

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

**PARASITOS SANGUÍNEOS E ÁCAROS TROMBIDIFORMES ASSOCIADOS
AO PERFIL HEMATOLÓGICO DE *LEPTODACTYLUS LATRANS* DA
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE, BRASIL**

LINA CRESPO BILHALVA

Porto Alegre

2019

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

**PARASITOS SANGUÍNEOS E ÁCAROS TROMBIDIFORMES ASSOCIADOS
AO PERFIL HEMATOLÓGICO DE *LEPTODACTYLUS LATRANS* DA
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE, BRASIL**

Autor: Lina Crespo Bilhalva

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Parasitologia Veterinária

Orientador: Prof. Dr. João Fabio Soares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Stella de Faria Valle

Porto Alegre

2019

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

CIP - Catalogação na Publicação

Bilhalva, Lina Crespo
Parasitas sanguíneos e ácaros trombidiformes
associados ao perfil hematológico de *Leptodactylus*
latrans da mesorregião metropolitana de Porto Alegre,
Brasil / Lina Crespo Bilhalva. -- 2019.

63 f.

Orientador: João Fabio Soares.

Coorientador: Stella de Faria Valle.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Anfíbios. 2. Hematologia. 3. Parasitologia. 4.
Herpetologia. 5. Patologia Clínica. I. Soares, João
Fabio, orient. II. Valle, Stella de Faria, coorient.
III. Título.

Lina Crespo Bilhalva

**PARASITOS SANGUÍNEOS E ÁCAROS TROMBIDIFORMES ASSOCIADOS
AO PERFIL HEMATOLÓGICO DE *LEPTODACTYLUS LATRANS* DA
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE, BRASIL.**

Aprovada em 29 de março de 2019

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Fabio Soares
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a. Dr^a. Nádia Regina Pereira Almosny
Membro da Comissão

Dr^a. Caroline Zank
Membro da Comissão

Dr^a. Aline Giroto Soares
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. João Fabio e coorientadora, Prof^a. Stella pelo incentivo do começo ao fim.

Aos integrantes do Laboratório de Herpetologia da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, em especial ao Dr. Patrick Colombo. Não tenho dúvidas que vocês foram o maior impulso para que esse projeto acontecesse.

A todos do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS pelo tempo gasto aprendendo e me ajudando para a utilização da câmera e software de mensuração.

Ao Dr. Nuno Pereira, do Oceanário de Lisboa, por ter me direcionado quanto aos locais de coleta de sangue em anfíbios.

À minha namorada, amigos e família por toda a paciência durante esses dois anos.

A todos amigos e colegas que acreditam na pesquisa e me ajudaram nas coletas a campo.

RESUMO

Declínios populacionais são registrados em espécies de anfíbios por todo o mundo há décadas, ocorrendo com maior severidade do que em outros vertebrados. Entre outras causas, podem ser observados após o surgimento de doenças. No Brasil, dados a respeito destes declínios são bastante escassos devido a diversas razões, como a falta de conhecimento a respeito da biologia dos animais nativos e a grande diversidade de espécies. Uma das medidas para a conservação destes animais é a expansão das pesquisas a respeito de suas doenças. Em uma comunidade estável, parasitos possuem a tendência de não causar enfermidades, no entanto, desequilíbrios podem alterar esse quadro. Até o presente momento, estudos a respeito dos parasitos sanguíneos e intradérmicos de anfíbios não haviam sido realizados no sul do Brasil e não havia registros de levantamentos hematológicos de anuros da família Leptodactylidae. Baseado nisso, foram coletadas amostras para análises hematológicas, incluindo pesquisa por hemoparasitos, bem como inspeção e coleta de parasitos intradérmicos em indivíduos da espécie *Leptodactylus latrans* em áreas com diferentes níveis de impacto da mesorregião metropolitana de Porto Alegre. No hemograma foi observado que as células sanguíneas destes animais são menores do que as encontradas em diversos anfíbios já estudados. Ao comparar os dados, animais com parasitos sanguíneos intracelulares apresentaram menor volume corpuscular médio (VCM), podendo indicar uma regeneração eritrocitária. Por outro lado, indivíduos parasitados por ácaros possuíam uma maior quantidade de monócitos e neutrófilos circulantes, demonstrando que houve uma reação do hospedeiro frente à infestação. Nos animais deste estudo também foi observada uma elevada ocorrência de hemoparasitos, posicionados em diversos táxons, com distribuição relacionada à área de coleta. Além disso, somente os anfíbios coletados em locais de acentuado e moderado impacto possuíam ácaros parasitando sua derme. Estes dados podem auxiliar a compreensão do tema, bem como guiar futuros estudos a respeito da fauna parasitária, hematologia e conservação de anfíbios.

Palavras-chave: anfíbios, hematologia, hemoparasitos, parasitos intradérmicos, patologia clínica.

ABSTRACT

*Declines in amphibian populations have been recorded all over the world for decades, occurring more severely than in another vertebrates. Among several causes, it can happen after the appearance of diseases. In Brazil, these data are very scarce due to several reasons, such as the lack of knowledge about the biology of native animals and the great diversity of species. One of the measures for the conservation of these animals is the expansion of research on their diseases. In a stable community, parasites tend to not cause disease, however, imbalances can change this picture. Until this moment, studies on blood and intradermal parasites of amphibians have not been recorded in southern Brazil and there were no data of hematological surveys of anurans of the Leptodactylidae family. Based on this, sample were collected for hematological analyzes, including research for hemoparasites, as well as inspection and collection of intradermal parasites in individuals of *Leptodactylus latrans* in areas with different impact levels of the metropolitan mesoregion of Porto Alegre, southern Brazil. On the hemogram, it was observed that the blood cells of these animals seems to be the smallest among several amphibians studied. When comparing the data, animals with intracellular blood parasites showed a lower mean corpuscular volume (MCV), which may indicate erythrocyte regeneration. On the other hand, mite-parasitized animals had a greater amount of monocytes and neutrophils, demonstrating that there's a reaction to infestations by the host. In the animals of this study was also observed a higher frequency of hemoparasites of several taxa, with distribution related to the loading spot. In addition, only amphibians collected in places with marked and moderated impact had mites parasitizing their skin. These data may help to understand and guide future studies on parasitic fauna, hematology and amphibian conservation.*

Key-words: *amphibia, clinical pathology, hematology, hematology, hemoparasites, intradermal parasites.*

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** - Mapa da mesorregião metropolitana de Porto Alegre com os pontos em que foram realizadas as coletas dos animais.....18
- Figura 2** - Gráfico de barras demonstrando o percentual de indivíduos infectados por táxon ou morfotipo de hemoparasito de acordo com o local de coleta.....22
- Figura 3** - Hemoparasitos intracelulares encontrados em *L. latrans*. A: hemogregarina “A”; B: hemogregarina “B”; C: hemogregarina “C” no interior de eritrócito; D: hemogregarina “C” livre; E: meronte de *Dactylosoma* spp.; F: meronte de *Dactylosoma* spp.; G: esporozoíto de *Lankesterella* spp. no interior de eritrócito; H: esporozoíto de *Lankesterella* spp. livre; I: apicomplexa não identificado no interior de neutrófilo. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.....24
- Figura 4** - Hemoparasitos extracelulares e outras inclusões encontradas em esfregaço sanguíneo de *L. latrans*. A: microfilária; B: *Trypanosoma* spp. “A”; C: *Trypanosoma* spp. “B”; D: *Trypanosoma* spp. “C”; E: *Trypanosoma* spp. “D”; F: *Trypanosoma* spp. “E”; G: mórula de *Aegyptianella* spp.; H: corpúsculo de inclusão do FEV. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.....26
- Figura 5** - Ácaros do gênero *Hannemania* em *L. latrans*. A: região interior dos membros inferiores, com acentuada presença de vesículas contendo o parasito. B: larva de *Hannemania* spp. em aumento de 100x.....27

ARTIGO 2

- Figura 1** - Células sanguíneas de *L. latrans*. A: eritrócito (seta) e policromatófilo (cabeça de seta); B: pequeno linfócito (seta) e trombócito (cabeça de seta); C: agregado trombocitário; D: pequeno linfócito (seta) e grande linfócito (cabeça de seta); E: neutrófilos bilobados; F: eosinófilo; G: basófilo (seta) e linfócito (cabeça de seta); H: monócito azurófilo. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.....42

LISTA DE TABELAS**ARTIGO 2**

- Tabela 1** - Áreas de coleta de acordo com o número de indivíduos, situadas na mesorregião metropolitana de Porto Alegre.....38
- Tabela 2** - Dimensões de eritrócitos e leucócitos de *L. latrans* - média \pm desvio-padrão (amplitude) -.....43
- Tabela 3** - Valores obtidos no hemograma de *L. latrans* - média \pm desvio-padrão (amplitude) - no grupo geral, na presença e ausência de ácaros, hemoparasitos extracelulares e hemoparasitos intracelulares.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Acentuadamente Impactada
BAB	<i>Blood Agar Base</i>
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CRC	Comprimento Rostro-Cloacal
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCM	Diâmetro Celular Máximo
DCm	Diâmetro Celular Mínimo
DNM	Diâmetro Nuclear Máximo
DNm	Diâmetro Nuclear Mínimo
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA-K ₂	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Dipotássico
FEV	<i>Frog Erythrocytic Virus</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LACVet	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
MI	Moderadamente Impactada
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Pouco Impactada
PPT	Proteínas Plasmáticas Totais
ProtozooVet	Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Veterinárias
TEIP	Taxa de Eritrócitos com Inclusões Parasitárias
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SSU rRNA	<i>Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
'	Segundo
''	Minuto
S	Sul
O	Oeste
GL	Gay Lussac
®	Marca registrada
%	Por cento
C	Celsius
pb	Pares de base
µL	Microlitro
mM	Milimolar
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
nmol	Nanomole
µm	Micrometro
n	Número
rcf	Força centrífuga relativa
x	Vezez
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
g	Gramma
dL	Decilitro
fl	Fentolitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	15
3.1	Artigo 1.....	15
3.2	Artigo 2.....	36
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980 são registrados declínios populacionais de anfíbios em todo o mundo (SILVANO; SEGALLA, 2005). Atualmente estes animais são considerados como mais ameaçados que aves e mamíferos, uma vez que mais de um terço de suas espécies passam por processos severos de redução da população ou até mesmo extinção (STUART et al., 2004; IUCN, 2019). Existem dois fatores considerados como principais responsáveis, sendo estes a perda de habitat, que causa uma contração gradual e fragmentação de populações, e a quitridiomiose, doença fúngica recentemente descoberta responsável por uma elevada mortalidade em diversas espécies de anfíbios. Outros fatores incluem as mudanças climáticas, radiação UV-B, contaminantes ambientais, áreas restritas de distribuição, caça predatória, introdução de espécies exóticas e doenças, além dos declínios enigmáticos (STUART et al., 2004; YOUNG et al., 2005; BEEBEE; GRIFFITHS, 2005). É estimado que centenas de espécies de anfíbios tornem-se extintas nas próximas décadas caso não ocorra uma rápida compreensão e reversão dessas causas (STUART et al., 2004).

Estes declínios populacionais exibem certos padrões taxonômicos, bem como regionais. A família Leptodactylidae, típica da região neotropical, é uma das quatro famílias que apresentaram declínio populacional significativamente mais rápido quando comparadas com outros anfíbios (STUART et al., 2004). Um representante desta família no Rio Grande do Sul é a rã-crioula, *Leptodactylus latrans* (syn. *Leptodactylus ocellatus*), a maior rã do estado, com uma ampla distribuição na América do Sul ao leste dos Andes (BORGES-MARTINS et al., 2007; LAVILLA et al., 2010; FROST, 2019).

No Brasil existem poucos dados a respeito de declínios populacionais em anfíbios, principalmente devido à falta de conhecimento a respeito da biologia desses animais e estudos de monitoramento em longo prazo (SILVANO; SEGALLA, 2005). Entre diversas medidas para a conservação de anfíbios na América, Young et al. (2005) sugeriram a ampliação de pesquisas a respeito das doenças e possíveis contaminantes desses animais, além de expandir seu monitoramento.

Em uma comunidade estável, parasitos e seus hospedeiros tem a oportunidade de evoluir em conjunto, resultando em uma relação pouco patogênica em animais sadios. Entretanto, na presença de distúrbios, como destruição do habitat, efeitos patogênicos podem se tornar aparentes, resultando em uma desestabilização da população de hospedeiros e, conseqüentemente, na teia alimentar. Alguns parasitos aparentam ser

bastante sensíveis às mudanças ambientais, enquanto outros demonstram mais resistência que os próprios hospedeiros, podendo crescer em número em situações críticas relacionadas à poluição (COMBES, 1996; MACKENZIE, 1999).

Protozoários apicomplexas, flagelados e microfilárias são capazes de parasitar o sangue de anfíbios (REICHENBACH-KLINKE; ELKAN, 1965; ARIKAN; CICEK, 2014). Estudos a respeito dos hemoparasitos desses animais são raros na América do Sul, com relatos na Argentina (ATTADEMO et al., 2011), Costa Rica (DESSER, 2001; MCKENZIE; STARKS, 2008) e Colômbia (CARVAJAL; RUBIO, 1984). No Brasil, são restritos às regiões Sudeste e Centro-Oeste (COSTA; PEREIRA, 1971; FERREIRA et al., 2007; LEMOS et al., 2008; LEAL et al., 2009). Até o presente momento e conhecimento do autor, não havia dados sobre a região sul do país.

Entre os parasitos da derme de anfíbios, destaca-se o gênero *Hannemania*, composto por ácaros de pelo menos 24 espécies descritas no continente americano e Oceania. Esses animais são observados parasitando a derme de anfíbios durante a fase larval, enquanto suas ninfas e adultos são encontrados em vida-livre (ALZUET; MAURI, 1987; SILVA-DE LA FUENTE, 2016). Embora o gênero já possua descrição em *L. latrans* (ALZUET; MAURI, 1987), seu impacto sobre a fisiologia do hospedeiro é pouco compreendido.

Anfíbios também podem atuar como bioindicadores e sua hematologia parece estar diretamente ligada às condições ambientais (WELSH; OLLIVIER, 1998; ZHELEV et al., 2015). Embora poucas espécies possuam seus parâmetros hematológicos descritos, a avaliação hematológica destes animais pode ser valiosa (WRIGHT, 2001; ALLENDER; FRY, 2008). Na família Leptodactylidae estes estudos são restritos ao diferencial leucocitário e morfologia celular (ATTADEMO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2017; FANALI et al., 2018).

2 OBJETIVOS

Avaliação hematológica e pesquisa por parasitos intradérmicos e sanguíneos em anfíbios anuros da espécie *Leptodactylus latrans* coletados em locais com diferentes níveis de impacto na mesorregião metropolitana de Porto Alegre.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os artigos científicos a seguir foram formatados com a finalidade de submissão à revista *Journal of Wildlife Diseases*, com excessão do idioma, que será traduzido ao inglês posteriormente. As figuras e tabelas foram inseridas em meio ao texto a fim de facilitar a visualização do leitor, sendo realocadas no momento da submissão.

3.1 Artigo 1

Parasitas sanguíneos e ácaros trombidiformes em *Leptodactylus latrans* de vida livre da mesorregião metropolitana de Porto Alegre, Brasil

Blood parasites and chiggers in free-living Leptodactylus latrans of the metropolitan mesoregion of Porto Alegre, Brazil

Lina Crespo Bilhalva ^{1,5}, Patrick Colombo ², Arlei Marcili ⁴, Stella de Faria Valle ³, João Fabio Soares ¹

¹Laboratório de Protozoologia, Departamento de Patologia Clínica Veterinária (Protozoovet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bento Gonçalves Ave 9090, Porto Alegre, 90540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB-RS). Salvador França St 1427, Porto Alegre, 90690-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Patologia Clínica Veterinária (LACVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bento Gonçalves Ave 9090, Porto Alegre, 90540-000, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva St 87, São Paulo, 05509-270, São Paulo, Brasil

⁵Autor correspondente (email: li.na@msn.com).

