

**RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS,
GENOTÓXICAS E DE ESTRESSE FISIOLÓGICO EM *Rhinella
icterica* (ANURA, BUFONIDAE) EM RESPOSTA À INFECÇÃO
PELO FUNGO *Batrachochytrium dendrobatidis***

Relatório Final de Projeto de Iniciação Científica (PIBIC/ INPE/CNPq)

Nome do Aluno: Mariana Tábata Oschvat Valala - Universidade Federal de
São Carlos - Campus Sorocaba
email: mari_rock2303@outlook.com

Nome do Orientador: Monica Jones Costa - Docente do Departamento de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos - Campus
Sorocaba
email: monica@ufscar.br

Co - orientador: Raquel F. Salla Jacob

Colaboradores: Fábio Camargo Abdalla, Luís Felipe Toledo

Julho de 2019

Resumo

Os anfíbios são bioindicadores ambientais importantes, apresentando grande importância em termos de conservação, porém, apesar da sua relevância ecológica, as populações de anfíbios têm sofrido drástico declínio nos últimos 30 anos devido a diversos fatores, como a ação antrópica e poluição. Uma das causas que têm merecido atenção nos últimos anos é a doença chamada quitridiomiose, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Sabe-se que essa doença afeta a pele desses animais causando hiperqueratose, porém, pouco se sabe sobre os efeitos dessa doença no sistema imunológico e circulatório desses animais; dessa forma, esse projeto foi elaborado para a análise da contagem de estruturas de série branca, vermelha e micronúcleos do sistema circulatório, além de analisar também a glicemia entre os grupos afetados e não afetados pelo fungo.

As análises de série branca indicaram que a diferença significativa foi observada na contagem dos neutrófilos, que apresentaram grande redução em comparação com o grupo controle. Houve aumento do índice glicêmico (mg/dl), mostrando - se um mecanismo de defesa contra a infecção e não houve diferenças significativas entre a contagem de micronúcleos e eritrócitos (ul/sangue) entre os dois grupos.

Introdução

Os anfíbios são sensíveis às alterações ambientais porque possuem a pele permeável e um ciclo de vida bifásico, com a maioria das espécies dependentes da água para reprodução. Sua existência tem sido comprometida devido às ações antrópicas no ambiente, causando perda de habitat, introdução de espécies invasoras e aumento de poluição e doenças. (VERDADE et al., 2010).

As consequências das alterações ambientais exemplificadas podem ser sentidas pelos anfíbios de diversas formas, como alterações na metamorfose e no comportamento, além de maior susceptibilidade a infecções e mudanças em suas distribuições geográficas devido às alterações climáticas causadas por essas interferências antrópicas. (COSTA et al., 2012) Dentre as doenças que causam a redução da população de anfíbios ao redor do mundo está a quitridiomiose, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), atacando a pele desses animais podendo causar a morte. (O'HANLONI et al., 2018) e sua dinâmica é afetada pela

temperatura, sendo mais virulenta e prevalente dentro de um limite de temperaturas, especialmente nas mais baixas. (VOYLES et al., 2017).

Dentre as consequências causadas pelo fungo, está o espessamento da pele afetada pelo *Bd* devido a alterações celulares chamadas de hiperplasia, ou seja, proliferação celular desordenada e à hiperqueratose (espessamento da camada mais externa da epiderme causada pela produção anormal de queratina), afetando a respiração cutânea e causando também desequilíbrios hidroeletrolíticos severos. (OLIVEIRA, 2014).

Para este projeto, foram selecionados diferentes biomarcadores, que são importantes para analisar a resposta do organismo à exposição, analisando as consequências nos parâmetros sanguíneos. Dentre os tipos de células em suspensão no plasma, encontram-se os eritrócitos que podem ser utilizados como biomarcadores de infecção pelo *Bd*. O sangue é constituído de células em suspensão (eritrócitos, plaquetas e leucócitos), moléculas e íons dissolvidos em água. O plasma (55% de sua constituição) serve de solvente das substâncias orgânicas e minerais e também como meio de transporte para moléculas e íons (VIVAS, 2009); logo, se o fungo afetar o sangue, foi considerada a hipótese, nesse projeto, de que o organismo infectado possa apresentar respostas hematológicas de aumento ou redução dos leucócitos.

