

Universidade Federal do ABC  
Centro de Ciências Naturais e Humanas

João Paulo de Oliveira Xavier

IDENTIFICAÇÃO DE HEMOPARASITAS E FATORES QUE MODULAM  
INFECÇÕES EM ANUROS DA MATA ATLÂNTICA

Santo André - SP  
2018

João Paulo de Oliveira Xavier

IDENTIFICAÇÃO DE HEMOPARASITAS E FATORES QUE MODULAM  
INFECÇÕES EM ANUROS DA MATA ATLÂNTICA

Trabalho apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kruth Verdade

Santo André - SP

2018

## Agradecimentos

Antes de qualquer consideração, agradeço incondicionalmente e dedico este trabalho à minha mãe, Eunildes Marques de Oliveira Xavier, meu pai, João Carlos Xavier, minha avó, Margarida da Cruz Xavier, e minha irmã, Mariana de Oliveira Xavier. Obrigado pelo carinho, atenção e suporte que sempre me proporcionaram. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Pelo apoio e amor dedicado em grande parte da minha vida acadêmica, expresso meus agradecimentos à Patricia Nogueira Silveira, minha antiga companheira. O que foi vivido sempre fará parte de mim.

Agradeço à Renata Gonçalves Nakanishi que, mesmo à distância, me mostra diariamente o significado de amor, sinceridade, companheirismo e compreensão. Ao seu lado descubro constantemente novas perspectivas que jamais havia imaginado, o que me deixa extremamente feliz. Você é o cais acolhedor que me recebe e tranquiliza após uma viagem turbulenta.

Meus profundos e sinceros agradecimentos à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kruth Verdade, pela dedicação e ensinamentos nos projetos que desenvolvemos. Agradeço ao Diego Almeida-Silva, coorientador e grande amigo, que tanto auxiliou, ensinou e contribuiu para minha formação pessoal e constituição enquanto biólogo. Obrigado por toda ajuda até aqui.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Aparecida Sperança e sua aluna Leticia Andrade pela paciência, dedicação e ajuda nas análises moleculares.

Agradeço aos inúmeros (as) parceiros e parceiras que tanto me divertem, escutam, ensinam e tranquilizam. Obrigado por estarem ao meu lado nos momentos de necessidade e de diversão. Sem dúvidas vocês fizeram parte deste processo.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do ABC e seu corpo de professores, pela oportunidade que tive de experienciar um ambiente tão rico em conhecimento científico, expressões culturais e trocas pessoais. Parte do que sou hoje é fruto das vivências que tive neste ambiente.

## RESUMO

Anfíbios são hospedeiros de uma grande variedade de organismos, desde hemoparasitas intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários intraeritrocitários, até protozoários flagelados e nematódeos extracelulares. Além da abundância, comportamento e condição de vida de hospedeiros e vetores, a incidência de parasitas pode ser modulada por fatores filogenéticos, morfológicos, comportamentais e relativos ao modo de vida das espécies. A ocorrência e grau de infestação causada por parasitas em comunidades naturais pode variar de acordo com a riqueza e complexidade das comunidades, de modo que a perda de biodiversidade pode gerar quadros epidemiológicos inéditos. Anfíbios anuros têm sofrido declínios populacionais importantes desde a década de oitenta, e um dos potenciais fatores responsáveis é a infecção por um fungo. Entender quais são os patógenos presentes em comunidades naturais, como interagem e quais são os grupos de hospedeiros mais suscetíveis fornece informações úteis para discutir declínios pretéritos e potenciais no futuro, bem como traçar estratégias de conservação. Para tanto, realizamos análises parasitológicas e moleculares em 93 espécimes de anuros de quatro riachos da região de Paranapiacaba (SP), a fim de detectar a incidência de quatro grupos de hemoparasitas (*Filarioidea*, *Hepatozoon*, *Rickettsia* e *Trypanosoma*). Do total de indivíduos avaliados, 76,3% deram positivo para *Trypanosoma*, 5,4% para *Filarioidea*, 16,1% para *Hepatozoon* e 69,9% para *Rickettsia*. As frequências com que ocorreram mostraram-se diferentes do esperado em um cenário ao acaso, sugerindo diferenciação na ocorrência de hemoparasitas entre riachos e famílias de anuros. Tais diferenças podem estar relacionadas à maior densidade de vetores e/ou prevalência de determinadas linhagens de parasitas dentro destes grupos, indicando diferentes graus de susceptibilidade em diferentes espécies.