RESUMO

Anfíbios representam uma grande proporção da biomassa de vertebrados, que ao ser reduzida pode gerar efeitos imprevisíveis em outras espécies. Declínios populacionais desses animais vêm sendo atribuídos a diversas causas, como a ocorrência de doenças infecciosas. Uma das famílias de anuros com declínio mais acentuado é a Leptodactylidae, que possui a espécie *Leptodactylus latrans* como representante, considerada a maior rã do Rio Grande do Sul. O objetivo do trabalho foi relatar a ocorrência de hemoparasitos, detectados através de cultura para tripanossomídeos, visualização no esfregaço sanguíneo e técnicas de biologia molecular, e ácaros trombidiformes acometendo estes animais na mesorregião metropolitana de Porto Alegre. Foi observada uma ocorrência de hemoparasitos superior a diversos outros trabalhos, com distribuições diretamente relacionadas à área estudada e riqueza de espécies correlacionado com o CRC (comprimento rostro-cloacal) dos animais. A presença de ácaros entre os animais também foi associada com o local da coleta dos animais ao ocorrer somente em áreas moderadamente e acentuadamente impactadas. Estes resultados constituem os primeiros registros de distribuição destes parasitos em *L. latrans* da região.

Palavras-chave: anfíbios, *Hannemania*, hemoparasitos, *Trypanosoma*

INTRODUÇÃO

Anuros representam a mais diversa ordem de anfíbios, com uma reconhecida importância na biodiversidade e conservação. Em regiões tropicais e temperadas anfíbios participam de uma grande proporção na biomassa de vertebrados, que, quando reduzida, poderia causar efeitos imprevisíveis na população de outras espécies (Daszak et al. 1999). Declínios populacionais destes animais são registrados há décadas, porém, enquanto alguns podem ser claramente atribuídos à perda de habitat, outros vêm sendo associados à introdução de predadores, competidores, aumento na radiação ultravioleta, chuva ácida, mudanças climáticas, poluição ambiental e doenças infecciosas (Daszak et al. 1999; Silvano and Segalla 2005).

Aprofundar o conhecimento a respeito das diversas relações tróficas em comunidades tropicais é essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação bem-sucedidas (Solé et al. 2009). Entretanto, ainda são escassos estudos sobre as interações de anfíbios com os diferentes níveis tróficos, como o parasitismo (D’Bastiani et al. 2018).

Em um estudo de Stuart et al. (2004), uma das famílias de anfíbios que apresentou declínio significativamente mais rápido foi a Leptodactylidae, típica da região neotropical. Nela encontra-se a rã-crioula, *Leptodactylus latrans*, a qual possui o título de maior rã do Rio Grande do Sul, com uma ampla distribuição na América do Sul ao leste dos Andes (Borges-Martins et al. 2007; Frost 2019). Essa espécie é caracterizada por ser um anfíbio de grande porte com hábitos noturnos e alimentação generalista, podendo ser encontrada em lagoas, rios e lagos, em áreas naturais e também em locais fortemente impactados pelo homem (Maneyro et al. 2004; Solé et al. 2009). A exposição à ambientes aquáticos e terrícolas leva a um maior contato com ectoparasitos hematófagos, como sanguessugas e dípteros, os quais podem servir como vetores de diversos parasitos sanguíneos (Barta et al. 1989), além de predispor a infestação por ácaros trombidiformes (Rankin 1937).

O presente estudo tem como objetivo relatar a ocorrência de hemoparasitos e ácaros trombidiformes em anfíbios de vida livre da espécie *L. latrans* na mesorregião metropolitana de Porto Alegre. Até o presente momento, não havia informação a respeito dos parasitos sanguíneos de anfíbios do sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Durante o ano de 2018, indivíduos de *L. latrans* foram identificados e capturados por busca ativa em cinco pontos de coleta (Figura 1), localizados em áreas com diferentes níveis de impacto, definidos como pouco, médio ou acentuado. As áreas pouco impactadas (PI) se caracterizavam por vegetação do tipo Mata Atlântica, discretamente antropizadas (29°30'45.7"S 50°06'36.2"O e 29°31'00.7"S 50°05'12.4"O). Campo de produção agropecuária e área suburbana foram caracterizados como moderadamente impactados (MI) (30°4'9.04"S 50°52'41.20"O e 30°13'32.5"S 51°03'05.6"O). Quando intensamente antropizado, em efluentes sanitários de área urbana, classificou-se como acentuadamente impactado (AI) (29°50'46.9"S 50°30'47.5"O). Durante a manipulação dos animais foi medido o comprimento rostro-cloacal (CRC) e coletado sangue por punção da veia femoral, com o acondicionamento das amostras em três frascos: um tubo contendo meio específico para cultura de tripanossomas, um tubo contendo heparina lítica (Microtainer, BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) e, quando possível, outro tubo contendo EDTA-K₂ (Microtainer,

BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). Na presença de parasitos intradérmicos, procedeu-se a contagem de indivíduos, coleta por raspagem com bisturi estéril e armazenamento em álcool 70°GL. As amostras foram destinadas ao Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para processamento. Os procedimentos foram realizados conforme aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS registrado sob número 33987 e autorizados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob número 60906-1 no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

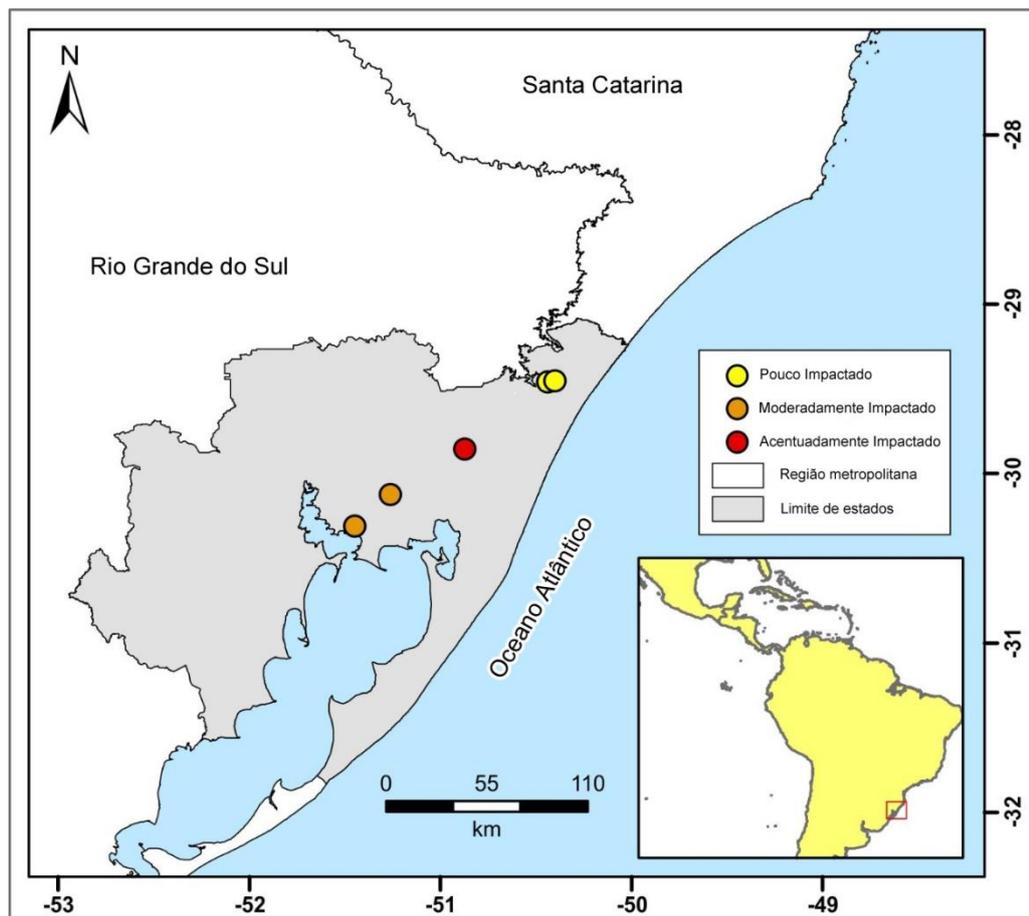


Figura 1. Mapa da mesorregião metropolitana de Porto Alegre com os pontos nos quais foram realizadas as coletas dos animais.

Pesquisa por hemoparasitos em lâmina

As extensões sanguíneas confeccionadas foram fixadas e coradas, primeiramente com Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e posteriormente com Panótico Rápido® (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil), para facilitar a visualização. A

avaliação microscópica foi realizada sempre pelo mesmo operador em aumentos de 100x, 400x e 1000x, em que foram procuradas alterações morfológicas compatíveis com hemoparasitos extracelulares e intracelulares além de inclusões virais e bacterianas.

Cultura para tripanossomas

Foram inoculadas aproximadamente três gotas de sangue total recém coletado em tubo com meio bifásico constituído por uma fase sólida BAB (*blood agar base*) com 10% de sangue de coelho, e uma fase líquida de meio LIT (*liver infusion tryptose*) com soro fetal bovino e antibióticos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente até seu envio ao laboratório para processamento, onde permaneceram em estufa DBO (demanda bioquímica de oxigênio) a 28°C. Após dez dias, uma pequena fração deste meio foi posicionada sob lâmina e lamínula, onde foi analisada em microscópio óptico a presença de tripanossomatídeos (Marcili et al. 2013). Novas avaliações ocorreram a cada sete dias, até cumprir o protocolo de 30 dias de análise para a determinação de amostra negativa.

Extração de DNA

Foi realizada extração de DNA de 17 amostras de sangue armazenadas em tubos contendo EDTA-K₂ e 23 amostras armazenadas em heparina, através de kit comercial (Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Essas amostras foram mantidas congeladas a -20°C até a realização do PCR.

Desenho de primers

Sequências do gene 18S dos filarídeos *Dirofilaria immitis*, *Onchocerca cervipedis*, *Dipetalonema* sp., *Spirocerca lupi*, *Wuchereria bancrofti* e do anuro *Scinax elaeochroa* (catalogados no GenBank sob códigos AF182647.1, KT031393.1, DQ531723.1, MG957121.1, AY843438.1 e EF376113.1 respectivamente) foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (Thompson et al. 1994) com auxílio do software BioEdit. Desta forma, foi possível selecionar duas regiões polimórficas entre as sequências dos filarídeos e do anuro, porém conservada entre os helmintos. As sequências resultantes foram submetidas à análise no programa OligoAnalyzer 3.1 IDT, o qual verificou a probabilidade de formação de *hair-pin* e dímeros de *primer*. Desta forma, resultaram as sequências senso FilF (5' GAC CGT TCT CTT TGA GGC C 3') e

consenso FilR (5' TTT GTA GGC TAG AGT CTC GCT C 3'), capazes de gerar um fragmento de aproximadamente 900 pb.

Ensaio de PCR e eletroforese

Os primers FilF e FilR foram utilizados a fim de amplificar a região 18S SSU de representantes da superfamília Filarioidea. A reação foi realizada adicionando 2,5 µL de DNA extraído, 2,5 µL de Buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,8 µL de MgCl₂ (50mM Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,15 µL de Taq Polimerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 4,0 µL de dNTP (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1,3 µL de cada primer a 10 nmol e 12,45 µL de água Milli-Q totalizando um volume de 25 µL. Para cada reação foi utilizado um controle negativo (água Milli-Q) e um positivo (amostra de *Dirofilaria immitis* proveniente de um cão).

As condições para o PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 38 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1,5 minuto a 56°C e 2 minutos a 72°C. A extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com o auxílio de corante Safer (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Purificação e sequenciamento

O produto de PCR amplificado foi purificado (Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e enviado para sequenciamento automático tipo Sanger. A qualidade das sequências obtidas foi analisada com os softwares Finch TV[®] e Embrapa[®] Eletropherogram. A sequência consenso foi submetidas à análise de *Blast* (Altschul et al. 1990) para verificação de similaridade com sequências depositadas no *GenBank* e confirmação da identidade do agente encontrado.

Análises estatísticas

A quantidade de parasitos intradérmicos foi analisada entre as diferentes estações do ano (verão, outono e inverno) e, juntamente com a riqueza de hemoparasitos, avaliados em relação aos locais de coleta, os quais foram testados por análise de variância multivariada (MANOVA) via testes de aleatorização através do

software Multiv 3.55b (DePatta-Pillar 1997). A medida de semelhança para as análises foi o índice de Jaccard e 10000 randomizações. Também foi realizada correlação entre a riqueza de espécies de hemoparasitos e CRC nas diferentes áreas através do Teste de Correlação de Pearson com o software PAST 3 (Hammer et al. 2001). O nível de significância utilizado como valor critério para a rejeição da hipótese nula foi 5% ($p \leq 0,05$).

Imagens e mensurações

As lâminas de esfregaço sanguíneo foram visualizadas em microscópio óptico AxioScope A1 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), o qual continha uma câmera AxioCam 105 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) que destinava as imagens ao software Zen 2.3 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha). Neste programa foi possível realizar a mensuração, quando bem delimitadas, das estruturas visualizadas, bem como a obtenção das imagens em escala assinalada.

RESULTADOS

No total, 40 indivíduos foram coletados, 11 na área PI, 11 na MI e 18 na AI. Nas três áreas foram realizadas coletas ao longo do verão, entretanto, na AI também ocorreu durante os meses de outono ($n=5$) e inverno ($n=6$). Estes grupos possuíam riquezas hemoparasitárias médias similares, entretanto, foram estatisticamente diferentes quanto à distribuição dos táxons e morfotipos de parasitos ($p=0,0001$), os quais foram agrupados em gráfico de barras (Figura 2). Somente na área AI verificou-se correlação entre a riqueza de hemoparasitos e o CRC dos anfíbios coletados ($p=0,007$).

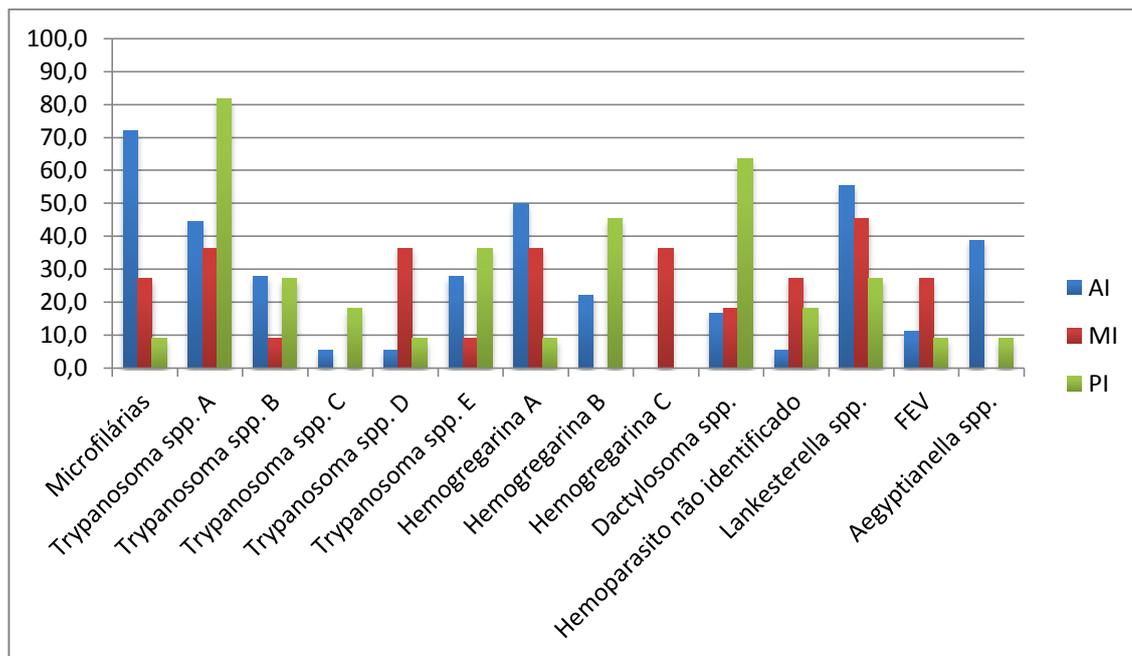


Figura 2. Gráfico de barras demonstrando o percentual de indivíduos infectados por táxon ou morfotipo de hemoparasito de acordo com o local de coleta. AI: área acentuadamente impactada; MI: áreas moderadamente impactadas; PI: áreas pouco impactadas.