Além disso, a contagem total e diferencial de glóbulos brancos é também um excelente biomarcador para a infecção por patógenos; os efeitos deletérios de variadas substâncias podem ser analisados de diversas formas e um dos mais utilizados é o sanguíneo, já que as alterações ocorridas nesse tecido são, em geral, relevantes. (SCHVARTSMAN, 1991). O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de células e moléculas dispersas por todo o organismo, com capacidade de reconhecer estruturas que se comportam como antígenos, desenvolvendo uma resposta efetora diante delas. Essa capacidade de defesa é essencial contra o desenvolvimento de infecções e tumores (MARTINEZ; ALVAREZ-MON, 1999).

Além disso, os micronúcleos foram selecionados para contagem para detectar se o quitrídio pode ocasionar mutações cromossômicas: eles são formados durante o processo de divisão celular, constituídos por fragmentos cromossômicos que foram perdidos durante a divisão celular; a detecção de micronúcleos representaria dano cromossômico (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002; BONASSI et al., 2003; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

Entre os vários compostos que circulam no sangue, a glicose apresenta - se como fonte de energia principal do organismo e, por essa importância, está ligada a vários fatores como a idade do animal, estresse causado por algum fator externo, problemas patológicos causados por desnutrição ou endócrinos e hepáticos (COPPO; MUSSART; FIORANELLI, 2005); dessa forma, a glicemia também foi medida nesse estudo para analisar se o quitrídio poderia alterar a glicemia dos animais afetados, comprovando sua patologia.

Dessa forma, por meio da avaliação dos efeitos da infecção pelo *Bd* sobre sapos cururus, *Rhinella icterica* utilizando diferentes biomarcadores sensíveis, pretende-se propor ferramentas para a detecção precoce e pouco invasiva do fungo, além de elucidar seus efeitos sobre os anfíbios anuros em seu ambiente natural.

Objetivos

Geral: avaliar o impacto da infecção pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* sobre os biomarcadores sanguíneos, de genotoxicidade e de estresse fisiológico em anfíbios da espécie *Rhinella icterica*.

Específicos: realizar a contagem de eritrócitos e também a contagem total e diferencial de leucócitos, determinar a frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares e determinar a glicemia em indivíduos infectados e não infectados pelo fungo.

Materiais e Métodos

Até o momento, foram utilizados 28 exemplares de *Rhinella icterica* (ANURA, BUFONIDAE), os quais foram coletados em local de Mata Atlântica no município de Tapiraí -SP (DMS: - 23.918155; -120 47.470454/ Autorização Sisbio 61551-1). Após a coleta, foi realizada uma análise de qPCR (reação em cadeia da polimerase transcrição reversa em tempo real) por meio de *swabs* a fim de selecionar apenas os indivíduos não infectados previamente pelo *Bd* (BOYLE et al., 2004; KRIGER et al., 2006; HYATT et al., 2007; LAMBERTINI et al., 2013). O objetivo é atingir 40 exemplares.

Após a determinação dos indivíduos sadios, eles foram divididos em dois grupos experimentais, infectados (BD+; n = 20) e não infectados pelo *Bd* (BD-; n = 20). Previamente à infecção, os animais foram individualmente mantidos por um período de dez dias em containers plásticos (37 x 27 x 32 cm) com 50 mL de água declorada para recuperação do estresse decorrente da coleta, transporte e manuseio.

Em seguida, para a infecção foi utilizada uma cepa GPL altamente virulenta previamente crescida e preparada em placas de Petri, que será lavada em água destilada e a solução final será contada em câmara de Neubauer para estimar a quantidade de zoósporos a ser utilizada para a infecção, atingindo o número aproximado de 10^7 zoósporos.L⁻¹. Essa solução foi adicionada ao aquário de modo que a concentração final de zoósporos seja de aproximadamente 10^7 zoósporos para garantir que os anfíbios sejam infectados pela doença, o que justifica a elevada concentração quando comparados a outros estudos de laboratório (SAVAGE & ZAMUDIO, 2011; GERVASI et al., 2013; SALLA et al., 2015; VENESKY et al., 2015; BOVO et al., 2016). Os indivíduos do grupo CT foram mantidos pelo mesmo período nas mesmas condições do grupo *Bd*, porém sem a presença do fungo.