**Palavras-chave:** parasitas; anfíbios; conservação; Paranapiacaba.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>8</b>
Área de estudo e coleta de anfíbios	9
Levantamento de hemoparasitas	11
<b>RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>14</b>
<b>TABELAS</b>	<b>28</b>

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 540 milhões de anos, cinco extinções em massa foram identificadas, nas quais ao menos três quartos da biodiversidade desapareceram completamente (Hallam & Wignall, 1997). Estimativas recentes têm revelado uma perda rápida da biodiversidade nos últimos séculos, muito provavelmente devido a intensa pressão de atividades antropogênicas sobre os ecossistemas (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2015). Tais taxas de declínios de espécies apontam para uma sexta extinção em curso.

Além de afetar o fornecimento de serviços ecossistêmicos, a redução da biodiversidade leva a outras alterações ecológicas importantes, como a transmissão e prevalência de doenças infecciosas (Keesing et al., 2010). A princípio, áreas preservadas podem servir como base para o aparecimento de novos patógenos (Ostfeld & Keesing, 2012), por usualmente abrigarem um grande número de espécies hospedeiras. Quanto maior a diversidade de espécies hospedeiras, maiores as possibilidades para diversificação de parasitas. Por outro lado, constata-se paralelamente que quanto menos diverso o ecossistema, maiores as chances de transmissão de doenças em diversos grupos taxonômicos (e.g. Ostfeld & Keesing, 2000, Schmidt & Ostfeld, 2001; Keesing et al., 2010). Essa chance aumenta devido a alterações na abundância, comportamento e condição de vida de hospedeiros, vetores e parasitas.

Hospedeiros podem variar quanto a sua capacidade em manter e transmitir parasitas (Ostfeld & Keesing, 2012). Algumas espécies, chamadas de “hospedeiros de alta qualidade”, configuram como importantes reservatórios, por serem ideais para determinados parasitas e/ou vetores. Ao mesmo tempo, outras espécies hospedeiras (hospedeiros de baixa qualidade) são preteridas, tanto por vetores quanto por parasitas. A preferência de parasitas e vetores por distintos organismos demonstra que a contribuição para epidemiologia varia entre diferentes hospedeiros na comunidade.

Ambientes muito diversos podem, por vezes, abrigar grande número de hospedeiros de baixa qualidade, restringindo por competição interespecífica a

abundância daquelas espécies que desempenham papel mais importante na disseminação de doenças (Ostfeld & Keesing, 2012). Este fenômeno é conhecido como “efeito de diluição” (Keesing et al., 2006; Johnson et al., 2013). Quanto maior a biodiversidade, menores as chances de disseminação de parasitas. Conseqüentemente, a perda de espécies pode aumentar o risco de doenças em populações selvagens, além da possibilidade de transmissão para humanos.

De modo complementar, a atuação de parasitas têm sido associada a eventos de alterações populacionais (van Riper et al., 1986; Gulland, 1995; Skerratt et al., 2007), inclusive em espécies ameaçadas (McCallum & Dobson, 1995), o que despertou maior atenção da comunidade acadêmica aos parasitas e patógenos de animais selvagens. Este é um cenário em que se enquadram os anfíbios, grupo de vertebrados para o qual severos declínios foram registrados em ambiente natural da década de 1970 até hoje (Czechura & Ingram, 1990; Sherman & Morton, 1993; Burrowes et al., 2004). Boa parte desses eventos de mortalidades em massa (Skerratt et al., 2007; Murray & Skerratt, 2012) foram associados à quitridiomíose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Berger et al., 1998), possivelmente o mais notório patógeno de anfíbios na atualidade. Trata-se de um fungo que acomete as estruturas queratinizadas destes animais, alterando o controle osmótico em um nível que pode levar à parada cardíaca (Voyles et al., 2007). Entretanto, anfíbios são hospedeiros de uma grande variedade de organismos (Stenberg et al., 2008; du Preez & Carruthers, 2009; Leal et al., 2009), desde hemoparasitas intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários intraeritrocitários, até protozoários flagelados e nematódeos extracelulares (Baker, 2008; Leal et al., 2009).