Foram observadas estruturas compatíveis com protozoários, bactérias ou inclusões virais em amostras sanguíneas de 92,5% (37/40) dos anfíbios avaliados. Essas estruturas foram classificadas como hemogregarina “A”, hemogregarina “B”, hemogregarina “C”, *Dactylosoma* spp., *Lankesterella* spp., *Aegyptianella* spp., corpúsculo do vírus eritrocitário de anfíbios (FEV), hemoparasito intraleucocitário não-identificado, *Trypanosoma* spp. “A”, *Trypanosoma* spp. “B”, *Trypanosoma* spp. “C”, *Trypanosoma* spp. “D”, *Trypanosoma* spp. “E” e microfilária.

Hemogregarinas foram observadas no interior de eritrócitos de 67,5% (27/40) dos animais. Hemogregarina “A” (Figura 3A) estava presente em 35% (14/40) das amostras, possuía núcleo redondo basofílico e citoplasma claro com granulações eosinofílicas. Podia ser encontrada em formato alongado medindo aproximadamente 8,36 μm por 3,38 μm , com núcleo de 1,76 μm de diâmetro (n=15) e em formas arredondadas de 6,67 μm por 3,96 μm , com núcleo de 1,48 μm de diâmetro (n=6), sendo mais frequente na área AI. Hemogregarina “B” (Figura 3B) foi observada em 22,5% (9/40) das amostras, como uma estrutura de citoplasma claro em formato alongado a oval medindo em média 7,93 μm por 2,45 μm (n=12) e núcleo discretamente eosinofílico e pouco delimitado, mais frequente nas áreas PI. Hemogregarina “C” (Figura 3C) esteve presente somente em amostras coletadas de animais das áreas MI,

totalizando 10% (4/40) dos indivíduos do estudo. Este foi o maior parasito intracelular observado, o qual possuía um formato alongado com extremidades arredondadas, citoplasma basofílico e núcleo em formato não delimitado, medindo aproximadamente 13,99 μm por 5,47 μm (n=5). Em algumas situações causava modificações no formato da célula hospedeira, ao gerar um deslocamento do núcleo eritrocitário para um dos polos. Este protozoário também pode ser encontrado livre (Figura 3D) na amostra, assumindo citoplasma mais escuro. *Dactylosoma* foi a única hemogregarina capaz de identificação morfológica em nível de gênero. Este protozoário foi detectado em 30% (12/40) das amostras, coletadas em sua maioria nas áreas PI, em dois estágios de merogonia, como merozoítos, menores e alongados, com um núcleo lateral e como merontes (Figura 3E-F), maiores e em formato arredondado ou *fan-like* com vários merozoítos no interior.

Compondo um dos hemoparasitos mais frequentes, *Lankesterella* spp. pode ser observada em 45% (18/40) das amostras, em todas as áreas coletadas, sendo visualizados como esporozoítos com corpos refringentes dentro de eritrócitos (Figura 3G) e, eventualmente, livres (Figura 3H). Nas amostras analisadas, costumava manter um formato alongado, levemente flexionado e com extremidades afiladas, medindo aproximadamente 7,44 μm por 2,55 μm (n=15), com citoplasma azul pálido e pequeno núcleo centralizado.

Um hemoparasito não identificado foi encontrado em 15% (6/40) amostras, parasitando leucócitos (Figura 3I) da série granulocítica (neutrófilos e eosinófilos) e linfócitos. Possuía formato alongado a oval com aproximadamente 6,67 μm por 4,18 μm (n=5), citoplasma pálido e núcleo discretamente eosinofílico. Não foi possível a determinação de um táxon mais específico para este parasito com base apenas em morfologia.

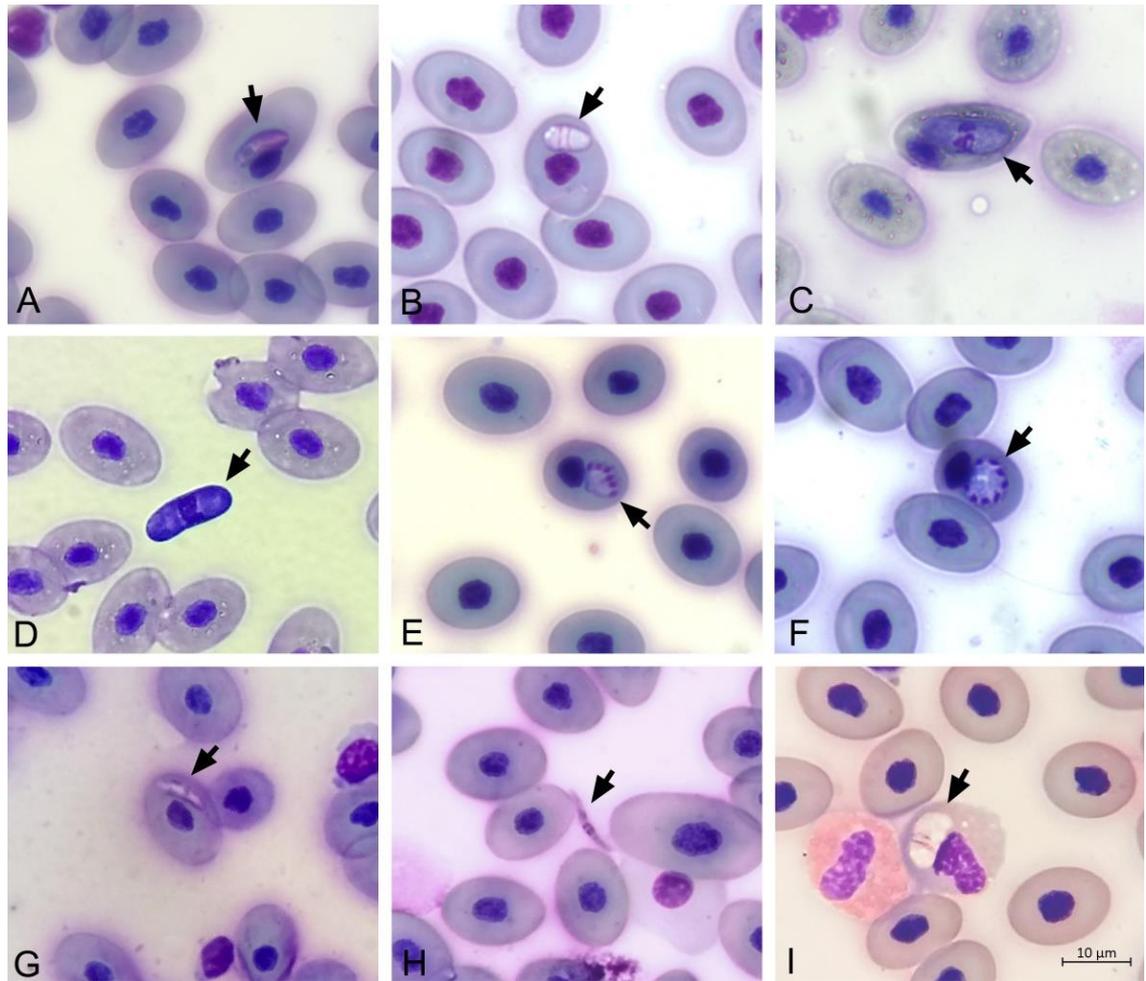


Figura 3. Hemoparasitos intracelulares encontrados em *L. latrans*. A: hemogregarina “A”; B: hemogregarina “B”; C: hemogregarina “C” no interior de eritrócito; D: hemogregarina “C” livre; E: meronte de *Dactylosoma* spp.; F: meronte de *Dactylosoma* spp.; G: esporozoíto de *Lankesterella* spp. no interior de eritrócito; H: esporozoíto de *Lankesterella* spp. livre; I: hemoparasito não identificado no interior de neutrófilo. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.

Microfilárias (Figura 4A) foram observadas em 42,5% (17/40) das amostras, principalmente aquelas coletadas da área AI, possuindo medidas aproximadas de 98,76 µm por 6,1 µm (n=15), compondo o terceiro hemoparasito mais frequente. No PCR, 15 das 17 amostras positivas no esfregaço sanguíneo obtiveram amplificação de banda. Ambas amostras que resultaram em falso negativo foram extraídas de sangue coletado em heparina. A amostra enviada para sequenciamento foi coletada na área AI e gerou um fragmento consenso de 643 pb com 95,96% de identidade com sequências de *Setaria digitata* (DQ094175.1), *Onchocerca cervicalis* (DQ094174.1) e *Acanthocheilonema viteae* (DQ094171.1).

Em 75% (30/40) das amostras analisadas foram detectados tripanossomas, sendo o hemoparasito com maior ocorrência no estudo. Entre estas amostras, somente sete foram positivas na hemocultura, embora não tenha sido possível realizar o isolamento do agente em nenhuma destas devido à inviabilidade do parasito no meio. Devido à dificuldade na classificação em nível de espécie com base somente na morfologia presente no hospedeiro, o gênero foi subdividido em cinco diferentes morfotipos. *Trypanosoma* spp. “A” (Figura 4B) foi o mais frequente entre os tripanossomas, ocorrendo em 52,5% (21/40) das amostras, principalmente nas áreas PI. Possuía um curto flagelo, pouco visível, e formato arredondado, com aproximadamente 32,8 µm de diâmetro e núcleo com 3,95 µm de diâmetro (n=10), justaposto ao cinetoplasto, compondo o maior parasito do gênero observado neste estudo. *Trypanosoma* spp. “B” (Figura 4C) estava presente em 22,5% (9/40) das amostras. Possuía formato arredondado, semelhante ao morfotipo A, porém menor, com aproximadamente 22,71 µm de diâmetro celular e 4,29 µm de diâmetro (n=8) do núcleo. *Trypanosoma* spp. “C” (Figura 4D) possuía formato filiforme, membrana ondulante bastante desenvolvida e um longo flagelo, com cinetoplasto na extremidade oposta, observada principalmente em amostras das áreas PI. Este foi o morfotipo de tripanossoma mais incomum, encontrado em somente 7,5% (3/40) dos indivíduos estudados. *Trypanosoma* spp. “D” (Figura 4E) e *Trypanosoma* spp. “E” (Figura 4F) foram encontrados em 15% (6/40) e 25% (10/40) das amostras, majoritariamente em áreas MI e PI, respectivamente. Ambos possuíam formato alongado e afilado nas extremidades, membrana ondulante marcada e flagelo com cinetoplasto na extremidade oposta.

Também foram observadas inclusões compatíveis com as formadas pela riquetsia *Aegyptianella* spp. (Figura 4G) em 20% (8/40) das amostras, principalmente da área AI. Podiam ser visualizadas como estruturas fracamente basofílicas com aparência de mórula e tamanhos variáveis, localizando-se no interior dos eritrócitos, ou como bactérias livres de formato bacilar no citoplasma da destas mesmas células.

Em 15% (6/40) dos animais, principalmente de regiões MI, foram encontradas inclusões intraeritrocitárias arredondadas de diferentes tamanhos compatíveis com aquelas relacionadas aos corpúsculos do FEV (*Frog Erythrocytic Virus*) (Figura 4H). Em algumas situações, a estrutura compreendia tamanho superior ao núcleo eritrocitário, causando distorção celular e deslocamento nuclear.

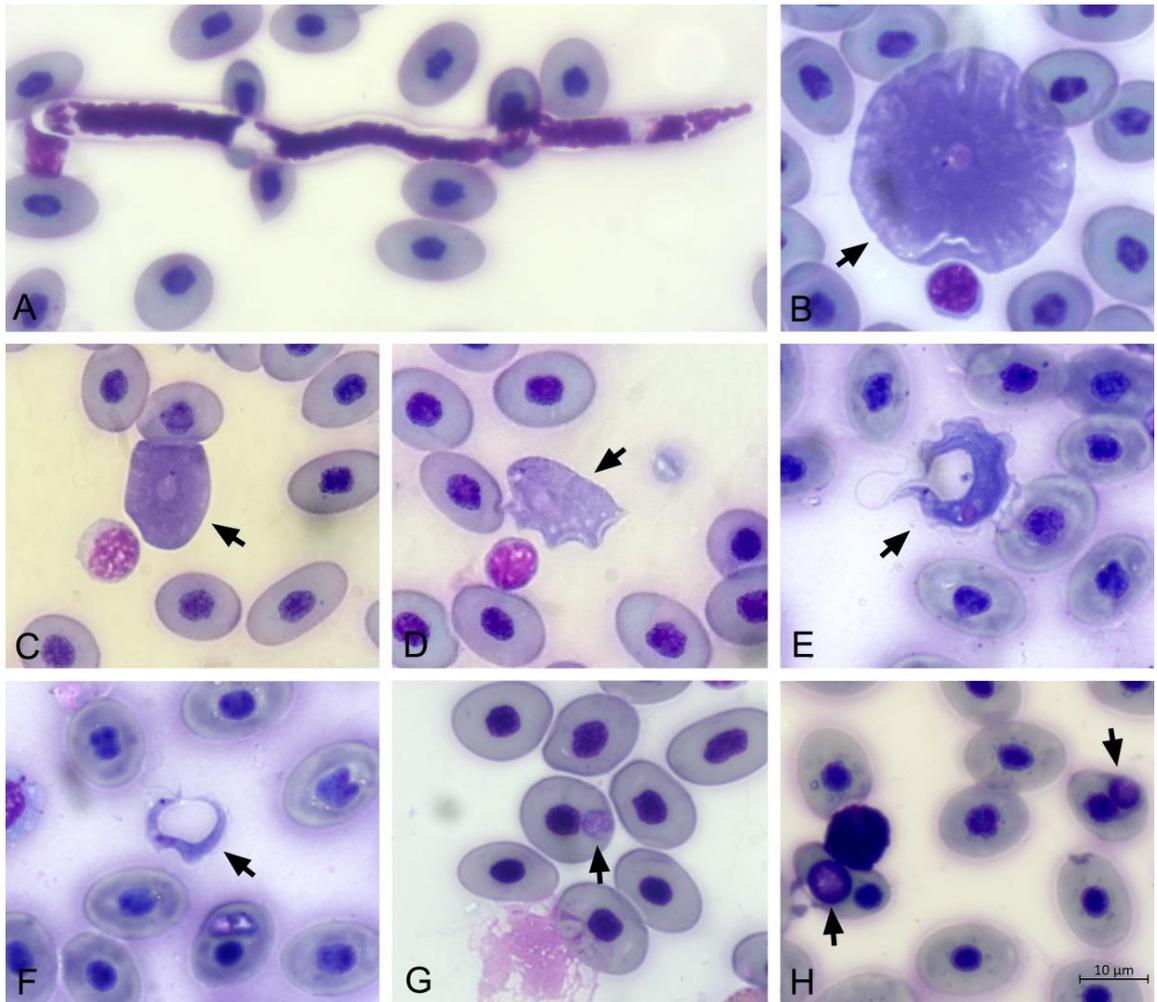


Figura 4. Hemoparasitos extracelulares e outras inclusões encontradas em esfregaço sanguíneo de *L. latrans*. A: microfilária; B: *Trypanosoma* spp. "A"; C: *Trypanosoma* spp. "B"; D: *Trypanosoma* spp. "C"; E: *Trypanosoma* spp. "D"; F: *Trypanosoma* spp. "E"; G: mórula de *Aegyptianella* spp.; H: corpúsculo de inclusão do FEV. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.

