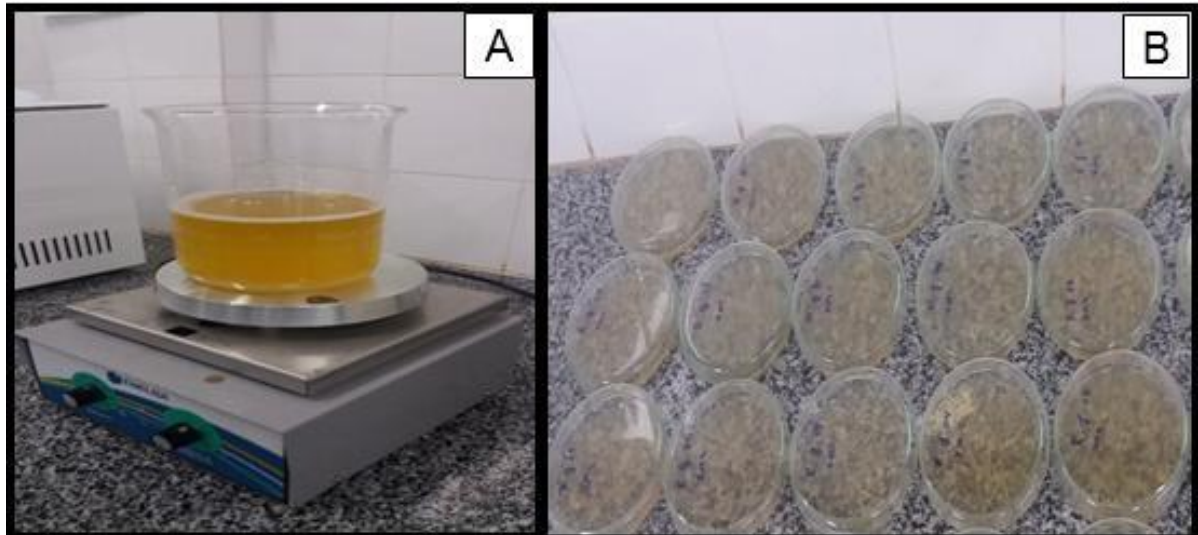
#### 4.3.1 preparação do meio de cultura específico para fungos

Após a captura dos animais e a respectiva coleta do material em campo, este foi encaminhado rapidamente ao laboratório de Pesquisa III na qual ficou encubado em tubos a uma temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  em uma mistura de soro fisiológico.

Para a análise foi preparado um meio de cultivo específico para fungos, na qual foi utilizado 65 g (gramas) de Sabourad Dextrose Ágar para um L (litro) de água destilada, a mistura foi colocada para aquecer e misturar em um agitador magnético,



depois adicionada em placas de petri na qual posteriormente o material seria semeado (Figura 3).



**Figura 3.** Meio de cultura com Saborad dextrose ágar aquecendo em agitador magnético (A) e placas do meio de cultura específica para fungos (B).

O semeio do material foi feito com ajuda de uma alça de platina utilizando o método de esgotamento de modo a isolar as colônias de fungos, em seguida foi encubado em uma geladeira à temperatura de cerca de 24°C a 25°C por dois dias para que ocorresse o crescimento dos respectivos fungos.