No nível intra hospedeiro, a hipótese do efeito de diluição sugere uma relação negativa entre a riqueza de parasitas e o sucesso da infecção por ele provocada (Johnson & Hoverman, 2012), agindo diretamente sobre mecanismos que modulam sua virulência (Rigaud et al., 2010). Neste cenário, os efeitos da parasitose sobre o *fitness* do hospedeiro dependem do contexto. Caso o incremento de novos parasitas diminua a população de espécies muito virulentas por competição, haverá um efeito positivo. No entanto, maior riqueza de parasitas pode também levar a efeitos negativos, quando a incorporação de novas populações de patógenos não

necessariamente diminuí aquelas responsáveis por infecções mais graves (Johnson & Hoverman, 2012).

A compreensão dessa dinâmica envolve buscar quais fatores podem tornar expostos à atuação de parasitas distintos subconjuntos de indivíduos dentro de um grupo. De modo geral, fatores morfológicos, comportamentais e relacionados ao modo de vida das espécies podem indicar maior ou menor grau de susceptibilidade à infecções parasitárias (Edman & Kale, 1971; Dobson et al., 2008). Entre os vertebrados, parâmetros relativos aos hospedeiros podem prever taxas de infecção por determinados parasitas. Indivíduos adultos apresentam maior riqueza de parasitas do que juvenis, por maior tempo de exposição à parasitas e vetores, bem como por possíveis alterações imunológicas (Erkenswick et al., 2017). Em quelônios, o sexo parece modular os níveis de parasitismo, pela maior incidência de vetores em fêmeas (Davis & Sterrett, 2011). Tamanho da ninhada e massa corporal, em associação à alterações de temperatura, podem alterar a abundância de parasitas em aves (Møller et al., 2013). Netherlands e colaboradores (2015) demonstram que o modo de vida de anuros e seu local de ocorrência influenciam na prevalência de hemoparasitas. Por estarem expostos tanto a vetores terrestres quanto aquáticos, animais semi-aquáticos e semi-terrestres tendem a apresentar maior parasitemia, comparados a animais estritamente aquáticos ou terrestres. Paralelamente, populações de diferentes localidades apresentaram neste mesmo estudo distintas taxas de infecção por parasitas sanguíneos, demonstrando a variação geográfica na incidência de parasitas. O táxon ao qual as espécies pertencem está associado à diferenças ecológicas e relativas a imunidade (Quillfeldt et al., 2011), o que pode influenciar tanto na exposição, quanto na capacidade de lidar com parasitas. Local de nidificação (Lutz et al., 2015), altitude de ocorrência, tipo de floresta (úmida ou seca) e habitat em que são encontrados (Savage et al., 2009) configuram como outros exemplos de fatores capazes de prever taxas de parasitismo em diferentes grupos.

No Brasil, foram documentadas reduções populacionais severas em áreas protegidas da Mata Atlântica, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (e.g. Heyer et al., 1988; Weygoldt, 1989). De modo geral, as espécies mais afetadas foram aquelas com maior biomassa e modos reprodutivos especializados,



com girinos que habitam riachos no interior de florestas em regiões altas (; Lips et al., 2006; Catenazzi et al., 2011; Gründler et al., 2012). Ainda não existem evidências robustas sobre as causas de tais declínios. Embora Carvalho e colaboradores (2017) afirmem que a quitridiomiose possa explicá-las, a superexploração das espécies, alterações climáticas e poluição são algumas das possíveis causas que podem agir em sinergia (Verdade et al., 2011).

Devido sua história natural, anfíbios tendem a se agrupar no entorno de ambientes onde há maior disponibilidade de água (Duellman & Trueb, 1994). O fato de muitos anuros neotropicais procriarem na estação chuvosa, na época em que há maior exposição de indivíduos à corpos d'água, contribui para a proliferação e transmissão de doenças. Além disso, o contato entre indivíduos em situações de combate entre machos e durante o amplexo também pode amplificar a proliferação de parasitas (Rachowicz & Vredenburg, 2004).

Reconhecer se e como fatores filogenéticos, morfológicos e ecológicos estão relacionados com infestações parasitárias na área de Mata Atlântica estudada, considerando-se diferentes sítios, tipos de parasitas e grau de infestação, contribui para a compreensão da epidemiologia geral destas parasitoses (Dobson, 2004) e otimiza a capacidade de detecção e prevenção de doenças emergentes.