Parasitos intradérmicos foram observados em 72,5% (29/40) dos animais coletados, em vesículas avermelhadas normalmente localizadas na região ventral dos membros inferiores (Figura 5A), mas também eventualmente no tórax e membros superiores. Após visualização em lâmina, foram classificados como larvas de ácaros trombidiformes do gênero *Hannemania* (Figura 5B). Estavam presentes em todos os animais coletados nas áreas AI e MI, porém, ausentes naqueles das áreas PI.



Figura 5. Ácaros do gênero *Hannemania* em *L. latrans*. A: região interior dos membros inferiores, com acentuada presença de vesículas contendo o parasito. B: larva de *Hannemania* spp. em aumento de 100x.

A variável estação do ano não obteve diferença estatística ($p=0,933$) em relação à quantidade de ácaros por animal, entretanto, o estado de conservação do habitat se mostrou bastante influente ($p=0,0009$) ao não encontrarmos animais com estes parasitos nas áreas PI. Não houve diferença estatística ao avaliar o contraste entre áreas MI e AI ($p=0,641$).

DISCUSSÃO

A diferenciação entre os gêneros *Hepatozoon* e *Haemogregarina* é geralmente realizada através da observação do estágio esporogônico no vetor, entretanto, a maioria das descrições existentes foram baseadas somente na morfologia do parasito no sangue do hospedeiro, enquanto os ciclos biológicos ainda foram pouco elucidados (Leal et al. 2009). Por este motivo, não foi possível a diferenciação entre os morfotipos observados no presente estudo. A ocorrência destes protozoários foi bastante superior nas áreas estudadas em comparação com outros estudos realizados em *L. latrans* (Costa and Pereira 1971) e outros anuros do mesmo gênero (Leal et al. 2009). Em um levantamento realizado em anuros na África do Sul, hemogregarinas denominadas como *Hepatozoon* sp. foram os hemoparasitos mais frequentes, embora tenham sido presentes em somente 14% das amostras (Netherlands et al. 2015).

O morfotipo hemogregarina “C” encontrado neste trabalho foi bastante semelhante em tamanho, aspectos morfológicos e de coloração com aqueles relatados para *Hepatozoon leptodactyli*. Costa et al. (1973), observaram *H. leptodactyli* em *L.*

latrans e *Leptodactylus pentadactylus* e associaram como vetor sanguessugas da espécie *Haementeria lutzi*. Os autores também relataram a presença deste parasito em leucócitos quando em grandes infecções (Costa et al. 1973).

O gênero *Dactylosoma* possuiu uma ocorrência maior em *L. latrans* da região sul do Brasil do que o relatado nos indivíduos dessa espécie do sudeste do mesmo país (Costa and Pereira 1971), bem como em anfíbios da Colômbia (Carvajal and Rubio 1984) e África do Sul (Netherlands et al. 2015), sendo superado pelo observado em um estudo na ilha de Córsega, França, no qual detectaram até 53,5% de positividade para o gênero entre os anfíbios estudados (Barta et al. 1989).

O tamanho médio dos esporozoítos de *Lankesterella* encontrados nas amostras foram inferiores aos relatados para *Lankesterella* cf. *dicroglossi* e similares aos de *Lankesterella poeppigii* (Lainson and Paperna 1995; Paperna et al. 2009). Estruturas compatíveis com esse gênero já foram observadas em células sanguíneas de anfíbios em todos os continentes, inclusive no Brasil, bem como raros relatos em aves e lagartos (Lainson and Paperna 1995; Merino et al. 2006; Megía-Palma et al. 2016). Este parasito também foi descrito como sendo capaz de parasitar leucócitos (Paperna et al. 2009), com morfologia semelhante aos hemoparasitos não identificados observados em leucócitos de *L. latrans*. Além do mais, todos animais do presente estudo que possuíam estes hemoparasitos intraleucocitários também foram positivos para esporozoítos de *Lankesterella*. Os esporozoítos livres encontrados também são um achado comum deste gênero, que, segundo Paperna and Martin (2001), ocorrem devido a integridade eritrocitária ser afetada pela presença do parasito, com um consequente colapso celular durante a preparação do esfregaço sanguíneo.

A presença de microfilárias na circulação de anfíbios flutua bastante entre os locais estudados. Wahab et al. (2008) encontraram estes nematódeos no sangue de aproximadamente 41,6% dos anfíbios avaliados na Malásia, semelhante ao presente estudo, enquanto Netherlands et al. (2015), na África do Sul, visualizaram em somente 0,5% dos anfíbios. Em um estudo de McKenzie (2007), a microfilária de *Foleyellides striatus* foi mais detectada em *Rana vaillanti* coletados em regiões de pântano, as quais se mostram mais propensas para o desenvolvimento do vetor, assim como provavelmente é observado na área AI. Além disso, segundo o trabalho de Christin et al. (2003), pesticidas podem atuar no sistema imune de *Rana pipiens*, levando a um aumento na prevalência de nemátodos. Pode-se então supor que agentes imunossupressores contaminantes nas áreas mais afetadas auxiliem no aumento da

proporção de microfilárias no sangue *L. latrans*. Não foi possível identificar a espécie do agente enviado para sequenciamento, visto que o fragmento amplificado se demonstrou muito conservado, ao apresentar elevada similaridade com diferentes sequências em diferentes espécies, não sendo útil para filogenia. Deve-se então estudar um novo conjunto de primers, preferencialmente em um gene com menor conservação para que possa ser determinada a espécie. Quanto às amostras resultantes em falso-negativo nas técnicas de biologia molecular, acredita-se que a heparina possa gerar efeito inibitório na ação da DNA polimerase (Yokota et al. 1999), não causando a amplificação necessária para visualização durante a eletroforese.

Assim como no presente estudo, protozoários do gênero *Trypanosoma* costumam ser os mais frequentes em anfíbios de outras regiões do Brasil (Leal et al. 2009), Costa Rica (McKenzie and Starks 2008) e Colômbia (Carvajal and Rubio 1984). Cogita-se que o tamanho aumentado e melhor visibilidade em esfregaço sanguíneo tenham facilitado a observação nestes vertebrados ao longo das décadas, o que gera o questionamento se realmente é o hemoparasito mais comum em anfíbios, como apontam a maioria dos estudos (Dresser 2001; Žičkus 2002; Spodareva 2018). A classificação dentro do gênero em anfíbios é bastante controversa devido ao intenso pleomorfismo e escassez de estudos, possibilitando que o mesmo parasito tenha recebido diferentes nomenclaturas em diferentes espécies de hospedeiro e localização geográfica (Bardsley and Harmsen 1973; Reily and Woo 1982; Desser 2001; Leal et al. 2009). Sendo assim, não foi possível a identificação em nível de espécie dos tripanossomas neste estudo, apesar de alguns morfotipos encontrados serem bastante singulares. Além da apresentação alongada tradicional, outros formatos podem ser observados no sangue de anfíbios, como o de células arredondadas, ovais, com o formato de folha e irregulares, seja com ou sem flagelo livre (Bardsley and Harmsen 1973). Baseado nestes aspectos morfológicos acredita-se que *Trypanosoma* spp. “A” trata-se de *Trypanosoma chattoni*, tendo em vista que a espécie já foi detectada em anfíbios no Brasil (Lemos et al. 2008). Não foi possível estimar a taxa de infecção por tripomastigotas na corrente sanguínea dos espécimes avaliados, um dado que deve ser tratado com cautela, visto que a parasitemia pode variar ao longo do dia e de acordo com a sazonalidade (Werner and Walewski 1976). Este estudo possuiu a maior prevalência do gênero entre outros realizados em anuros (Carvajal and Rubio 1984; McKenzie and Starks 2008; Leal et al. 2009; Netherlands et al. 2015; Rajabi et al. 2017), com maior presença dos *Trypanosoma* spp. “A”, “C” e “E” em animais coletados

no grupo PI, sugerindo que estas áreas possuam uma maior disponibilidade do vetor no ambiente. Por outro lado, *Trypanosoma* spp. “D” foi encontrado em mais animais do grupo MI, o que leva a pensar que estas espécies possuam diferentes nichos. A baixa sensibilidade do teste de cultura para tripanossomatídeos evidencia sua baixa eficiência para as espécies que infectam anfíbios.

Estruturas compatíveis com bactérias e inclusões virais já foram observadas em outros anuros. A riquetsia *Aegyptianella* já foi descrita em ranídeos de outras regiões, como Canadá (Desser and Barta 1984), França (Desser and Barta 1989) e Costa Rica (Desser 2001), sendo este o primeiro relato para a família Leptodactylidae. A proporção de animais positivos neste estudo foi inferior à observada em *R. vaillanti* (McKenzie and Starks 2008) e *Limnonectes* (Chutmongkonkul et al. 2006). Inclusões virais já haviam sido observadas em *L. latrans* por Sousa e Weigel (1976, *apud* Matos et al. 1995) no estado do Rio de Janeiro. Estudos com ocorrência do corpúsculo do FEV são raros (Desser et al, 2001), mantendo uma menor ocorrência que a encontrada nas amostras de *L. latrans*.

Infestações elevadas por ácaros do gênero *Hannemania* podem estar associadas a ambiente úmidos e/ou com grande densidade de hospedeiros (Rankin 1937; Murphy 1965; Attademo et al. 2012). Ainda, estudos com outros parasitos sugerem que a exposição a pesticidas é capaz de atuar como agente estressante, podendo reduzir a capacidade do hospedeiro frente à infestações (Kiesecker, 2002). Estes parasitos foram significativamente mais presentes em áreas MI e AI, provavelmente associado a um maior acesso a água, elevada umidade e possíveis contaminantes nestas regiões. A mesma localização anatômica de ácaros do gênero já havia sido relatada por outros autores (Díaz-Paez et al. 2016). A presença destes parasitos em locais específicos do corpo de anfíbios vem sendo atribuído à facilidade do acesso das larvas, sem o contato frequente com o substrato do solo, bem como a maior presença de tecido conjuntivo (Hatano et al. 2007; Biolé et al. 2015).

No presente estudo observou-se uma ocorrência e riqueza de hemoparasitos bastante superior a outros realizados em anfíbios da África do Sul (Netherlands et al. 2015), Lituânia (Žičkus 2002), Costa Rica (Desser 2001), Malásia (Wahab et al. 2008), Nigéria (Aisien et al. 2014), Tailândia (Sailasuta et al. 2011), EUA (Stenberg and Bowerman 2008) e Brasil (Leal et al. 2009). Ao contrário do relatado por Netherlands et al. (2015), não foi observada maior riqueza de espécies de hemoparasitos em animais coletados de ambientes menos impactados, entretanto, as diferentes distribuições das

espécies nessas áreas também pode ser explicada pela disponibilidade do vetor no ambiente. Houve correlação positiva entre o CRC dos anfíbios e a riqueza de hemoparasitos na área AI, o que pode ser explicado pelo fato de que animais maiores possuem a tendência de estar a mais tempo em contato com vetores capazes de realizar a transmissão destes agentes (Barta and Desser 1984).

Parasitos são capazes de refletir as interações ambientais da sua espécie hospedeira, revelando comportamentos alimentares, área de distribuição e interações sociais (Dobson et al. 2008). Este estudo pode auxiliar a caracterização da fauna de parasitos sanguíneos e intradérmicos de *L. latrans* da mesorregião metropolitana de Porto Alegre, a qual obteve uma ocorrência e riqueza de espécies bastante elevada quando comparada com a literatura.

LITERATURA CITADA

Aisien MSO, Aigbirior PO, Ovwah E, Edo-Taiwo O. 2015. Blood parasites of some anurans from southern Nigeria. *Tropical Biomedicine*. 32(4):598-607.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-10.

Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Junges C, Bassó A, Cabagna-Zenklusen M. 2012. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia:Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 43(3):579-584.

Bardsley JE, Harmsen R. 1973. The trypanosomes of anura. In: Dawes B (Ed), *Advances in Parasitology*, London and New York. 1-73.

Barta JR, Desser SS. 1984. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*. 20(3):180-9.

Barta JR, Boulard Y, Desser SS. 1989. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*. 6-20.

Biolé FG, Valetti JA, Grenat PR, Salas NE, Martino AL. 2015. Parasitic infestation of intradermal chiggers *Hannemania achalai* (Acari: Leeuwenhoekiiidae) on the cryptic species *Pleurodema kriegi* and *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from Sierra Grande, Córdoba, Argentina. *The Herpetological Journal*. 25(3):163-167.

Cabagna-Zenklusen MC, Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Biancucci GF, Bassó A. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de

Rhinella fernandezae (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Revista de biología tropical*. 59(1):17-28.

Christin MS, Gendron AD, Brousseau P, Ménard L, Marcogliese DJ, Cyr D, Ruby S, Fournier M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22(5):1127-1133.

Costa SCG, Pereira NM. 1971. *Lankesterella alencari* n. sp., a toxoplasma-like organism in the central nervous system of Amphibia (Protozoa, Sporozoa). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 69(3):397-411.

Costa SCG, Pessoa SB, Pereira NDM, Colombo T. 1973. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal: the frog of the genus *Leptodactylus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 71(1-2):1-8.

D'Bastiani E, Michelle MS, Karla MC. 2018. First record of Filariid nematode in the Brazilian torrent frog *Hylodes heyeri* (Anura, Hylodidae). *Herpetology Notes*. 11:367-368.

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*. 5:735-748.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 9(2):141-150.

DePatta-Pillar V. 1997. Multivariate exploratory analysis and randomization testing with Multiv. *Coenoses*. 12(2/3), 145-148.

Desser SS, Barta JR. 1984. An intraerythrocytic virus and rickettsia of frogs from Algonquin Park, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*. 62(8):1521-1524.

Desser SS. 2001. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *Journal of Parasitology*. 87(1):152-60.

Díaz-Páez H, Cortez E, de la Fuente CS, Moreno-Salas L. 2016. Body distribution of *Hannemania* sp.(acari: leeuwenhoekiiidae) in *Rhinella spinulosa*, *Pleurodema bufonina*, and *Pleurodema thaul* from Chile. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 47(2):594-600.

Dobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W. 2008. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(1):11482-11489.

Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*. 4(1):9.

Hatano FH, Gettinger D, Van Sluys M, Rocha CFD. 2007. Parasitism of *Hylodes phyllodes* (Anura: Cycloramphidae) by *Hannemania* sp.(acari: trombiculidae) in an area of Atlantic Forest, Ilha Grande, southeastern Brazil. *Parasite*. 14(2):107-112.

Kiesecker JM. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(15):9900–9904.

Lainson R, Paperna I. 1995. Light and electron microscope study of a *Lankesterella petiti* n. sp.,(Apicomplexa: Lankesterellidae) infecting *Bufo marinus* (Amphibia: Anura) in Pará, North Brazil. *Parasite*. 2(3):307-313.