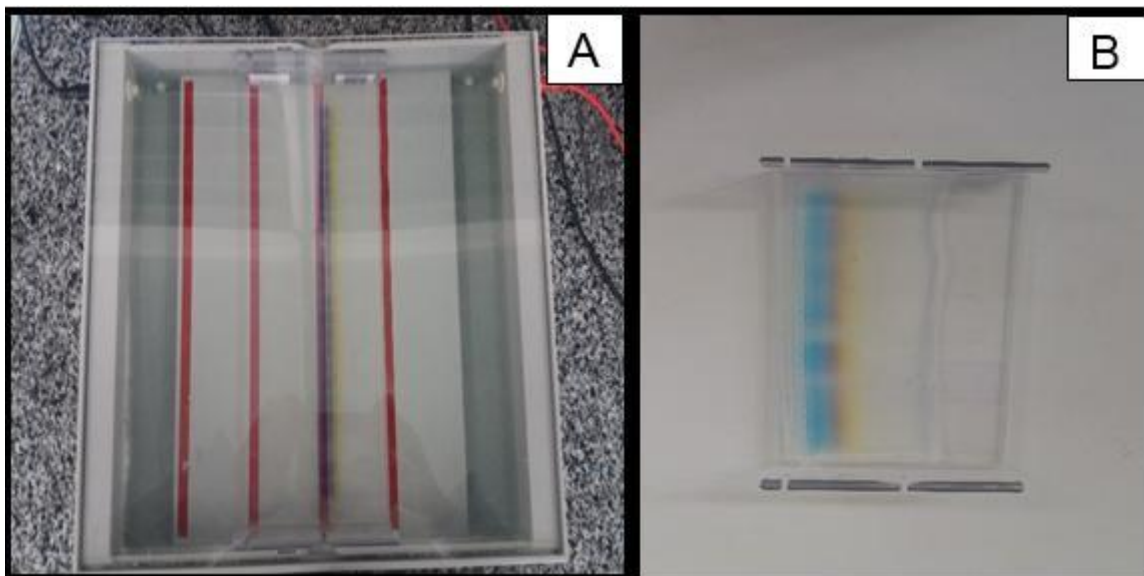
#### 4.3.2 Extração do DNA e PCR

Para a análise do material foi utilizado as 6 (seis) placas de *Rhinella jimi*, na qual para a extração do DNA dos fungos presentes nas placas foi utilizado o DNease blood and tissue kit da qiagen seguindo o protocolo do fabricante. A manipulação e confecção do mix (composto por primer e máster mix) foi realizada em uma capela de fluxo laminar, uma vez que este é um ambiente estéril e livre de contaminação. 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 H<sub>2</sub>O. 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 12  $\mu\text{l}$  em tubos de 1,5 e adicionado 5  $\mu\text{l}$  de DNA. Para o controle negativo adicionou-se 5  $\mu\text{l}$  de água destilada no Mix, para ficar com o volume de 20  $\mu\text{l}$ . Estes devem ser levados para ciclagem no termociclador. E a ciclagem do PCR foi a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 minutos, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um passo final de 72°C 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 colocado na base para solidificar, deve ser completado a cuba onde é feito o gel com TBE 0,5  $\mu\text{l}$ .

Para fazer a corrida do gel foi preparado 5  $\mu\text{l}$  da amostra de DNA e adicionado 1  $\mu\text{l}$  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 (Figura 4). Depois de realizar a corrida do DNA no gel, as bandas formadas foram visualizadas aplicando luz Ultravioleta.



**Figura 4.** Gel de agarose mostrando corrida de DNA no gel (A) e gel de agarose demonstrando o resultado de corrida de DNA com primer específico do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* sem a ajuda de luz UV (B).

#### **4.3.2.1 Extração de DNA utilizando DNease blood and tissue kit da qiagem recomendado pelo fabricante**

I – Material em tubo de 1,5 ml > Adição de 180 µl do tampão ATL > macerado > adição de 20 µl de Proteinase K > vortexado > incubação 56°C por 40 minutos.

II – Adição de 200 µl de Buffer AL > misturado no vortex > incubação a 56°C por 10 minutos.

III – Adição de 200 µl de etanol (96%-100%) > misturado no vortex.

IV – Transferência do material do tubo de 1,5 para uma coluna de rotação com tubo de coleta de 2 ml > centrifugação a 8000 rpm < descarte da coluna.

V – Coluna de rotação para um novo tubo de 2 ml > adição de 500 µl de Buffer AW1 > centrifugação por 1 minuto a 8000rpm > descarte do fluxo e o tubo de coleta.

VI – transferência da coluna de rotação para um novo tubo de coleta de 2 ml > adição de 500 µl de Buffer AW2 > centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm > descarte de tubo de 2 ml.

VII – transferência da coluna de rotação para um tubo de coleta de 1.5 ml.

VIII – Adição de 200 µl de Buffer AE > incubação por 1 minuto a temperatura de 15°C a 25°C > centrifugação por 1 minuto a 8000rpm.