Partindo destes pressupostos, este trabalho teve como objetivos específicos: 1) Detectar a presença e prevalência de quatro grupos de hemoparasitas (*Rickettsia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma* e Filarioidea) em anuros da Mata Atlântica; 2) Identificar se fatores temporais (estação seca ou úmida), geográficos (riacho onde os animais foram coletados), ecológicos (tipo de hábito de vida), filogenéticos (família a qual fazem parte) e morfológicos (massa e comprimento rostro-cloacal) são capazes de modular a presença e prevalência de hemoparasitas em seus hospedeiros.

## **METODOLOGIA**

Os espécimes utilizados neste estudo foram coletados no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PNMNP), ao longo de oito viagens a campo, realizadas entre os meses de maio e novembro de 2015, como parte do

projeto de mestrado Almeida-Silva (2016). No total, quatro riachos foram visitados a cada viagem: Água Fria (long. = -23.767382; lat = -46.288862), Bica dos Namorados (long. = -23.772339; lat. = -46.290920), Caixa do Gustavo (long. = -23.769289; lat. = -46.294414) e Pontinha (long. = -23.772851; lat. = -46.302398) (Figura 1). A realização de ensaios parasitológicos na época e a preservação de amostras de tecido congeladas em ultrafreezer permitiram o desenvolvimento deste trabalho, como uma extensão do projeto de mestrado supracitado.

#### *Área de estudo e coleta de anfíbios*

O PNMNP localiza-se em Santo André, município do Grande ABC, na borda do Planalto Atlântico paulista (Ferreira et al., 2009), em meio à maior área de proteção dos remanescentes de Mata Atlântica do estado: a Reserva da Biosfera do Cinturão Verde de São Paulo (RBMA) (Costa, 1997). O PNMNP conta com 426 hectares de vegetação predominantemente composta por Floresta Ombrófila Densa, em diferentes estágios de regeneração (PMSA, 2013) e apresenta altitudes variando de 850 m a 1.174 m (PMSA, 2008). O verão é úmido, com média de temperatura por volta de 21°C, e o inverno mais seco, com temperatura média por volta de 15°C. A precipitação acumulada na região é uma das mais altas do Domínio Morfoclimático Tropical Atlântico, atingindo 4.000mm anuais.

Dados climáticos para a região de Paranapiacaba referentes ao período de amostragem foram obtidos a partir do Sistema de Alerta a Inundações de São Paulo (SAISP) (precipitação) e Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (temperatura) (Figura 1). Como o INMET não realiza medições na área, os valores foram obtidos através da interpolação pelo inverso da distância à partir da rede de estações existente no estado de São Paulo (Mandel et al., 2016).