Leal DDM, O'Dwyer LH, Ribeiro VC, Reinaldo JS, Ferreira VL, Rodrigues RB. 2009. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the Sao Paulo and Mato Grosso do Sul States- Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 81(2):199-206.

Lemos M, Morais DH, Carvalho VT, D'agosto M. 2008. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology*. 94(1), 148-151.

Maneyro R, Naya DE, Rosa I, Canavero A, Camargo A. 2004. Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia, Série Zoologia*. 94(1):57–61.

Marcili A, da Costa AP, Soares HS, Acosta ICL, de Lima JTR, Minervino AHH, Melo ATL, Aguiar DM, Pacheco RC, Gennari SM. 2013. Isolation and Phylogenetic Relationships of Bat Trypanosomes from Different Biomes in Mato Grosso, Brazil. *Journal of Parasitology*. 99(6), 1071–1076.

Matos APA, Paperna I, Lainson R. 1995. An erythrocytic virus of the brazilian tree-frog, *Phrynohyas venulosa*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(5):653-655.

Megía-Palma R, Martínez J, Nasri I, Cuervo JJ, Martín J, Acevedo I, Belliure J, Ortega J, García-Roa R, Selmi S, Merino S. 2016. Phylogenetic relationships of *Isospora*, *Lankesterella*, and *Caryospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting lizards. *Organisms Diversity & Evolution*. 16(1):275-288.

Merino S, Martínez J, Martínez-De la Puente J, Criado-Fornelio Á, Tomás G, Morales J, Lobato E, García-Fraile S. 2006. Molecular characterization of the 18S rDNA of an avian *Hepatozoon* reveals that is closely related to *Lankesterella*. *Journal of Parasitology*. 92:1330–5.

McKenzie VJ. 2007. Human land use and patterns of parasitism in tropical amphibian hosts. *Biological Conservation*. 137(1):102–116.

Murphy TD. 1965. High incidence of two parasitic infestations and two morphological abnormalities in a population of the frog *Rana palustris* Le Conte. *American Midland Naturalist*. 74:233-239.

- Netherlands EC, Cook CA, Kruger DJ, du Preez LH, Smit NJ. 2015. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(1):135-41.
- Paperna I, Martin C. 2001. The development and fine structure of *Lankesterella cf. dicroglossi* (Apicomplexa: Lankesterellidae) infecting frogs in Niger, West Africa. *Folia parasitológica*. 48(3):178-186, 2001.
- Paperna I, Bastien P, Chavatte JM, Landau I. 2009. *Lankesterella poeppigii* n. sp. (Apicomplexa, Lankesterellidae) de *Bufo poeppigii* (Tschudi, 1845) del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 16(2):165-168.
- Rajabi F, Javanbakht H, Sajjadi SS. 2017. A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(4):1314-1317.
- Rankin JS. 1937. An ecological study of some North Carolina salamanders. *Ecological Monographs*. 7:169-269.
- Reilly BO, Woo PTK. 1982. The in vivo and in vitro development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology*. 60:124-133.
- Sailasuta A, Satetasit J, Chutmongkonkul M. 2011. Pathological study of blood parasites in rice field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Veterinary medicine international*. 2011.
- Silvano DL, Segalla MV. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade*. 1:79-86.
- Solé M, Dias IR, Rodrigues EAS, Marciano-Junior E, Branco SMJ, Cavalcante KP, Rödder D. 2009. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes*. 2:9-15.
- Spodareva VV, Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Votýpka J, Lukeš J, Yurchenko V, Kostygov AY. 2018. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. *Parasites & Vectors*. 11(1):447.
- Stenberg PL, Bowerman WJ. 2008. Hemoparasites in Oregon spotted frogs (*Rana pretiosa*) from central Oregon, USA. *Journal of wildlife diseases*. 44(2):464-468.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306(5702):1783-6.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22(22), 4673-4680.

Viana LA, Soares P, Silva JE, Paiva F, Coutinho ME. 2012. Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. *Parasitology Research*. 110(2):883-6.

Werner JK, Walewski K. 1976. Amphibian *Trypanosomes* from the McCormick Forest, Michigan. *The Journal of Parasitology*. 62(1):20.

Wahab AR, Andy Tan WA, Intan S. 2008. On the parasitic fauna of two species of anurans collected from Sungai Pinang, Penang Island, Malaysia. *Tropical Biomedicine*. 25(2):160-5.

Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. 1999. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *Journal of clinical laboratory analysis*. 13(3):133-140.

Žičkus T. 2002. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*. 12(2):197-202.

3.2 Artigo 2

Avaliação hematológica de *Leptodactylus latrans* de vida livre com diferentes taxas de infecção por parasitos sanguíneos e intradérmicos

Hematological evaluation of free-living Leptodactylus latrans with different rates of infection by chigger mites and blood parasites

Lina Crespo Bilhalva^{1, 4}, Bruno Albuquerque de Almeida², Patrick Colombo³, Stella de Faria Valle², João Fabio Soares¹.

¹Laboratório de Protozoologia, Departamento de Patologia Clínica Veterinária (Protozoovet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bento Gonçalves Ave 9090, Porto Alegre, 90540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Patologia Clínica Veterinária (LACVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bento Gonçalves Ave 9090, Porto Alegre, 90540-000, Rio Grande do Sul, Brazil

³Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB-RS). Salvador França St 1427, Porto Alegre, 90690-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Autor correspondente (email: li.na@msn.com).

RESUMO

Parâmetros hematológicos de anfíbios aparentam estar ligados diretamente às condições ambientais, tornando-os capazes de atuar como bioindicadores. Entretanto, estudos a respeito da hematologia desses animais são escassos. Na família Leptodactylidae, os únicos registros tratam somente do diferencial leucocitário e morfologia celular. No presente estudo, foi realizada avaliação hematológica e morfometria das células sanguíneas de 29 espécimes de *Leptodactylus latrans* coletados na mesorregião metropolitana de Porto Alegre, no sul do Brasil, parasitados por ácaros trombidiformes, hemoparasitos extracelulares e intracelulares. Foi observado que, em

geral, as células sanguíneas desses animais são menores que as de outros anfíbios anuros. Além disso, índices como leucócitos totais, neutrófilos e monócitos foram superiores em animais parasitados por ácaros trombidiformes, indicando uma reação do hospedeiro frente à infestação. Não houve correlação entre a quantidade de eritrócitos parasitados com os índices hematológicos. Espera-se que estes dados auxiliem em uma maior compreensão sobre a biologia da espécie, bem como diagnóstico e tratamento de doenças.

Palavras-chave: anfíbios, hematologia, hemoparasitos, protozoários

INTRODUÇÃO

Anfíbios compreendem grande parte, por vezes a maior, da biomassa entre os vertebrados, sendo capazes de habitar diversos ambientes, como os aquáticos, terrícolas e fossoriais, possuindo características anatômicas e fisiológicas específicas (Burton and Likens 1975; Daszak et al. 1999; Allender and Fry 2008). Estes animais são descritos como bioindicadores e seus parâmetros hematológicos parecem estar conectados diretamente às condições ambientais (Welsh and Ollivier 1998; Barni et al. 2007; Zhelev et al. 2015). Também são dotados de uma alta plasticidade do tecido sanguíneo, logo, muitos fatores intrínsecos e extrínsecos são capazes de influenciar seus parâmetros hematológicos, como a sazonalidade (Harris 1972; Campbell 2004), tamanho corporal (Davis and Maerz 2008) e estágio biológico (Das and Mahapatra 2012).

Por outro lado, também deve ser levada em consideração uma potencial elevação na popularidade desses animais em cativeiro, como animais de estimação ou provindo de resgate de fauna, o que pode criar uma demanda por médicos veterinários familiarizados com eles e suas doenças (Wright 1995). Embora poucas espécies de anfíbios possuam parâmetros hematológicos descritos, a avaliação hematológica destes animais pode ser valiosa para o diagnóstico e prognóstico, devendo ser aplicada na rotina clínica (Wright 2001; Allender and Fry 2008).

O sangue de anfíbios possui características similares em diversos aspectos ao de répteis e aves, como a presença de eritrócitos nucleados e trombócitos (Allender and Fry 2008). Muitos princípios aplicados a outros vertebrados são relevantes durante a interpretação dos exames de anfíbios, principalmente aqueles utilizados durante a interpretação do hemograma de répteis (Allender and Fry 2008; Campbell 2015). A falta de parâmetros hematológicos para a maioria das espécies torna a morfologia

celular o ponto mais importante do hemograma de um anfíbio (Wright 2001). Inclusões virais, parasitos e bactérias presentes no esfregaço sanguíneo podem sugerir enfermidades (Wright 2001). A taxa de eritrócitos com inclusões pode atuar como indicador do prognóstico clínico. Índices moderados a altos podem ser significantes, especialmente quando associados a porcentagens inferiores de hematócrito e menor quantidade de eritrócitos, bem como policromasia, microcitose e hipohemoglobinemia (Wright 1995).

Estudos a respeito da hematologia de anfíbios neotropicais são bastante escassos no Brasil (Fenerick-Junior et al. 2006; Rodrigues et al. 2017; Fanali et al. 2018) e na América Latina (Cabagna et al. 2005; Cabagna-Zenklusen et al. 2011; Attademo et al. 2011; Lajmanovich et al. 2012), sendo mais raros ainda na família Leptodactylidae, restringindo-se ao diferencial leucocitário e morfologia celular (Attademo et al. 2011; Fanali et al. 2018). *Leptodactylus* é um gênero comum na fauna neotropical (Costa et al. 1973), sendo uma de suas espécies a rã-crioula, *Leptodactylus latrans*, considerada a maior rã do Rio Grande do Sul, distribuída ao leste dos Andes, na América do Sul (Borges-Martins et al. 2007; Frost 2019). Até a presente data não existiam dados a respeito da hematologia dessa espécie ou parâmetros hematológicos de sua família.

O objetivo do trabalho foi a avaliação hematológica de *L. latrans* sob presença e ausência de parasitos sanguíneos e ácaros trombidiformes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

Os animais foram capturados à noite por busca ativa em cinco localidades dentro da mesorregião metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil durante os meses de verão do ano de 2018 (Tabela 1). As áreas variavam entre ambientes menos impactados, no bioma Mata Atlântica, bem como campos de produção agropecuária e áreas urbanas. Os procedimentos realizados nos animais foram executados diretamente a campo, com a posterior soltura dos indivíduos no local de origem. Todos os procedimentos foram realizados conforme aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) registrado sob número 33987 e autorizados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob número 60906-1 no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

Tabela 1. Áreas de coleta de acordo com o número de indivíduos, situadas na mesorregião metropolitana de Porto Alegre.

Município	Coordenada	Número de indivíduos
Itati	29°30'45.7"S 50°06'36.2"O	9
Três Forquilhas	29°31'00.7"S 50°05'12.4"O	2
Viamão	30°4'9.04"S 50°52'41.2"O	8
Porto Alegre	30°13'32.5"S 51°03'05.6"O	3
Santo Antônio da Patrulha	29°50'46.9"S 50°30'47.5"O	7

Coleta das amostras

Amostras de sangue *L. latrans* foram coletadas pela veia femoral e armazenadas em microtubos contendo heparina lítica (Microtainer, BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). Nenhuma venipunção ultrapassou o limite seguro de coleta de 1% da massa corporal (Wright, 2001). A quantidade de parasitos presentes na derme do animal foi contada e, quando presentes, foram removidos e armazenados em álcool 70°GL para posterior identificação. As amostras foram enviadas para avaliação hematológica sob refrigeração e armazenadas por até 12 horas.

Análises hematológicas

As amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet) da UFRGS, onde foi realizada quantificação total de eritrócitos e leucócitos por contagem manual em hemocitômetro com a diluição do sangue total em Solução de Natt-Herrick (Natt and Herrick 1952). O hematócrito foi determinado por microhematócrito através da centrifugação por 5 minutos a 11.500 g (Heraeus Pico 17, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), no qual também pode ser obtido o plasma para a estimativa de proteínas plasmáticas totais (PPT) por refratometria. A hemoglobina foi determinada por medidas de absorvância em hemoglobinômetro (HemoCue Hb 301, Ängelholm, Skåne, Suécia). O volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados (Nardini et al. 2013).

As lâminas de esfregaço sanguíneo foram confeccionadas a partir da distensão de uma gota de sangue total heparinizado sobre lâmina de vidro. Após a secagem, as lâminas foram fixadas e coradas, primeiramente com uma conjugação dos corantes Wright e Giemsa (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA) e posteriormente com Panótico Rápido® (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil). A análise microscópica das lâminas foi realizada sempre pelo mesmo operador em aumentos de 100x, 400x e 1000x em microscópio óptico. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre 100 células, classificando-as como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (Heatley and Johnson 2009). A taxa de eritrócitos com inclusões parasitárias (TEIP) foi determinada através da porcentagem do número de eritrócitos com inclusões por protozoários contados entre 1000 eritrócitos totais (adaptado de Maia et al. 2014). Alterações morfológicas, como a presença de hemoparasitos, inclusões virais e reatividade celular também foram catalogadas, quando presentes.

Análises estatísticas

Através dos resultados hematológicos obtidos, os indivíduos foram compilados conforme a presença ou ausência de três grupos de parasitos observados: ácaros trombidiformes, hemoparasitos extracelulares e hemoparasitos intracelulares. Microfilárias e protozoários do gênero *Trypanosoma* foram classificados como parasitos extracelulares, e hemogregarinas e *Lankesterella* spp. como parasitos intracelulares. Os dados foram apresentados através de média, desvio padrão e intervalo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics 22.0. A normalidade dos dados foi testada através do Teste Shapiro Wilk, onde os dados paramétricos foram avaliados pelo Teste T de amostras independentes, com auxílio do Teste de Levene, e os dados não paramétricos foram avaliados através do Teste U de Mann-Whitney. Também foram analisadas correlações entre quantidade de ácaros por parâmetros hematológicos e TEIP por parâmetros hematológicos através do Teste de Correlação de Pearson. O nível de significância utilizado como valor critério para a rejeição da hipótese nula foi 5% ($p \leq 0,05$).

Imagens e mensurações

As imagens captadas em escala assinalada foram obtidas em microscópio óptico AxioScope A1 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) contendo uma câmera AxioCam 105 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) acoplada e

destinadas ao software Zen 2.3 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha). Neste programa foi possível realizar a mensuração de 20 células de cada tipo em aumento de 1000x, escolhidas aleatoriamente (adaptado de Cabagna-Zenklusen et al. 2011).

RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 29 indivíduos de *L. latrans*. Os eritrócitos possuíam formato elíptico, citoplasma de coloração azul pálida e núcleo com o mesmo formato, frequentemente irregular e com cromatina densa. Foi possível a observação de eritrócitos policromatófilos, células menores, mais arredondadas e com citoplasma mais basofílico (Figura 1A). Por vezes essas células foram visualizadas com núcleos picnóticos ou em mitose.

Os trombócitos (Figura 1B) foram classificados como pequenas células de formatos arredondados, elípticos ou irregulares, com cromatina nuclear bastante densa e citoplasma basofílico pouco delimitado. Estas células facilmente eram observadas em agregados (Figura 1C), nos quais costumavam se apresentar com numerosos vacúolos. Devido à presença destes agregados não foi possível realizar a contagem precisa destas células.

Linfócitos (Figura 1D) se apresentavam como grandes ou pequenos, de formato esférico, porém, ocasionalmente se moldavam às células vizinhas. Estes leucócitos possuíam núcleo arredondado e citoplasma basofílico, frequentemente apresentando projeções, além de elevada proporção núcleo:citoplasma. Pequenos linfócitos possuíam aparência bastante semelhante a trombócitos, sendo diferenciados principalmente pela cromatina nuclear menos densa e citoplasma com margens mais definidas.