Para a obtenção das amostras de sangue, foi feita a eutanásia por espinhalamento e destruição cerebral (STEVENS, 2011; AVMA, 2013) para evitar efeitos farmacológicos adversos de drogas que alterem a fisiologia e histologia do animal (CONCEA, 2015). Foram utilizadas agulhas heparinizadas para a retirada das amostras do sangue dos animais e, em seguida, foi realizado um esfregaço sanguíneo de ambos os grupos para a contagem dos eritrócitos e contagem diferencial e total de leucócitos (FANALI et al., 2018), bem como a determinação de micronúcleo (LUZHNA et al., 2013) e outras anormalidades nucleares.

Resultados e Discussão

As análises indicam que os indivíduos infectados pelo fungo quitrídio sofreram uma redução do número de neutrófilos (gráfico 1), o que indica que essa espécie teve sua resposta imunológica primária afetada. Em Fites *et al.*, (2013), foi levantada a hipótese de que o fungo quitrídio poderia inibir as funções imunológicas. A espécie escolhida para exposição nesse trabalho foi a *Xenopus laevis* e, após análises, foi descoberto que esse fungo prejudicou a proliferação de linfócitos e induziu a apoptose dessas células, sem comprometer, todavia, o processo de fagocitose realizado por

macrófagos e neutrófilos: a proliferação de linfócitos T e B foi reduzida. Logo, diferentemente do que foi encontrado por Fites *et al.*, (2013), para a *Rhinella icterica*, a infecção pelo quitrídio não inibiu a proliferação de linfócitos. Isso demonstra que, embora infectados pelo fungo (como confirmado pelo PCR real time), o fungo não foi capaz de produzir os metabólitos que prejudicam os linfócitos, além de mostrar que o comportamento à exposição ao fungo quitrídio varia entre as espécies de anfíbios.

Em outro estudo realizado por Woodhams *et al.*, (2007), foi trabalhada a importância da abundância da quantidade de peptídeos antimicrobiais liberados na pele na defesa do organismo contra o fungo: anfíbios australianos e panamenhos que possuem esses peptídeos apresentam taxa de sobrevivência maior quando expostos a esse fungo. Foram escolhidas quatro espécies de anfíbios para exposição: *Litoria caerulea*, *Litoria chloris*, *Mixophyes fasciolatus* and *Limnodynastes tasmaniensis*; em *Lit. chloris*, quando analisada a contagem de série branca, houve diferença na contagem de granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), mas não em linfócitos, apresentando a mesma resposta das espécies *Rhinella icterica* e *Xenopus laevis*.

Como resultado do experimento acima, nos qual foram expostos ao fungo, 20 indivíduos de cada espécie durante 108 dias, apenas 5% de *Lit. caerulea* e *M. fasciolatus* sobreviveram; 35% de *Lit. chloris* sobreviveram e 100% de *Lim. tasmaniensis* sobreviveram ao fim de 108 dias: a *Lim. tasmaniensis* apresentou melhor resposta contra a infecção, pois produz quantidades maiores dessa secreção de peptídeos; dessa forma, fica mais plausível de que essa microbiota encontrada na pele dos anfíbios conceda a eles resistência ao fungo, impedindo que ele se prolifere e cause alterações no sistema imunológico deles; essa teoria também foi levantada com a *Rhinella icterica* e está em desenvolvimento.

Não foram encontrados basófilos e, de acordo com testes estatísticos, não foram observadas alterações na frequência dos outros leucócitos: linfócitos (gráfico 2), eosinófilos (gráfico 3) e monócitos (gráfico 4), indicando que, para esta espécie, o fungo quitrídio parece não comprometer as demais vias de defesa imunológica do organismo, comprovado pela ausência de mudança significativa na quantidade das outras organelas da série branca.