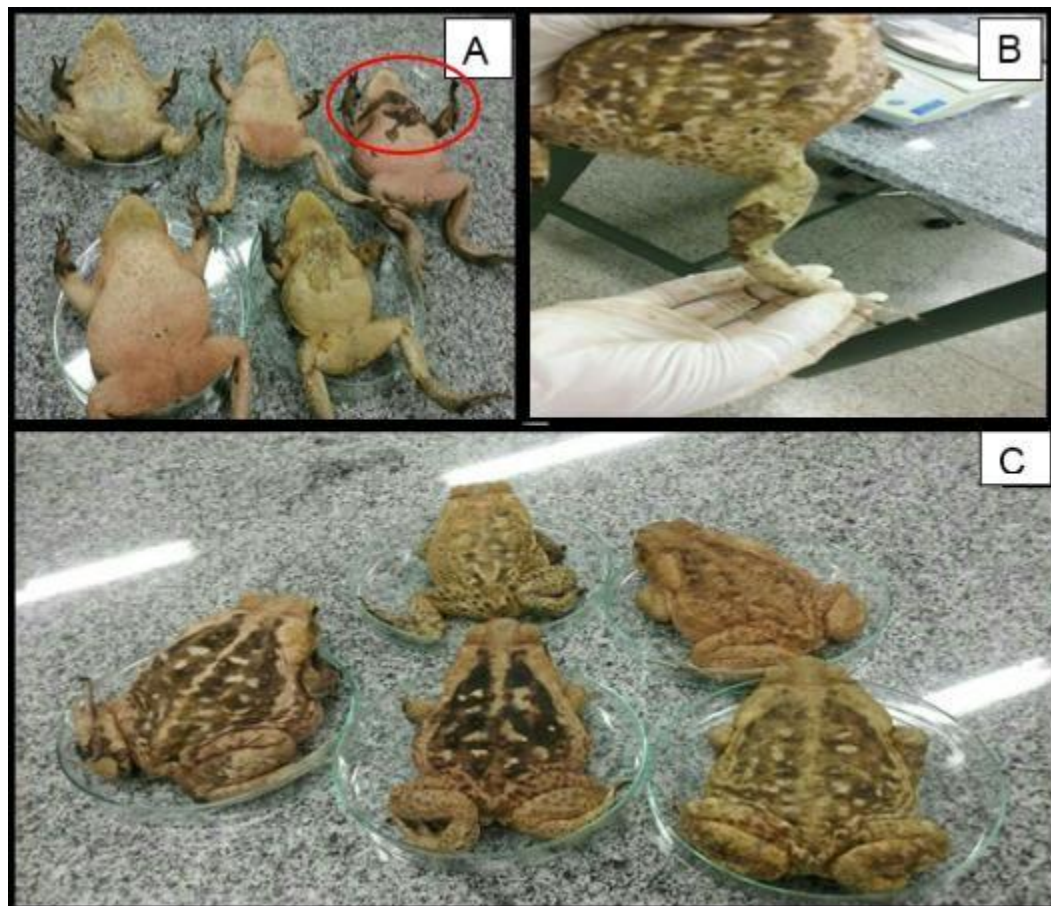
#### **4.4 Identificação de Quitridiomicose em *R. jimi***

Para a identificação da quitridiomicose foi realizada a avaliação externa de lesões da pele em região ventral, inguinal, membros e patas dianteiras e traseiras dos indivíduos coletados nas respectivas áreas de estudo, ambiente (A1) e (A2).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação do *Bd* nos ambientes A1 e A2 por exame óptico e biologia molecular

Pode-se observar por avaliação óptica que tanto os indivíduos do ambiente A1 quanto do A2 apresentavam descamação em pele todos indivíduos analisados por exame óptico apresentavam lesões de descamação em pele, membros e região ventral em diferentes níveis (Figura 5).



**Figura 5.** Espécimes coletados no ambiente A1 e A2 apresentando descamações na parte ventral (A), *Rhinella jimi* apresentando descamação da região dos membros (B) e visão incontestável de lesões e mudança de coloração na região dorsal em *Rhinella jimi* (C).