Três tipos de granulócitos puderam ser observados. Neutrófilos (Figura 1E) eram células maiores, com citoplasma basofílico, o qual eventualmente era preenchido por finos grânulos pouco corados. O núcleo dessas células costumava ser uni ou bilobado, com cromatina densa e excêntrica. Eosinófilos (Figura 1F) possuíam tamanho semelhante, porém, dotados de grandes grânulos eosinofílicos, arredondados e bem delimitados, ocupando quase todo o citoplasma da célula, além de um núcleo unilobado excêntrico com cromatina densa. Basófilos (Figura 1G) foram os menores granulócitos encontrados, possuindo grande quantidade de grânulos arredondados fortemente basofílicos, os quais por muitas vezes ocultavam o núcleo celular.

Monócitos possuíam duas apresentações, uma com formato irregular e maior quantidade de citoplasma discretamente basofílico e outra mais arredondada com citoplasma mais escuro, sendo considerados monócitos azurófilos (Figura 1H). Ambos possuíam grande quantidade de vacúolos.

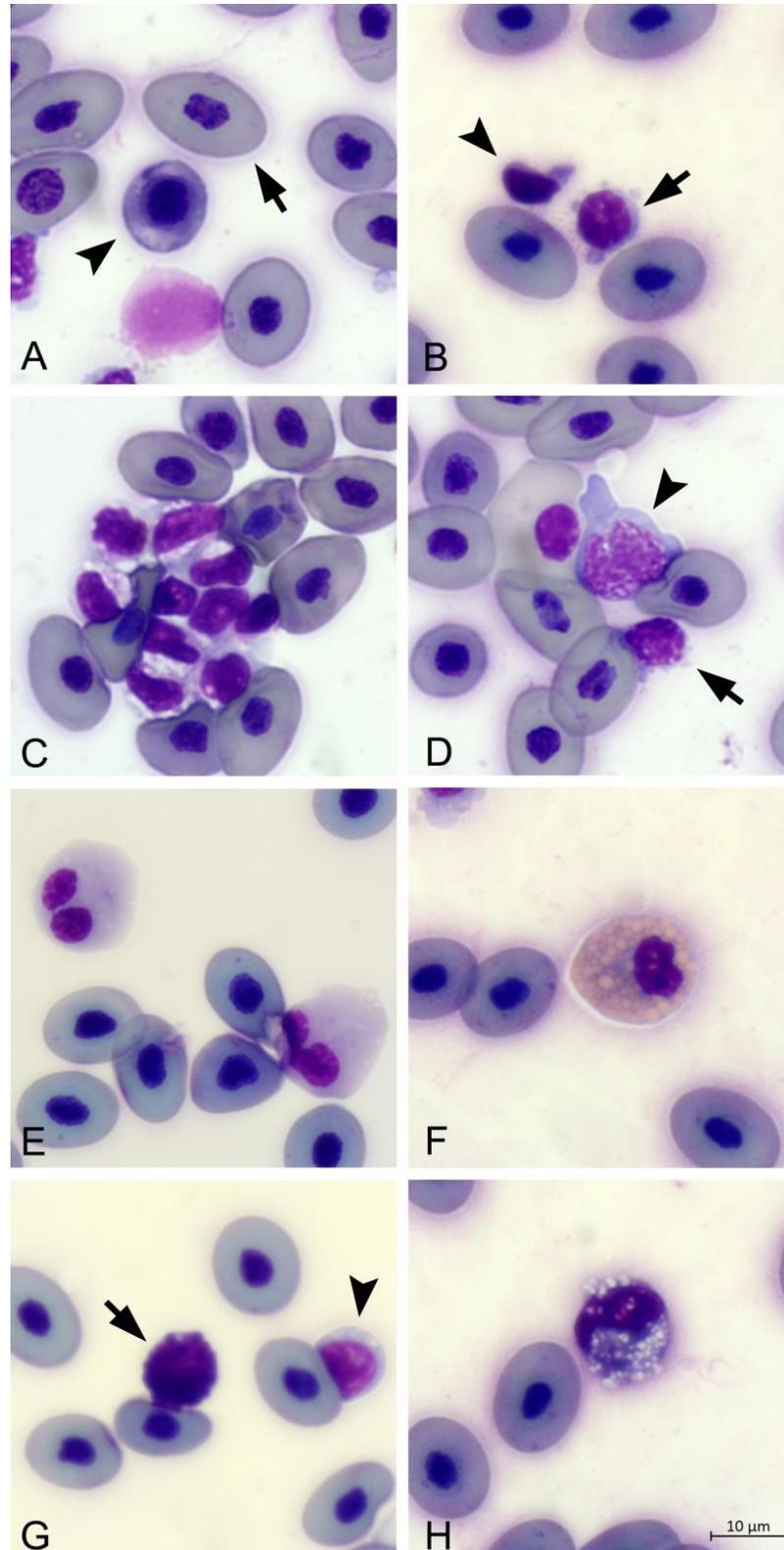


Figura 1. Células sanguíneas de *L. latrans*. A: eritrócito (seta) e policromatófilo (cabeça de seta); B: pequeno linfócito (seta) e trombócito (cabeça de seta); C: agregado trombocitário; D: pequeno linfócito (seta) e grande linfócito (cabeça de seta); E: neutrófilos bilobados; F: eosinófilo; G: basófilo (seta) e linfócito (cabeça de seta); H: monócito azurófilo. Imagens em escala de 10 µm. Corantes Wright-Giemsa e Panótico Rápido®. Aumento de 1000x.

As medidas de diâmetro celular maior (DCM), diâmetro celular menor (DCm), diâmetro nuclear maior (DNM) e diâmetro nuclear menor (DNm) foram agrupados para melhor visualização (Tabela 2). Após centrifugação da amostra para obtenção das PPT também pode ser observado o plasma, o qual possuía uma coloração discretamente amarelada.

Tabela 2. Dimensões de eritrócitos e leucócitos de *L. latrans* - média ± desvio-padrão (amplitude) -.

	DCM	DCm	DNM	DNm
Eritrócitos (µm)	15,5 ± 1,68 (12,36 - 17,92)	10,04 ± 0,96 (8,53 - 12,16)	5,56 ± 0,69 (4,53 - 6,88)	3,94 ± 0,39 (3,22 - 4,77)
Pequenos linfócitos (µm)	8,74 ± 0,94 (7,34 - 9,97)	7,45 ± 0,8 (6,23 - 8,47)	7,35 ± 0,98 (5,5 - 9,38)	6,61 ± 0,88 (4,95 - 8,44)
Grandes linfócitos (µm)	12,64 ± 0,69 (12,15 - 13,13)	11,37 ± 0,62 (10,93 - 11,81)	9,63 ± 1,59 (8,5 - 10,76)	8,47 ± 1,4 (7,58 - 9,46)
Neutrófilos (µm)	14,93 ± 0,94 (13,85 - 15,48)	12,98 ± 0,81 (12,04 - 13,46)	-	-
Eosinófilos (µm)	14,58 ± 0,47 (14,08 - 15,17)	13,27 ± 0,42 (12,81 - 13,8)	8,03 ± 0,14 (7,89 - 8,17)	7,26 ± 0,25 (7,01 - 7,51)
Basófilos (µm)	10,98 ± 0,7 (10,74 - 11,65)	10,42 ± 0,66 (9,59 - 11,06)	-	-
Monócitos (µm)	13,29 ± 0,45 (12,98 - 13,61)	11,69 ± 0,39 (11,42 - 11,97)	6,96 ± 0,22 (6,8 - 7,12)	6,19 ± 0,2 (6,05 - 6,33)

DCM: diâmetro celular maior; DCm: diâmetro celular menor; DNM: diâmetro nuclear maior; DNm: e diâmetro nuclear menor.

Os únicos parasitos intradérmicos observados neste estudo foram larvas de ácaros trombidiformes do gênero *Hannemania*, as quais se localizavam dentro de vesículas avermelhadas na derme de 62% (18/29) dos anfíbios. Sua distribuição no corpo do animal costumava ser restrita aos membros posteriores, entretanto, algumas vezes puderam ser observados na região do torso e membros anteriores. A quantidade de ácaros variou entre 0 e 166 nos animais avaliados, mantendo uma média de 39,83 por animal.

Hemoparasitos foram encontrados em amostras da maioria dos animais coletados. A TEIP dos animais avaliados variou entre 0 e 3,9% (média de 0,67% com desvio padrão de 0,97%). Também foram observadas amostras com estruturas compatíveis com a bactéria *Aegyptianella* spp. e corpúsculos de inclusão viral característicos do *Frog Eritrocytic Virus* (FEV).

Com relação aos três grupos estudados (Tabela 3), nos animais com a presença de ácaros, foram observados maiores valores de CHCM ($p=0,027$), leucócitos totais ($p=0,009$), monócitos absolutos ($p=0,014$) e neutrófilos absolutos ($p=0,037$). No grupo de parasitos extracelulares, não foi verificada significância estatística entre os grupos. Na presença de parasitos intracelulares, o VCM se apresentou menor ($p=0,013$). Após correlação entre os parâmetros e as quantidades de ácaros e taxa de eritrócitos infectados, somente houve significância em relação ao aumento na quantidade de monócitos em detrimento do aumento da quantidade absoluta de ácaros ($p=0,027$).

Tabela 3. Valores obtidos no hemograma de *L. latrans* - média \pm desvio-padrão (amplitude) - no grupo geral, na presença e ausência de ácaros, hemoparasitos extracelulares e hemoparasitos intracelulares.

Parâmetro	Geral (n=29)	Ácaros		Hemoparasitos extracelulares		Hemoparasitos intracelulares	
		Presentes (n=18)	Ausentes (n=11)	Presentes (n=26)	Ausentes (n=3)	Presentes (n=22)	Ausentes (n=7)
Eritrócitos ($\times 10^6$ /mm ³)	0,83 \pm 0,24 (0,39 – 1,42)	0,77 \pm 0,24 (0,39 – 1,16)	0,92 \pm 0,22 (0,64 – 1,42)	0,85 \pm 0,24 (0,39 – 1,42)	0,64 \pm 0,16 (0,45 – 0,74)	0,83 \pm 0,25 (0,39 – 1,42)	0,79 \pm 0,21 (0,45 – 1,15)
Hemoglobina (g/dL)	6,00 \pm 1,80 (2,1 – 8,8)	5,86 \pm 2,09 (2,1 – 8,8)	6,22 \pm 1,24 (4,7 – 8,4)	6,03 \pm 1,83 (2,1 – 8,8)	5,7 \pm 1,76 (3,7 – 7)	5,84 \pm 1,85 (2,1 – 8,8)	6,47 \pm 1,64 (3,7 – 8)
Hematócrito (%)	23,45 \pm 6,35 (11 – 35)	22,11 \pm 6,87 (11 – 35)	25,64 \pm 4,92 (19 – 34)	23,69 \pm 6,32 (11 – 35)	21,33 \pm 7,64 (13 – 28)	22,86 \pm 6,31 (11 – 35)	25,29 \pm 6,6 (13 – 33)
VCM (fL)	288,02 \pm 43,43 (214,63 – 376,85)	290,43 \pm 44,79 (214,63 – 355,32)	284,08 \pm 42,94 (241,09 – 376,85)	283,3 \pm 41,55 (214,63 – 353,35)	329,01 \pm 44,97 (287,61 – 376,85)	277,1 \pm 40,96 (214,63 – 355,32)*	322,36 \pm 33,44 (287,61 – 376,85)*
CHCM (%)	25,35 \pm 2,58 (19,09 – 30,8)	26,03 \pm 3,06 (19,09 – 30,8)*	24,23 \pm 0,66 (23,04 – 25)*	25,14 \pm 2,6 (19,09 – 30,8)	27,10 \pm 1,84 (25 – 28,46)	25,21 \pm 2,77 (19,09 – 30,8)	25,76 \pm 1,96 (23,33 – 28,46)
Leucócitos totais (μ L)	16591,72 \pm 5518,65 (9830 – 31890)	18507,78 \pm 5753,29 (9950 – 31890)*	13456,36 \pm 3403,37 (9830 – 21190)*	16078,08 \pm 4896,85 (9830 – 27660)	21043,33 \pm 9668,6 (13330 – 31890)	17235,45 \pm 6076,66 (9830 – 31890)	14568,57 \pm 2567,21 (10940 – 17910)
Neutrófilos <i>relativo</i> (%)	7,62 \pm 4,36 (0 – 16)	8,44 \pm 4,58 (3 – 16)	6,27 \pm 3,80 (0 – 11)	7,88 \pm 4,39 (0 – 16)	5,33 \pm 4,04 (1 – 9)	7,32 \pm 4,57 (0 – 16)	8,57 \pm 3,78 (1 – 11)
Neutrófilos <i>absoluto</i> (μ L)	1238,75 \pm 792,48 (0 – 3401,6)	1475,11 \pm 811,45 (503,4 – 3401,6)*	851,99 \pm 611,55 (0 – 1907,1)*	1224,84 \pm 739,44 (0 – 3401,6)	1359,33 \pm 1390,44 (133,3 – 2870,1)	1237,44 \pm 864,74 (0 – 3401,6)	1242,89 \pm 559,95 (133,3 – 1751,2)
Eosinófilos <i>relativo</i> (%)	4,76 \pm 5,40 (0 – 26)	5,11 \pm 6,34 (0 – 26)	4,18 \pm 3,57 (2 – 14)	4,92 \pm 5,69 (0 – 26)	3,33 \pm 0,58 (3 – 4)	5,23 \pm 6,12 (0 – 26)	3,29 \pm 1,38 (2 – 6)
Eosinófilos <i>absoluto</i> (μ L)	857,84 \pm 1363,02 (0 – 7191,6)	993,79 \pm 1623,75 (0 – 7191,6)	635,39 \pm 795,02 (196,6 – 2966,6)	878,86 \pm 1439,3 (0 – 7191,6)	675,73 \pm 243,33 (533,2 – 956,7)	977,97 \pm 1549,44 (0 – 7191,6)	480,31 \pm 219,11 (240,8 – 898,2)
Linfócitos <i>relativo</i> (%)	80,24 \pm 9,52 (49 – 92)	77,67 \pm 10,15 (49 – 92)	84,45 \pm 6,88 (67 – 92)	79,92 \pm 9,81 (49 – 92)	83 \pm 7,21 (75 – 89)	79,68 \pm 10,69 (49 – 92)	82 \pm 4,24 (77 – 89)
Linfócitos <i>absoluto</i> (μ L)	13190,59 \pm 4286,60 (7423,5 – 23917,5)	14402,73 \pm 4852,85 (7423,5 – 23917,5)	11207,09 \pm 2107,62 (9043,6 – 14197,3)	12750,87 \pm 3942,13 (7423,5 – 21740,8)	17001,57 \pm 6220,5 (11836,7 – 23917,5)	13549,39 \pm 4752 (7423,5 – 23917,5)	11921,53 \pm 2058,49 (9189,6 – 15223,5)
Monócitos <i>relativo</i> (%)	4,28 \pm 2,97 (0 – 10)	5,11 \pm 3,14 (1 – 10)	2,91 \pm 2,17 (0 – 7)	3,96 \pm 2,89 (0 – 10)	7 \pm 2,65 (5 – 10)	4,59 \pm 3,19 (0 – 10)	3,29 \pm 2,06 (1 – 6)
Monócitos <i>absoluto</i> (μ L)	771,85 \pm 696,17 (0 – 3189)	996,22 \pm 773,6 (99,5 – 3189)*	404,71 \pm 317,46 (0 – 1039,5)*	673,05 \pm 546,19 (0 – 1968)	1628,1 \pm 1352,63 (799,8 – 3189)	861,64 \pm 760,17 (0 – 3189)	489,67 \pm 341,75 (149,7 – 895,5)
Basófilos <i>relativo</i> (%)	2,76 \pm 3,29 (0 – 16)	3,11 \pm 3,64 (0 – 16)	2,18 \pm 2,68 (0 – 8)	2,92 \pm 3,42 (0 – 16)	1,33 \pm 1,53 (0 – 3)	2,73 \pm 3,56 (0 – 16)	2,86 \pm 2,48 (0 – 6)
Basófilos <i>absoluto</i> (μ L)	478,96 \pm 569 (0 – 2424)	553,38 \pm 595,23 (0 – 2424)	357,18 \pm 527,19 (0 – 1695,2)	490,54 \pm 583,58 (0 – 2424)	378,6 \pm 508,6 (0 – 956,7)	493,21 \pm 623,9 (0 – 2424)	434,17 \pm 381,33 (0 – 955,2)
PPT (g/dL)	2,57 \pm 1,28 (0,4 – 6,6)	2,4 \pm 1,15 (0,4 – 5)	2,85 \pm 1,48 (1,2 – 6,6)	2,59 \pm 1,35 (0,4 – 6,6)	2,4 \pm 0,6 (1,8 – 3)	2,38 \pm 1,07 (0,4 – 5)	3,17 \pm 1,76 (1,4 – 6,6)

*presença de significância estatística entre os grupos

DISCUSSÃO

Eritrócitos de *L. latrans* possuíam dimensões menores que de outras espécies de anuros (Mitsuruku 1981; Atatür et al. 1999; Arikan et al. 2010; Cabagna-Zenklusen et al. 2011; Das and Mahapatra 2012; Wei et al. 2015; Meesawat et al. 2016). Esse tamanho reduzido também foi expresso nos valores de VCM, os quais foram inferiores quando comparados com espécies como *Hyla arborea*, *Pelobates syriacus*, *Pseudepidalea viridis*, *Rana dalmatina* (Gül et al. 2011), *Rhinella fernandezae* (Cabagna-Zenklusen et al. 2011) e *Pelophylax ridibundus* (Zhelev et al. 2015). A variação no tamanho dos eritrócitos entre anfíbios parece estar associada com sua atividade metabólica (Atatür et al. 1999; Arikan et al. 2010), o que sugere que a taxa metabólica de *L. latrans* seja mais elevada, com um maior consumo de oxigênio.