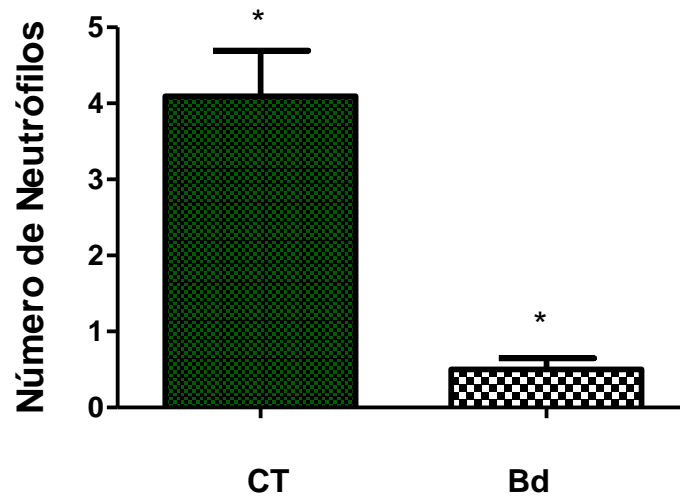


Gráfico 1: comparação do número de neutrófilos do grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo (Mann - Whitney Test; $p < 0,001$ com valor Gaussiano Aproximado). O asterisco indica que essa análise estatística apresentou resultado significativo, com $p < 0,05$.

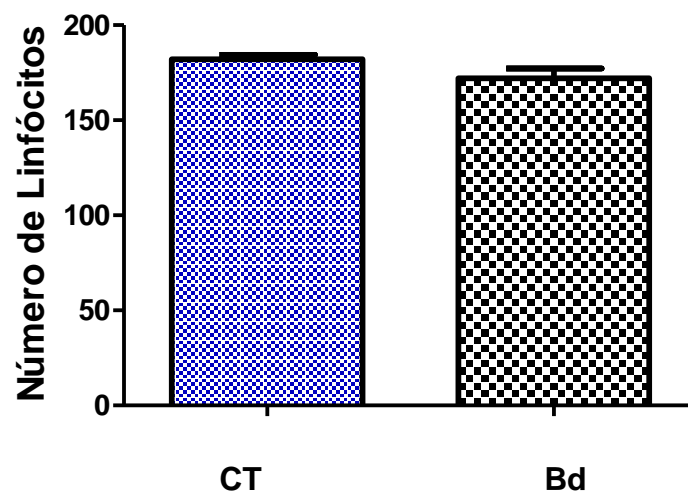


Gráfico 2: comparação do número de linfócitos dos animais do grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo. (Mann - Whitney Test; $p = 0,2450$).

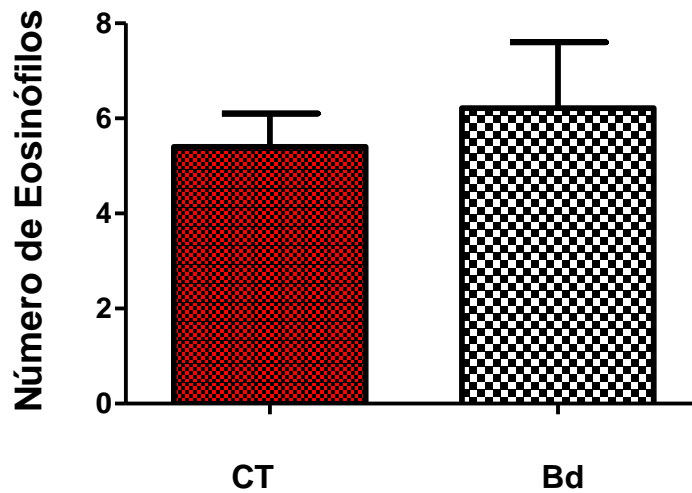


Gráfico 3: comparação do número de eosinófilos dos animais do grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo. (Unpaired t test with Welch correction; $p = 0,6030$).