### 5.2 Quitridiomicose – A Doença

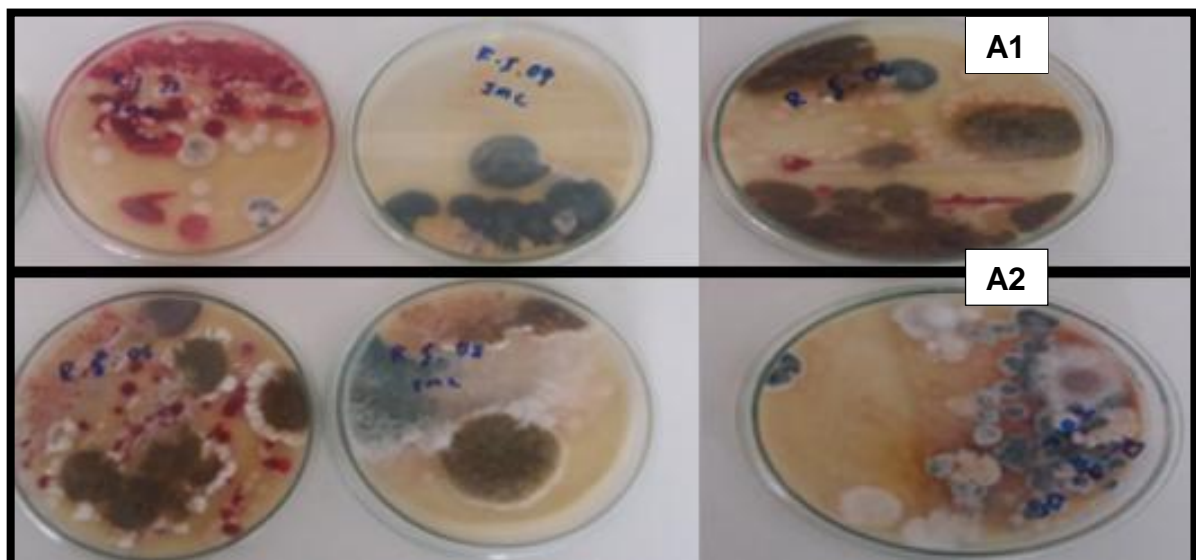
Ao espécimes de *Rhinella jimi* que foram analisados apresentavam uma despigmentação visível quando comparado com outros animais da mesma espécie com pigmentação normal, também foram observadas várias descamações principalmente nas regiões inguinal e membros plantares (Figura 6).

A quitridiomiose tem sido identificada como doença emergente devido a sua disseminação atual em novas populações, sendo vista como causa principal da extinção em escala mundial de anfíbios (AGOSTINE et al, 2015).

A comprovação da ocorrência de *Bd* em Picos-Piauí é de extrema importância, uma vez que esse fungo tem sido apontado como a causa da morte de anfíbios no mundo todo e a retirada de anfíbios em um ambiente deve, portanto, acarretar em desequilíbrio ecológico (TOLEDO et al., 2010). E só foi relatada a ocorrência do *Bd* na Região Nordeste em Pernambuco (TOLEDO et al., 2006), um estado, e no presente trabalho novo registro de distribuição do *Bd* para o Sul do Piauí.

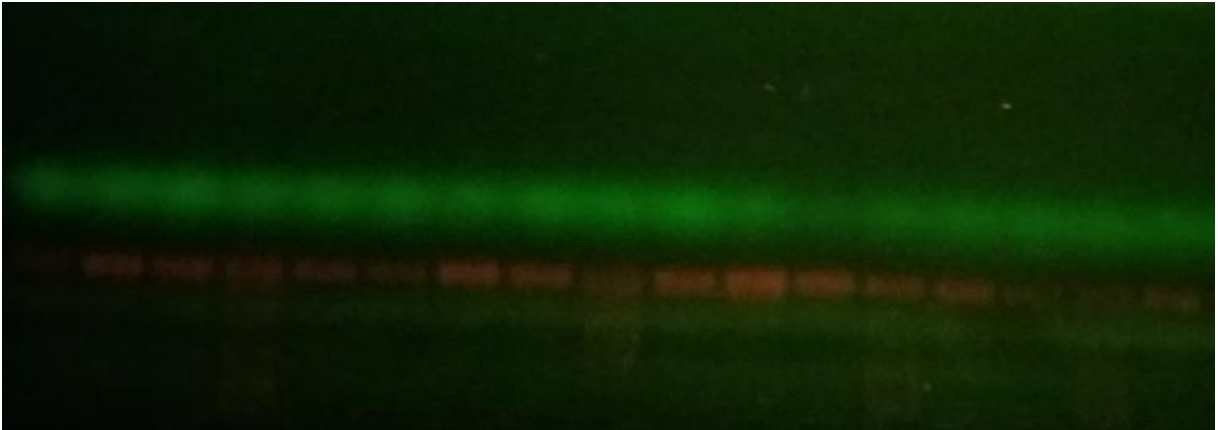
### 5.3 Identificação do *Bd* por Biologia Molecular