A contagem total de eritrócitos em *L. latrans* foi superior quando comparada com os anuros *Bambina bambina* (Arikan et al. 2010), *Hoplobatrachus rugulosus* (Meesawat et al. 2016), *R. fernandezae* (Cabagna-Zenklusen et al. 2011), *P. ridibundus* (Zhelev et al. 2015) e *H. arborea* (Gül et al. 2011) e inferior a *Xenopus laevis* (Chang et al. 2015), se aproximando da contagem de *P. viridis*, *P. syriacus* e *R. dalmatina* (Zhelev et al. 2015). Os valores de hemoglobina e hematócrito obtidos foram inferiores a diversas espécies da mesma ordem (Cabagna-Zenklusen et al. 2011; Chang et al. 2015; Zhelev et al. 2015; Meesawat et al. 2016). CHCM foi similar ao de *X. laevis* e diversas outras espécies de anfíbios (Chang et al. 2010; Zhelev et al. 2015), indicando que esse valor pode ser recorrente na classe. A presença de núcleos picnóticos nos eritrócitos já foi previamente descrita como uma alteração observada em eritrócitos presentes há mais tempo na circulação (Campbell 2015). Em contrapartida, em células mais imaturas, destaca-se a presença de núcleos com cromatina mais frouxa, ocasionalmente sendo classificadas como policromatófilos. A coloração azulada de eritrócitos pode ocorrer em decorrência da utilização de heparina como anticoagulante (Campbell 2004; Campbell 2015).

Trombócitos de anfíbios já foram descritos como células morfológicamente similares aos linfócitos na microscopia óptica (Wright 2001; Cabagna-Zenklusen et al. 2011). Embora alguns estudos tenham obtido sucesso na determinação de valores para trombócitos, é comum a ausência deste parâmetro devido à presença de agregados (Arikan et al. 2010; Cabagna-Zenklusen et al. 2011).

De maneira geral, leucócitos de *L. latrans* se apresentaram menores que outros anuros que já foram hematologicamente estudados, como *B. bombina* (Arikan et al. 2010) e *R. fernandezae* (Cabagna-Zenklusen et al. 2011). Por outro lado, a quantidade total dessas células foi bastante superior a várias espécies de anuros (Arikan et al. 2010; Cabagna-Zenklusen et al. 2011; Chang et al. 2015; Zhelev et al. 2015; Meesawat et al. 2016). Em um estudo de Wilson et al. (2011), *X. laevis* coletados de vida livre possuíram mais leucócitos do que animais criados em cativeiro, o que foi associado a um maior estresse nesses animais capturados a campo. Embora o autor não tenha realizado a contagem diferencial para determinar qual o leucócito prevalente (Wilson et al. 2011), o mecanismo relacionado ao aumento destas células pode ser similar ao observado no presente estudo.

Assim como em *L. latrans*, os linfócitos também compõem a maioria dos leucócitos em quase todas as espécies de anuros já estudados, variando entre 83% em *Pelophylax ridibundus* (Zhelev et al. 2015) e 41% em *R. fernandezae* (Cabagna-Zenklusen et al. 2011). Ainda, um estudo com *X. laevis* detectou função fagocítica em uma população de linfócitos no sangue destes animais, o que sugere que estas células possam mais função frente à presença de microorganismos (Li et al. 2006).

Em *L. latrans* os neutrófilos possuíram tamanho similar aos menores neutrófilos mensurados em *B. bombina*, mas morfológicamente diferentes, visto que outras espécies, incluindo *Rana catesbeiana*, possuem o núcleo celular bastante segmentado, semelhante ao de mamíferos (Fenerick-Junior 2006; Arikan et al. 2010). Eosinófilos aparentaram uma morfologia similar a de outros anfíbios, com diâmetro discretamente menor que os verificados em *B. bombina* e *R. fernandezae* (Arikan et al. 2010 Cabagna-Zenklusen et al. 2011). Em *L. latrans*, o diâmetro dos basófilos foi menor que o observado em *B. bombina* e semelhante ao de *R. fernandezae* (Arikan et al. 2010 Cabagna-Zenklusen et al. 2011).

Monócitos de *L. latrans* compõem uma das menores populações celulares, assim como o observado no sangue de várias espécies de anuros, como *R. fernandezae* (Cabagna-Zenklusen et al. 2011) e *B. bombina* (Wojtaszek and Adamowicz 2003). Uma exceção é *H. rugulosus*, que possui uma das maiores quantidades de monócitos entre os anfíbios, chegando a 36% da população de leucócitos (Meesawat et al. 2016)

A coloração amarelada do plasma de alguns anfíbios sadios já foi associada à elevação na concentração de carotenoides e bilirrubina, embora não tenha sido pesquisada na maioria das espécies (Heatley and Johnson 2009). O valor das PPT de *L.*

latrans foi bastante inferior quando comparado com outros anfíbios, como *P. viridis*, *P. syriacus*, *H. arborea*, *R. dalmatina* e *P. ridibundus* (Gül et al. 2011), e semelhante ao observado para *X. laevis* capturados de vida-livre (Wilson et al. 2011).

Os resultados obtidos também sugerem que uma maior quantidade de ácaros fixados em *L. latrans* pode ser correlacionada com a elevação na quantidade de monócitos circulantes, os quais possuem papel na atividade de remoção dos debris celulares resultantes da alimentação destes parasitos (Sladky et al. 2000; Das and Mahapatra 2012). Além disso, o aumento significativo na quantidade de neutrófilos verificado no grupo com parasitos intradérmicos sugere um aumento na demanda tecidual de neutrófilos, os quais podem estar relacionado à infecções bacterianas secundárias e a mobilização destas células (Wright 2001). Estes dados corroboram o observado por Sladky et al. (2000), que alertaram para a possibilidade destes ácaros provocarem inflamação local, úlceras, necrose e fibrose da derme e epiderme. A pouca quantidade de indivíduos pertencentes aos grupos pode ter enfraquecido a estatística, levando a diferenças no índice de CHCM que pode não ser biologicamente elucidada. A diminuição do VCM detectada no grupo com hemoparasitos intracelulares seria capaz de ser explicada como uma resposta regenerativa nestes animais, aumentando a quantidade circulante de policromatófilos, visto que a média geral de hematócrito e hemoglobina absoluta foi inferior na presença destes parasitos.

Células sanguíneas de anfíbios aparentam disponibilizar um ambiente adequado para o desenvolvimento de diversas estruturas eucarióticas e procarióticas (Costa et al. 1973; Desser and Barta 1984). Embora seja descrito que a porcentagem relativa de eritrócitos infectados sirva como indicador do prognóstico clínico (Wright 1995), no presente estudo não foram observadas correlações entre a TEIP e os demais parâmetros hematológicos avaliados. Estes dados somados à falta de significância estatística entre os grupos sugere pouca patogenicidade destes hemoparasitos intracelulares na espécie estudada.

De forma geral, este estudo demonstra que pode ser observado no sangue de *L. latrans* há uma reação na presença de determinados parasitos. Acredita-se que estudos de toxicidade e monitoramento suficientemente padronizados e direcionados possam utilizar como ferramenta parâmetros hemológicos de anfíbios, ao avaliarem a saúde do animal em determinado ambiente (Fenerick-Junior et al. 2006). Neste contexto, podemos concluir que a hematologia de anfíbios ainda é uma ciência pouco estudada e

uma ferramenta pouco utilizada na avaliação da sanidade destes animais, seja para o diagnóstico ou tratamento de doenças, assim como monitoramento ambiental.

LITERATURA CITADA

Allender MC, Fry MM. 2008. Amphibian hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 11(3):463-80.

Arikan H, Alpagut-Keskin N, Çevik İE, Erişmiş UC. 2010. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L.(Anura: Bombinatoridae). *Animal Biology*. 60(1): 61-68.

Atatür MK, Arikan H, Çevik IE. 1999. Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. 23(2), 111-114.

Attademo AM, Cabagna-Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C, Bassó A. 2011. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology*. 20(1), 274-282.

Barni S, Boncompagni E, Grosso A, Bertone V, Freitas I, Fasola M, Fenoglio C. 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*. 81(1):45-54.

Borges-Martins M, Colombo P, Zank C, Becker FG, Melo MTQ. 2007. Anfíbios In: Becker FG, Ramos RA, Moura LA (orgs.) *Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 276-291.

Burton TM, Likens GE. 1975. Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Copeia*. 3:541-546.

Cabagna MC, Lajmanovich RC, Stringhini G, Sanchez-Hernandez JC, Peltzer PM. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2(4):373.

Cabagna-Zenklusen MC, Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Biancucci GF, Bassó A. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Revista de biología tropical*. 59(1):17-28.

Campbell TW. 2004. Hematology of lower vertebrates. In: 55 th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39 th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). *International Veterinary Information Service*. 1104-1108.

Campbell TW. 2015. Peripheral Blood of Amphibians. In: Campbell TW, ed *Exotic Animal Hematology and Cytology*. Wiley-Blackwell, Malden.

- Chang AG, Hu J, Lake E, Bouley DM, Johns JL. 2015. Biochemical and hematologic reference intervals for aged *Xenopus laevis* in a research colony. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 54(5), 465-470.
- Costa SCGD, Pessoa SB, Pereira NDM, Colombo T. 1973. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal: the frog of the genus *Leptodactylus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 71(1-2):1-8.
- Das M, Mahapatra PK. 2012. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog, *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). *The Scientific World Journal*.
- Davis AK, Maerz JC. 2008. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*. 2008(3):613-617.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*. 5:735-748.
- Desser SS, Barta JR. 1984. An intraerythrocytic virus and rickettsia of frogs from Algonquin Park, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*. 62(8):1521-1524.
- Fanali LZ, Franco-Belussi L, Bonini-Domingos CR, De Oliveira C. 2018. Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental pollution*. 237:93-102.
- Fenerick-Junior J, Stéfani MV, Martins ML. 2006. Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. *Boletim do Instituto de Pesca*. 32(2):173-181.
- Frost DR. 2019. *Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0* (Date of access 02/01/2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA
- Gül Ç; Tosunoğlu M, Erdoğan D. 2011. Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica*. 6(2):137-147.
- Harris JA. 1972. Seasonal variations in some hematological characteristics of *Rana pipens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 43:975-989.
- Heatley JJ, Johnson M. 2009. Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 18(1):14-19.
- Lajmanovich RC, Peltzer PP, Attademo AM, Cabagna MC, Junges CM, Basso A. 2012. Amphibia, Anura, Hylidae, *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Williams and Bosso,

- 1994): first record and some hematological data in Santa Fe Province, Argentina. *Check List*. 8(4):790-791.
- Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, LaPatra S, Tort L, Sunyer JO. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology*. 7(10):1116.
- Maia JP, Harris DJ, Carranza S, Gómez-Díaz E. 2014. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PLoS One*. 9(4), e95010.
- Meesawat S, Kitana N, Kitana J. 2016. Hematology of wild caught *Hoplobatrachus rugulosus* in Northern Thailand. *Asian Herpetological Research*. 7(2):131-138.
- Mitsuru K. 1981. Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 69(4):771-775.
- Natt MP, Herrick CA. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*. 31:735-738.
- Rodrigues SM, Ewbank AC, de Francisco-Strefezzi R, Alvarado G, Sacristan C, de Paula CD, Catão-Dias JL. 2017. Comparative leukocyte morphometric analysis between endemic Anurans from Brazil and the invasive species *Lithobates catesbeianus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 54(2):159-167.
- Sladky KK, Norton TM, Loomis MR. 2000. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in canyon tree frogs (*Hyla arenicolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 31:570-575.
- Spodareva VV, Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Votýpka J, Lukeš J, Yurchenko V, Kostygov AY. 2018. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. *Parasites & Vectors*. 11(1):447.
- Rouf MA. 1969. Hematology of the leopard frog *Rana pipiens*. *Copeia*. 4:682-687.
- Wei J, Li YY, Wei L, Ding GH, Fan XL, Lin ZH. 2015. Evolution of erythrocyte morphology in amphibians (Amphibia: Anura). *Zoologia*, 32(5):360-370.
- Welsh HH, Jr Ollivier LM. 1998. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's Redwoods. *Ecological Applications*. 8:1118-1132.
- Wilson S, Felt S, Torrelles S, Howard A, Behan C, Moorhead R, Green S. 2011. Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught *Xenopus laevis*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 50(5):635-640.
- Wright K. 1995. Blood collection and hematological techniques in amphibians. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. 5:8-10.

Wright K. 2001. Amphibian hematology. In: Wright K, Whitaker B, editors. *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar (FL): Krieger Publishing. 129–46.

Wojtaszek J, Adamowicz A. 2003. Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comparative Clinical Pathology*. 12(3):129-134.

Zhelev ZM, Popgeorgiev GS, Mehterov NH. 2015. Haematological parameters of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from the region of the lead and zinc plant “Kardzhali” (South Bulgaria) and their use in the environmental quality assessment. *Acta Zoologica Bulgarica*. 67:271–282.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação hematológica de *L. latrans* resultou em dados bastante diferentes dos observados em outras espécies de anuros. Animais com hemoparasitos intracelulares possuíram em média menor VCM, indicando um possível aumento na regeneração eritrocitária. Quando afetados por ácaros trombidiformes, obtiveram um aumento na contagem de leucócitos por maiores quantidades de neutrófilos e monócitos circulantes devido a uma provável reação do hospedeiro. Estes resultados auxiliam na compreensão da patogenia causada por parasitos sanguíneos e intradérmicos nestes animais.