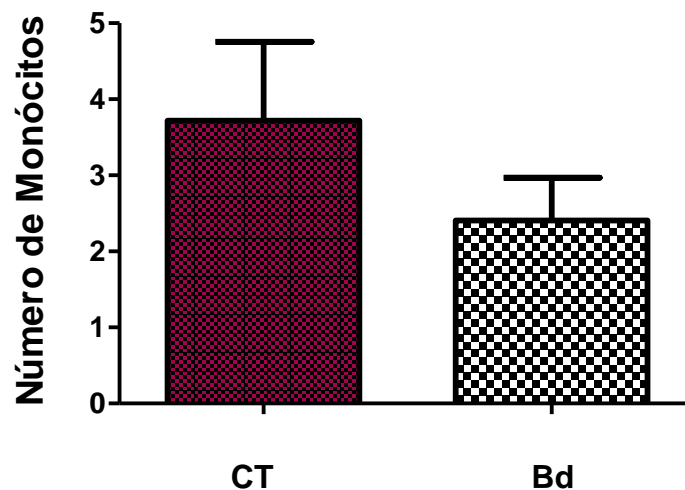


Gráfico 4: comparação do número de monócitos dos animais do grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo. (Mann - Whitney Test; $p = 0,1787$).

O índice glicêmico é um marcador biológico que pode ser utilizado para a avaliação da resposta dos anfíbios em condições de estresse, no caso, o fungo quitrídio e os fatores estressantes podem conduzir a diferentes respostas, alterando a glicemia dos animais, por exemplo. Em Rocha *et al.*, (2010), espécimes de rã touro americana (recentemente denominada *Lithobates catesbeianus*), foram submetidas a condições de estresse tanto de captura quanto de exposição ao oxigênio: alguns animais foram submetidos a condições de hipoxia. Diferentemente do que foi observado em Rocha *et al.* (2010), os espécimes de *Rhinella icterica* apresentaram diferenças significativas no

índice glicêmico, aumentando - o em comparação com os indivíduos controle (gráfico 5). No estudo com *Lithobates catesbeianus*, os resultados da glicemia não foram diferentes quando comparados os indivíduos do grupo controle aos indivíduos submetidos às condições de estresse (captura e hipoxia). Dessa forma, pode-se observar que o fungo quitrídio altera as respostas fisiológicas dos indivíduos de *Rhinella icterica*, aumentando seus índices.

Todavia, em outro estudo, Steiner *et al.*, (2000), a importância da glicose foi verificada em condições de crioresistência (frio como estressor) de rã *Rana catesbeiana* e sapo *Bufo paracnemis*, que foram expostos a -2°C (os sapos não sobreviveram): os índices glicêmicos desse estudo apresentam diferenças significativas, aumentando de $40,35 \pm 7,25$ para $131,87 \pm 20,72$ mg/dl ($p < 0,01$), mostrando que, assim como o aumento da glicemia foi um mecanismo de resistência ao congelamento, o aumento da glicemia dos indivíduos quando expostos ao fungo também representaram um mecanismo de resistência; no caso do quitrídio, o aumento foi de $47,6 \pm 1,77$ para $61,25 \pm 1,88$.

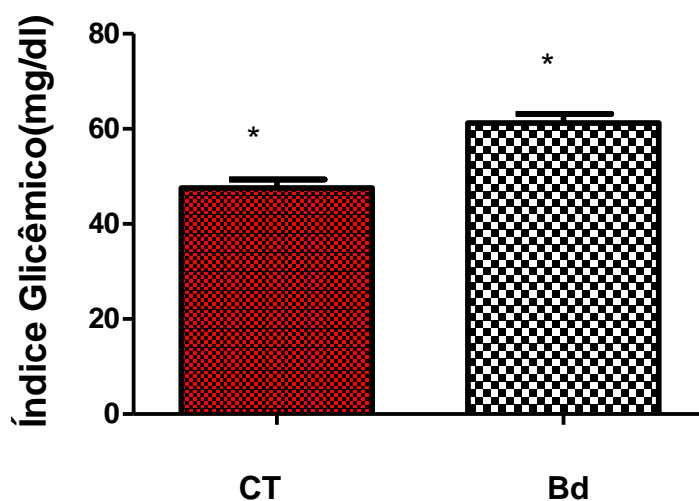


Gráfico 5: comparação do índice glicêmico (mg/dl) dos animais de grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo (Paired t test, $p < 0,001$). O asterisco indica que essa análise estatística apresentou resultado significativo, com $p < 0,05$.