Na avaliação por biologia molecular, a cultura de fungos foi positiva para pelo menos 4 tipos de colônias (Figura 6).



**Figura 6.** Fungos crescidos em meio de cultura específica para fungos apresentando mais de três colônias por placa, ambientes A1 e A2.

Na análise do DNA para os espécimes desses ambientes utilizando as técnicas de PCR com primers específicos para a identificação do *Bd* foi possível a, verificar que todas as amostras sem exceção apresentaram amplificação da região específica do fungo *Bd* e deste modo foi possível detectar 100% de colonização do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em *Rhinella jimi* dos ambientes A1 e A2 (Figura 7).



**Figura 7.** Corrida do DNA obtido demonstrando 100% de compatibilidade do fungo *Bd* para as amostras dos dois ambientes estudados.

Na atualidade, a técnica de PCR, independentemente de ser uma técnica mais cara, é o método mais utilizado, por ser rápido, não invasivo (promove a detecção de forma múltipla de animais ainda vivos), é de grande sensibilidade e possui uma especificidade grande se comparado com outros métodos de diagnósticos disponíveis (BOYLE et al. 2007).

A confirmação da presença de fungos nos espécimes analisadas é de extrema importância, uma vez que entender o mecanismo e como esse patógeno funciona, os efeitos que podem causar sobre os organismos, a sua amplitude de atuação, além da sua atuação com relação ao hospedeiro ainda é bastante difícil. O *Bd* vive exclusivamente no tegumento dos anfíbios adultos e na cavidade oral de girinos, e se alimentam da queratina existente nesses locais, na qual a queratina é um componente natural da células da pele, que serve como proteção e ornamento. A queratina está presente nas nossas unhas e cabelos, porém o *Bd* ataca apenas anfíbios (VERDADE et al, 2010).

Deste modo foi possível confirmar a presença do fungo *Bd* através da biologia molecular. A detecção de sinais de quitridiomycose através da análise óptica, tendo

em vista que indivíduos com a doença costuma apresentar alterações como vermelhidão na pele, convulsões com extensão dos membros pélvicos, acumulações de escamas da pele sobre o corpo, descamação superficial da epiderme das patas e de outras áreas, ligeira rugosidade da superfície com pequenas marcas na pele, ocasionalmente pequenas úlceras e hemorragias e mudança na coloração (TOLEDO et al, 2006).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Na análise do DNA para os espécimes desses ambientes utilizando as técnicas de PCR com primers específicos para a identificação do *Bd* foi possível a, verificar que todas as amostras sem exceção apresentaram amplificação da região específica do fungo *Bd* e deste modo foi possível detectar 100% de colonização do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* em *Rhinella jimi* dos ambientes A1 e A2.
- A Quitridiomicose detectada por descamação da pele dos membros, região ventral, despigmentação da região dorsal e vermelhidão na região ventral inguinal.
- Primeiro registro da presença do *Bd* em *R. jimi* do Sul do Piauí.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, I. C. **Dimorfismo sexual, crescimento e longevidade de *Rhinella rubescens* e *R. schneideri* (Anura Bufonidae) no Cerrado do Brasil Centra.** 2010. 8f. Dissertação (mestrado em ecologia) – Universidade de Brasília (Instituto de Ciências Biológicas), Brasília, 2010.
- SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica, São Paulo, out. 2006.
- SEGALLA, M. V. et al. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 34-46, 2016.
- BENÍCIO, R. A. & FONSECA, M. G. Guias ilustrado de anfíbios e répteis de Picos-Piauí. pag.23. Teresina: EDUFPI, 2014.
- BIZZO, N. **Novas bases da Biologia: Biodiversidade.** 2. ed. São Paulo: Ática, 2014. 180-181 P, vol. 2.
- CANTO, E. D. **Ciências naturais: Aprendendo com o cotidiano.** 4. ed. São Paulo: Moderna, 2012. 82p.
- CASSEMIRO, F. A. S.; GOUVEIA, S. F.; DINIZ FILHO, J. A. F. Distribuição de *Rhinella granulosa*: integrando envelopes bioclimáticos e respostas ecofisiológicas. **Revista da Biologia**, Universidade Federal de Goiás, vol. 8, p. 38-44, Jun. 2012.
- COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.92, p.93-99, 2010.
- DE PAULA, C.D.; CATÃO-DIAS, J. L. Chytridiomycosis: a Devastating Emerging Fungal Disease of Amphibians. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.3, p.250-258, 2011.
- STEVAUX, M. N. The new species of *Bufo* (Anura, Bufonidae) in the Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 235-242, 2002.
- JAMES, T. Y.; VILGALYS, R. Amphibian chytridiomycosis as an emerging infectious disease of wildlife: what can we learn from the earliest diverging fungi?. In J. HEITMAN et al., [eds.]. **Molecular Principals of Fungal Pathogenesis.**ASM Press, Washington, D. C. p. 271-278, 2006.
- LINHARES, S; GEWANDZNAIDEP, F. **Biologia hoje: os seres vivos.** 2. ed. São Paulo: Ática, 2014. 198 P, vol. 2.
- LUTZONI, F. et al. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. **American Journal of Botany**, v.91, p.1446-1480, 2004.