Além disso, os anfíbios avaliados possuíram uma ocorrência e riqueza bastante alta de parasitos sanguíneos quando comparado com estudos em outras espécies e localidades. A distribuição dos diferentes hemoparasitos diferiu de acordo com os pontos de coleta e distintos graus de impacto, sugerindo diferentes nichos para seus respectivos vetores. A partir da realização de mais provas moleculares, espera-se refinar a ocorrência de hemoparasitos e identificação em nível de espécie nas amostras do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- AISIEN, M. S. O.; AIGBIRIOR, P. O.; OVWAH, E.; EDO-TAIWO, O. Blood parasites of some anurans from southern Nigeria. **Tropical Biomedicine**. v.32, n.4, p.598-607, 2015.
- ALLENDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. v.11 n.3, p.463-80, 2008.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, n.3, p.403-10, 1990.
- ALZUET, A. B.; MAURI, R. A. Ácaros Trombiculidae del género *Hannemania* Oudemans, endoparásitos de anfibios. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**. v.44, p.111-116, 1987.
- ARIKAN, H.; ALPAGUT-KESKIN, N.; ÇEVİK, İ. E.; ERIŞMIŞ, U. C. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L.(Anura: Bombinatoridae). **Animal Biology**. v.60, n.1, p.61-68, 2010.
- ATATÜR, M. K.; ARIKAN, H.; ÇEVİK, İ. E. Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. **Turkish Journal of Zoology**. v.23, n.2, p.111-114, 1999.
- ATTADEMO, A. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C.; BASSÓ, A. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). **Ecotoxicology**. v.20, n.1, p.274-282, 2011.
- ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; JUNGES, C.; BASSÓ, A.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia:Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.43, n.3, p.579-584, 2012.
- BARDSLEY, J. E.; HARMSEN, R. The trypanosomes of anura. In: DAWES, B. (Ed), **Advances in Parasitology**, London and New York. p.1-73, 1973.
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**. v.81, n.1, p.45-54, 2007.
- BARTA, J. R.; DESSER, S. S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**. v.20, n.3, p.180-9, 1984.
- BARTA, J. R.; BOULARD, Y.; DESSER, S. S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the

context of host phylogeny. **Transactions of the American Microscopical Society**. p.6-20, 1989.

BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed in conservation biology? **Biological Conservation**. v.125, p.271-285, 2005.

BIOLÉ, F. G., VALETTI, J. A., GRENAT, P. R., SALAS, N. E., & MARTINO, A. L. Parasitic infestation of intradermal chiggers *Hannemania achalai* (Acari: Leeuwenhoekiidae) on the cryptic species *Pleurodema kriegi* and *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from Sierra Grande, Córdoba, Argentina. **The Herpetological Journal**. v.25, n.3, p. 163-167, 2015.

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (Orgs.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p.276-291, 2007.

BURTON, T. M.; LIKENS, G. E. Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. **Copeia**. n.3, p.541-546, 1975.

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; STRINGHINI, G.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; PELTZER, P. M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. **Applied Herpetology**. v.2, n.4, p.373, 2005.

CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; BIANCUCCI, G. F.; BASSÓ, A. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. **Revista de Biología Tropical**. v.59, n.1, p.17-28, 2011.

CAMPBELL, T. W. Hematology of lower vertebrates. In: 55 th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39 th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). **International Veterinary Information Service**. 1104-1108, 2004.

CAMPBELL, T. W. Peripheral Blood of Amphibians. In: CAMPBELL, T. W. (Ed) **Exotic Animal Hematology and Cytology**. Wiley-Blackwell, Malden, 2015.

CARVAJAL, H.; RUBIO, H. Sobre algunos apicomplexos parásitos de ranas del pacífico de Colombia. **Actualidades Biológicas**. v.13, n.47, p.13-15, 1984.

CHANG, A. G.; HU, J.; LAKE, E.; BOULEY, D. M.; JOHNS, J. L. Biochemical and hematologic reference intervals for aged *Xenopus laevis* in a research colony. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v.54, n.5, p.465-470, 2015.

CHRISTIN, M. S.; GENDRON, A. D.; BROUSSEAU, P.; MÉNARD, L.; MARCOGLIESE, D. J.; CYR, D.; RUBY, S.; FOURNIER, M. Effects of agricultural

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

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

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

COSTA, S. C. G.; PESSOA, S. B.; PEREIRA, N. D. M.; COLOMBO, T. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal: the frog of the genus *Leptodactylus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.71, n.1-2, p.1-8, 1973.

D'BASTIANI, E.; MICHELLE, M. S.; KARLA, M. C. First record of Filialial nematode in the Brazilian torrent frog *Hylodes heyeri* (Anura, Hylodidae). **Herpetology Notes**. v.11, p.367-368, 2018.

DAS, M.; MAHAPATRA, P. K. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog, *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). **The Scientific World Journal**. 2012.

DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D.; GREEN, D. E.; SPEARE, R. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, p.735-748, 1999.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**. v.9, n.2, p.141-150, 2003.

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. **Copeia**. v.2008, n.3, p.613-617, 2008.

DEPATTA-PILLAR, V. Multivariate exploratory analysis and randomization testing with Multiv. **Coenoses**. 12(2/3), 145-148, 1997.

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

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

DÍAZ-PÁEZ, H.; CORTEZ, E.; DE LA FUENTE, C. S.; MORENO-SALAS, L. Body distribution of *Hannemania* sp.(acari: leeuwenhoekiiidae) in *Rhinella spinulosa*, *Pleurodema bufonina*, and *Pleurodema thaul* from Chile. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.47, n.2, p.594-600, 2016.

DOBSON, A.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M.; HECHINGER, R. F.; JETZ, W. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.105, n.1, p.11482–11489, 2018.

FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; DE OLIVEIRA, C. Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental pollution**. v.237, p.93-102, 2018.

FENERICK-JUNIOR, J.; STÉFANI, M. V.; MARTINS, M. L. Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. **Boletim do Instituto de Pesca**. v.32, n.2, p.173–181, 2006.

FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S. A.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**. v.134, n.11, p.1623-1638, 2007.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. **American Museum of Natural History**, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 2 de jan de 2019.

GÜL, Ç.; TOSUNOĞLU, M.; ERDOĞAN, D. Changes in the blood composition of some anurans. **Acta Herpetologica**. v.6, n.2, p.137-147, 2011.

HARRIS, J. A. Seasonal variations in some hematological characteristics of *Rana pipens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**. v.43, p.975-989, 1972.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**. v.4, n.1, p.9, 2001.

HATANO, F. H.; GETTINGER, D.; VAN SLUYS, M.; ROCHA, C. F. D. Parasitism of *Hylodes phyllodes* (Anura: Cycloramphidae) by *Hannemania* sp.(acari: trombiculidae) in an area of Atlantic Forest, Ilha Grande, southeastern Brazil. **Parasite**, v.14, n.2, p.107-112, 2007.

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

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 24 Jan. 2019.

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

LAINSON, R.; PAPERNA, I. Light and electron microscope study of a *Lankesterella petiti* n. sp., (Apicomplexa: Lankesterellidae) infecting *Bufo marinus* (Amphibia: Anura) in Pará, North Brazil. **Parasite**. v.2, n.3, p.307-313, 1995.

LAJMANOVÍCH, R. C.; PELTZER, P. P.; ATTADAMO, A. M.; CABAGNA, M. C.; JUNGES, C. M.; BASSO, A. Amphibia, Anura, Hylidae, *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Williams and Bosso, 1994): first record and some hematological data in Santa Fe Province, Argentina. **Check List**. v.8, n.4, p.790-791, 2012.

LAVILLA, E. O.; LANGONE, J. A.; CARAMASCHI, U.; HEYER, R.; DE SÁ, R. O. The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758. Nomenclatural impaction the species currently known as *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). **Zootaxa**. v.2346, p.1-16, 2010..

LEAL, D. D. M.; O'DWYER, L. H.; RIBEIRO, V. C.; REINALDO, J. S.; FERREIRA, V. L.; RODRIGUES, R. B. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the Sao Paulo and Mato Grosso do Sul States- Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.81, n.2, p.199-206, 2009.

LEMOS, M.; MORAIS, D. H.; CARVALHO, V. T.; D'AGOSTO, M. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Parasitology**. v.94, n.1, p.148-151, 2008.

LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y. A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J. O. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. **Nature immunology**. v.7, n.10, p.1116, 2006.

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

MANEYRO, R.; NAYA, D. E.; ROSA, I.; CANAVERO, A.; CAMARGO, A. Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. **Iheringia, Série Zoologia**. v.94, n.1, p.57-61, 2004.

MAIA, J. P.; HARRIS, D. J.; CARRANZA, S.; GÓMEZ-DÍAZ, E. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. **PLoS One**. v.9, n.4, 2014.

MARCILI, A.; DA COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; DE LIMA, J. T. R.; MINERVINO, A. H. H.; MELO, A. T. L.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; GENNARI, S. M. Isolation and Phylogenetic Relationships of Bat Trypanosomes from Different Biomes in Mato Grosso, Brazil. **Journal of Parasitology**. v.99, n.6, p.1071-1076, 2013.

MATOS, A. P. A.; PAPERNA, I.; LAINSON, R. An erythrocytic virus of the Brazilian tree-frog, *Phrynohyas venulosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.90, n.5, p.653-655, 1995.

MCKENZIE, V. J. Human land use and patterns of parasitism in tropical amphibian hosts. **Biological Conservation**. v.137, n.1, p.102–116, 2007.

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

MEESAWAT, S.; KITANA, N.; KITANA, J. Hematology of wild caught *Hoplobatrachus rugulosus* in Northern Thailand. **Asian Herpetological Research**. v.7, n.2, p.131-138, 2016.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; NASRI, I.; CUERVO, J. J.; MARTÍN, J.; ACEVEDO, I.; BELLIURE, J.; ORTEGA, J.; GARCÍA-ROA, R.; SELMI, S.; MERINO, S. Phylogenetic relationships of *Isospora*, *Lankesterella*, and *Caryospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting lizards. **Organisms Diversity & Evolution**. v.16, n.1, p.275-288, 2016.

MERINO, S.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; CRIADO-FORNELIO, Á.; TOMÁS, G.; MORALES, J.; LOBATO, E.; GARCÍA-FRAILE, S. Molecular characterization of the 18S rDNA of an avian *Hepatozoon* reveals that it is closely related to *Lankesterella*. **Journal of Parasitology**. 92:1330–5, 2006.

MITSURU, K. Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**. v.69, n.4, p.771–775, 1981.

MURPHY, T. D. High incidence of two parasitic infestations and two morphological abnormalities in a population of the frog *Rana palustris* Le Conte. **American Midland Naturalist**. v.74, p.233-239, 1965.

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

NETHERLANDS, E. C.; COOK, C. A.; KRUGER, D. J.; DU PREEZ, L. H.; SMIT, N. J. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v.4, n.1, p.135-41, 2015.

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

PAPERNA, I.; BASTIEN, P.; CHAVATTE, J. M.; LANDAU, I. *Lankesterella poeppigii* n. sp. (Apicomplexa, Lankesterellidae) de *Bufo poeppigii* (Tschudi, 1845) del Perú. **Revista Peruana de Biología**. v.16, n.2, p.165-168, 2009.

RAJABI, F.; JAVANBAKHT, H.; SAJJADI, S. S. A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v.5, n.4, p.1314-1317, 2017.

RANKIN, J. S. An ecological study of some North Carolina salamanders. **Ecological Monographs**. v.7, p.169-269, 1937.

REICHENBACH-KLINKE, H.; ELKAN, E. **The principal diseases of lower vertebrates**, New York: Academic Press. 600 p, 1965.

REILLY, B. O.; WOO, P. T. K. The in vivo and in vitro development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). **Canadian Journal of Zoology**. n.60, p.124–133, 1982.

RODRIGUES, S. M.; EWBANK, A. C.; DE FRANCISCO-STREFEZZI, R.; ALVARADO, G.; SACRISTAN, C.; DE PAULA, C. D.; CATÃO-DIAS, J. L. Comparative leukocyte morphometric analysis between endemic Anurans from Brazil and the invasive species *Lithobates catesbeianus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. n.54, v.2, p.159-167, 2017.

ROUF, M. A. Hematology of the leopard frog *Rana pipiens*. **Copeia**. v.4, p.682-687, 1969.

SAILASUTA, A.; SATETASIT, J.; CHUTMONGKONKUL, M. Pathological study of blood parasites in rice field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). **Veterinary Medicine International**. 2011.

SILVA-DE LA FUENTE, M. C.; MORENO-SALAS, L.; CASTRO-CARRASCO, C. Review of the genus *Hannemania* (Acari: Leeuwenhoekidae) with description the two new species in amphibians from Chile. **Zootaxa**. v.4200, n.4, p.580–590, 2016.

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

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

SOLÉ, M.; DIAS, I. R.; RODRIGUES, E. A. S.; MARCIANO-JUNIOR, E.; BRANCO, S. M. J.; CAVALCANTE, K. P.; RÖDDER, D. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. **Herpetology Notes**. v.2, p.9–15, 2009.

SPODAREVA, V. V.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; LOSEV, A.; VOTÝPKA, J.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasites & Vectors**. v.11, n.1, p.447, 2018.

STENBERG, P. L.; BOWERMAN, W. J. Hemoparasites in Oregon spotted frogs (*Rana pretiosa*) from central Oregon, USA. **Journal of wildlife diseases**. v.44, n.2, p.464-468, 2008.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**. v.306, n.5702, p.1783-6, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

VIANA, L. A.; SOARES, P.; SILVA, J. E.; PAIVA, F.; COUTINHO, M. E. Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. **Parasitology Research**. v.110, n.2, p.883-6, 2012.

WAHAB, A. R.; ANDY TAN, W. A.; INTAN, S. On the parasitic fauna of two species of anurans collected from Sungai Pinang, Penang Island, Malaysia. **Tropical Biomedicine**. v.25, n.2, p.160-5, 2008.

WEI, J.; LI, Y. Y.; WEI, L.; DING, G. H.; FAN, X. L.; LIN, Z. H. Evolution of erythrocyte morphology in amphibians (Amphibia: Anura). **Zoologia**. v.32, n.5, p.360-370, 2015.

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

WERNER, J. K.; WALEWSKI, K. Amphibian *Trypanosomes* from the McCormick Forest, Michigan. **The Journal of Parasitology**. v.62, n.1, p.20, 1976.

WILSON, S.; FELT, S.; TORREILLES, S.; HOWARD, A.; BEHAN, C.; MOORHEAD, R.; GREEN, S. Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught *Xenopus laevis*. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v.50, n.5, p.635-640, 2011.

WRIGHT, K. Blood collection and hematological techniques in amphibians. **Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians**. v.5, p.8-10, 1995.

WRIGHT, K. Amphibian hematology. In: WRIGHT, K.; WHITAKER, B.; editors. **Amphibian medicine and captive husbandry**. Malabar (FL): Krieger Publishing. p.129-46, 2001.

WOJTASZEK, J.; ADAMOWICZ, A. Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. **Comparative Clinical Pathology**. v.12, n.3, p.129-134, 2003.

YOKOTA, M.; TATSUMI, N.; NATHALANG, O.; YAMADA, T.; TSUDA, I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. **Journal of clinical laboratory analysis**. v.13, n.3, p.133-140, 1999.

YOUNG, B. E.; STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; BOUCHER, T. M. Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians. **Applied Herpetology**. v. 2, p.429-435, 2005.

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

ŽIČKUS, T. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. **Acta Zoologica Lituanica**. v.12, n.2, p.197-202, 2002.