O ensaio de micronúcleo tem se mostrado bem promissor para a avaliação de efeitos de agentes mutagênicos e genotóxicos. Em Gonçalves *et al.*, (2010), foi analisada a frequência de micronúcleos em anfíbios anuros (*Proceratophrys goyana*, *Leptodactylus leptodactyloides* e *Dendropsophus soares*, por exemplo), coletados em

área de mineração de níquel em comparação com animais coletados em áreas naturais. Assim como no caso do quitrídio, a análise não foi significativa (gráfico 6), pois, dos 32 indivíduos coletados em área de exposição de níquel, apenas 4 apresentaram alterações eritrocíticas nucleares (micronúcleo incluso), mostrando que esse contaminante não alterou processos nucleares, assim como o quitrídio não apresentou capacidade de alteração a nível nuclear.

Todavia, alguns fatores podem ocasionar o aparecimento de micronúcleos, como mostrado em Caraffa *et al.*, (2014), no qual foram coletados indivíduos de *Bufo arenarum* em locais modificados pela ação antrópica (urbanizados) em ambientes naturais para análise de micronúcleo, constatando que a interferência humana ocasiona modificações a nível celular, comprovado por análises estatísticas (Kruskall - Wallis, $p = 0,0023$). Esse estudo é interessante porque demonstra que a ação antrópica pode ter mais influência prejudicial na fisiologia de anfíbios do que se imagina, uma vez que um organismo natural como o quitrídio não apresenta tal capacidade.

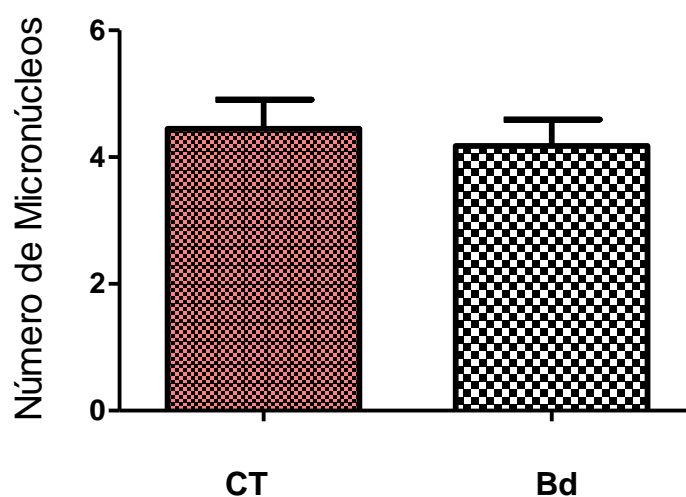


Gráfico 6: comparação do número de micronúcleos do animais de grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo (Paired t test, $p = 0,6806$).

Quanto à contagem dos eritrócitos, não houve diferença entre os indivíduos do grupo controle e afetado pelo quitrídio (gráfico 7), mostrando que a função desempenhada pelos eritrócitos (transporte de gases), não foi comprometida, indicando que os indivíduos expostos ao *Batrachochytrium dendrobatidis* não apresentaram deficiência de oxigenação no corpo.