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

DE ALMEIDA NASCIMENTO, Cristiane; PIRES-ZOTTARELLI, Carmen Lidia Amorim. Chytridiales (Chytridiomycota) do Parque Estadual da Serra da Cantareira, SP, Brasil Chytridiales (Chytridiomycota) from Serra da Cantareira State Park, São Paulo State, Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 459-473, 2009.

VOYLES, J.; YOUNG, S.; BERGER, L.; CAMPBELL, C.; VOYLES, W.F.; DINUDOM, A.; COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R.A.; SKERRATT, L.F.; SPEARE, R. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 582-585, 2009.

SAITO, Erica Naomi et al. Características ecológicas dos anuros ameaçados de extinção na Floresta Atlântica subtropical do Brasil. 2013. Pag.21. Dissertação (mestrado em Ecologia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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.

OLIVEIRA, T. C. D.; SOUSA, A. P. M.; CHAVES, M. F.; COSTA, D. F. S.; FERREIRA, L. L. Habito Alimentar de *Rhinella jimi*, (STEVAUX, 2002) (ANURA: BUFONIDAE) em um Semiárido. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido (ACSA)**, Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde. Tecnologia Rural. Campus de Patos – PB, v. 10, n. 4, p. 19-25, out-dez. 2014.

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.

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.

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.

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*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 350-380, 2012.

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.

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

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.

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.

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.

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.

ASSIS, A. B. Microbiota secreções cutâneas e microclima: Consequencias para os anfíbios. **Revista de Biologia**, Brasil, v. 8, p. 45-48, jun. 2012

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.

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.

ORR, R. T. **Biologia dos Vertebrados**. 5. Ed. California my of sciences San Francisco, California: Roca, 2009, 73p.

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.

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.

PAULA, Catia Dejuste de. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo**

**prospectivo**.2011. pag.38. Tese (Doutorado em ciência) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TOLEDO, L. F.; BRITO, F. B.; ARAÚJO, O. G. S.; GIASSON, L. M. O.; HADDAD, C. F. B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and inclusion 17 new cases. **S. Am. Journal Herpetology**, v. 1, p. 185-191, 2006.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA  
"JOSÉ ALBANO DE MACEDO"

Identificação do Tipo de Documento

- ( ) Tese  
 ( ) Dissertação  
 ( X ) Monografia  
 ( ) Artigo

Eu, Janelle de Moura Costa,  
 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  
Primeiro Registro de *Batrachochytrium dendrobatidis* causador da  
epidemiocose em rãs-da-floresta, 2002 para região semi-árida  
brasileira por biologia molecular e análise morfológica

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 24 de Abril de 2009

Janelle de Moura Costa  
 Assinatura

Assinatura