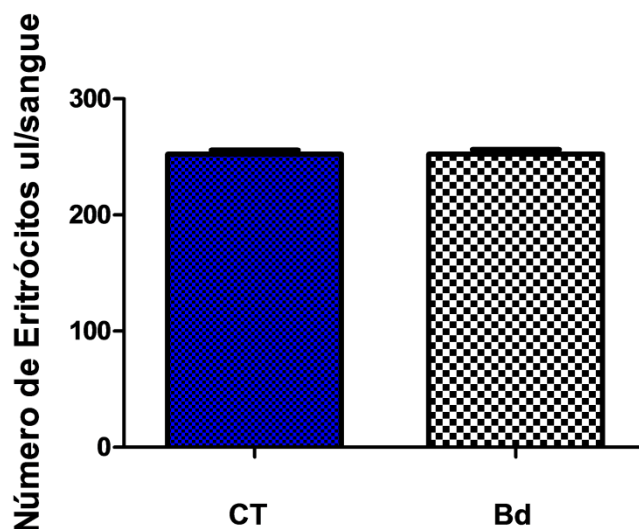


Gráfico 7: comparação do número de eritrócitos dos animais de grupo controle de *Rhinella icterica* com os afetados pelo fungo (Unpaired t test with Welch's correction, $p= 0,9926$)

Conclusões

O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* apresentou capacidade de afetar o sistema imunológico da *Rhinella icterica*, pois diminuiu significativamente o número de neutrófilos, comprometendo a resposta imunológica primária. Apesar disso, a espécie mostra certa tolerância à infecção já que as outras organelas de série branca não foram afetadas significativamente, mostrando que o sistema imunológico é capaz de reagir às toxinas que o fungo possa produzir. Essa tolerância pode ser explicada pela microbiota encontrada na pele desses anfíbios como exemplificado por Woodhams *et al.*,(2007), que realizou o experimento com outras espécies, mostrando que pode ser a justificativa para maior tolerância da *Rhinella icterica* , experimento em desenvolvimento.

A glicemia sofreu alterações, indicando que o organismo responde à infecção do *Batrachochytrium dendrobatidis* como uma possível forma de defesa; ao contrário desse item, o fato de os micronúcleos e eritrócitos não apresentarem alterações significativas mostra que o fungo não prejudica processos de divisão celular e transporte de gases, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- AVMA AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, BOVO, R.P.; ANDRADE, D.V.; TOLEDO, L.F.; LONGO, A.V.; RODRIGUEZ, D.; HADDAD, C.F.B.; ZAMUDIO, K.R.; BECKER, C.G. **Physiological Responses of Brazilian Amphibians to an Enzootic Infection of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis***. Dis Aquat Organ, 2016 cap. 117. p. 245-252.
- BOYLE, D.G.; BOYLE, D.B.; OLSEN, V.; MORGAN J a T; HYATT a D. **Rapid Quantitative Detection of Chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Amphibian Samples Using Realtime Taqman PCR Assay**. Dis Aquat Organ 2004,60:141 - 148.
- CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) **Diretriz da Prática de Eutanásia**, 2015 p.9.
- COSTA, T. R. N.; CARNAVAL, A. C. O. Q. & TOLEDO, L. F. 2012. Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. **Revista da Biologia** 8:33-37.
- COPPO, J. A.; MUSSART, N. B.; FIORANELLI, S. A. Blood and urine physiological values in farm-cultured *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) in Argentina. *Revista De Biología Tropical*, v. 53, n. 3–4, p. 545–559, dez. 2005.
- FANALI, L.Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; OLIVEIRA, C. Effects of Benzo[a]pyrene on the Blood and Liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) **Elsevier**, 2018, p. 93-102.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion- bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, 131-136, 2002.
- FITES, J.S.; RAMSEY, J.P.; HOLDEN, W.M.; COLLIER, S.P.; SUTHERLAND, D.M.; REINART, L.K.; GAYEK, A.S.; DERMODY, T.S.; AUNE, T.M.; OSWALD

RICHTER, K.; ROLLINS – SMITH, L.A. The Invasive Chytrid Fungus of Amphibian Paralyzes Lymphocyte Responses. **Science**. v. 342. 2013. p- 366 - 369

GERVASI, S.S.; URBINA, J.; HUA, J. CHESTNUT, T. A.; RELYEA, R.R.; BLAUSTEIN, A. Experimental Evidence for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Susceptibility to Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) **Ecohealth** , 2013, c. 10. p. 166 - 171.

GONÇALVES, Macks Wendhel et al. Análises Mutagênicas de Anuros em Áreas de Mineração de Níquel. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 37, n. 5, p. 737-747, 2010.

KRIGER KM, HINES HB, HYATT AD, BOYLE DG, HERO JM. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: Comparing histology with real - time Taqman PCR. *Dis Aquat Organ*. 2006. 71: 141-148.

LACERDA, L.A. Metabolismo do Eritrócito Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005, p.1 - 3.

LAMBERTINI, C.; RODRIGUEZ, D.; BRITO, F.B.; LEITE, S.; TOLEDO, LF.; Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. 2013. *Herpetologia* 2:12 - 17.

LUZHNA, L.; KATHIRIA,P.; KOVALCHUK,O. Micronuclei in Genotoxicity Assesment: from Genetics to Epigenetics and Beyond. **Frontiers in Genetics**. 2013, v.4, p. 1.

MARTINEZ, A.C.; ALVAREZ-MON, M. O Sistema Imunológico (I): Conceitos Gerais, Adaptação ao Exercício Físico e Implicações Clínicas. **Rev. Bras. Med. Esporte**, 1999 V. 5. n° 3. p. 120.

O’HANLON, S. J. et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, 2018, 360, 621-627

OLIVEIRA, C.D. **Análise in Vitro da Atividade de Secreções Cutâneas de Anfíbios do Cerrado Brasileiro à Proliferação do Fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*** (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999), 2014, p. 5 - 6.

SALLA, R.F.; GAMERO, F.U.; LIZZI, G.M.; DEL MEDICO, S.E.; RISSOLI, R.Z.; VIEIRA, C.A.; SILVAZACARIN, E.C.M.; LEITE, D.S.; ABDALLA, F.C.; COSTA, M.J **Cardiac Adaptations of Bullfrog Tadpoles in Response to Chytrid Infection. J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol** , 2015 c. 323 p. 487 - 496.

ROCHA, Guilherme C et al. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v.

30, n. 10, p.891-896, out. 2010.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas:Ulbra, 2003, p.201-223.

SAVAGE, A.E.; ZAMUDIO, K.R.; MHC genotypes associate with resistance to a frog killing fungus. 2011.Proc Natl Acad Sci U S A 108:16705 - 10.

SCHVARTSMAN, S. 1991 Intoxicações Agudas. 4.ed. São Paulo: Sarvier.

STEVENS, C.W.; Analgesia in Amphibians: Preclinical Studies and Clinical Applications. **Vert Clin Exot Anim** , 2011 c. 14. p 33-44.

STEINER, A. A. et al. The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. **Revista Brasileira de Biologia**, [s.l.], v. 60, n. 2, p.321-328, maio 2000.

VENESKY, M.D.; HESS, A.; DEMARCHI, J.A.; WEIL, A.; MURONE, J.; HICKERSON, C.A.M.; ANTHONY, C.D. **Morph-specific Differences in Disease Prevalence and Pathogen - induced Mortality in a Terrestrial Polymorphic Salamander** **J Zool** , 2015,c. 295 p. 279 - 285.

VERDADE, V.K., VALDUJO, P.H., CARNAVAL, A.C., SCHIESARI, L., TOLEDO, L.F., MOTT, T., ANDRADE, G.V., ETEROVICK, P.C., MENIN, M., PIMENTA, B.V.S., NOGUEIRA, C., LISBOA, C.S., PAULA, C.D. & SILVANO, D.L. 2012. A leap further: the Brazilian Amphibian Conservation Action Plan. *Alytes* 29(1-4):28-43.

VIVAS, W.L.P. Hematologia O sangue: Considerações Gerais **Manual Prático de Hematologia** , 2009, p.2.

VOYLES, Jamie et al. Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. **Oecologia**, 2017, 184, 363-373.

WOODHAMS, D. C., ARDIPRADJA, K., ALFORD, R. A., MARANTELLI G., REINART, L. K., & ROLLINS - SMITH, L. A. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. **Animal Conservation**, 10(4), 409 - 417.