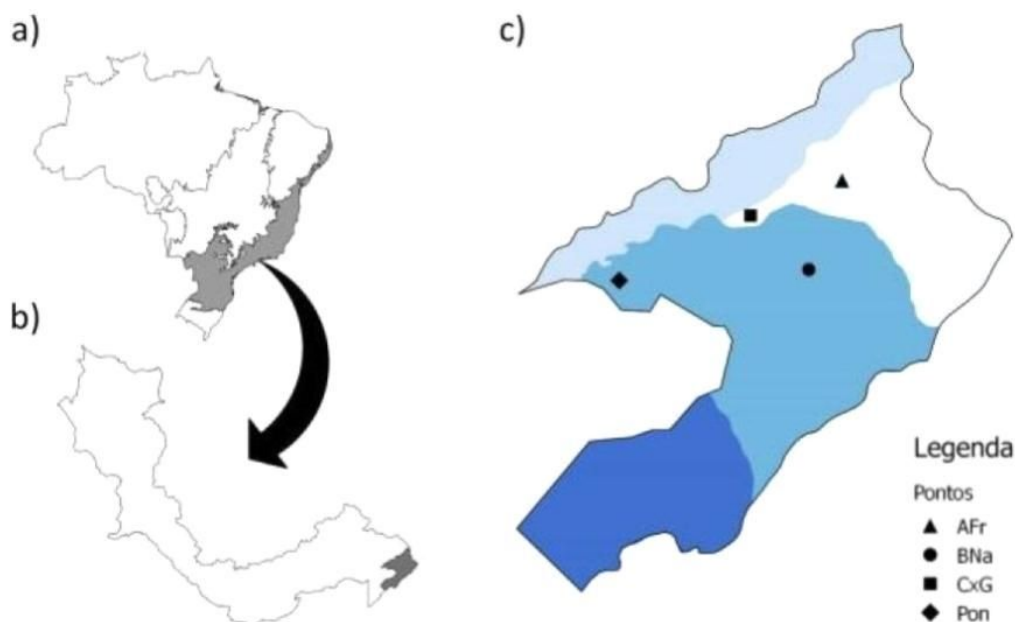


Figura 1: Localização dos riachos nos quais foram realizadas as coletas de espécimes (Água Fria [AFr], Bica dos Namorados [BNa], Caixa do Gustavo [CxG] e Pontinha [Pon]), na região do PNMNP (c), em relação ao município de Santo André (b) e o bioma Mata Atlântica (a). As regiões destacadas por diferentes cores representam as 4 sub-bacias do PNMNP (Retirado com autorização de Almeida-Silva, 2016).

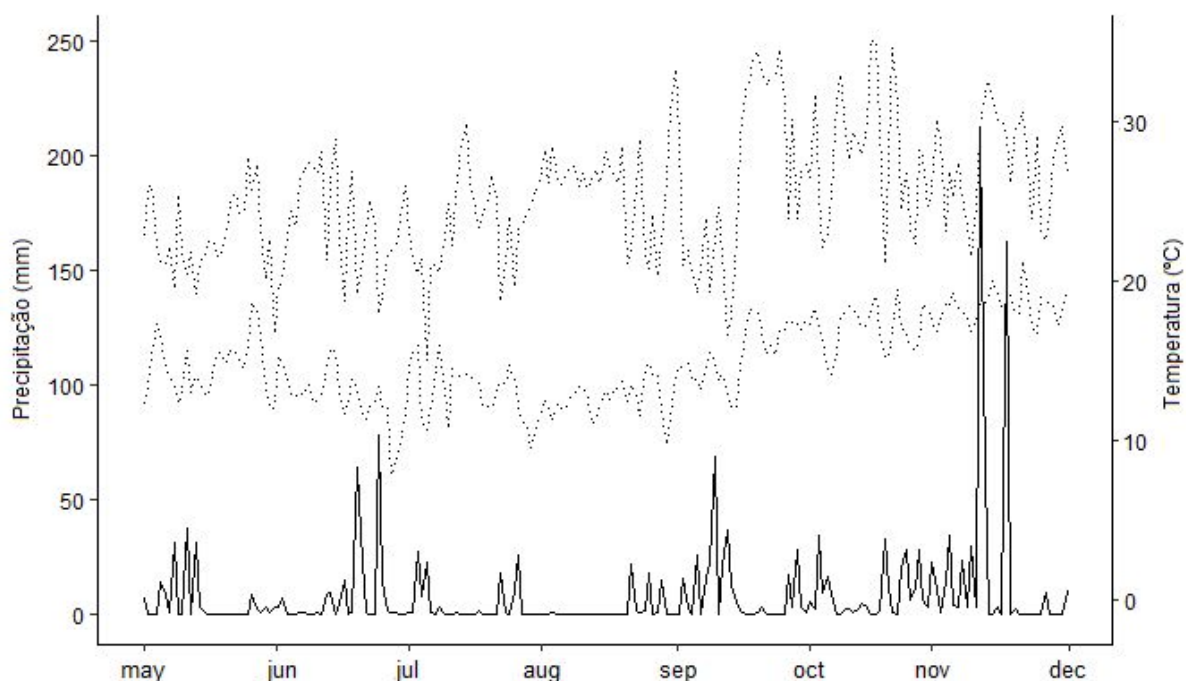


Figura 2: Variação na temperatura mínima e máxima (linhas pontilhadas inferior e superior, respectivamente) e precipitação (linha contínua) na região de Paranapiacaba no período de estudo, entre os meses de maio e novembro de 2015. (Adaptado de Almeida-Silva, 2016)

### *Levantamento de hemoparasitas*

Os animais capturados em campo foram transportados para o laboratório em sacos plásticos e então anestesiados e eutanasiados com aplicação de pomada xilocaína 5% em regiões de ampla vascularização (e.g. região gular, cloacal ou bucal). Foram coletadas imediatamente após eutanásia amostras de sangue através de punção cardíaca (após assepsia da área utilizando algodão e etanol 70%) e amostras de fígado. Após coleta, as amostras de sangue foram inoculadas em tubos Vacutainer contendo meio bifásico formado por uma fase sólida base de 15% de sangue de ovelha desfibrinado que é recoberta por meio L.I.T. líquido, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 20% em temperatura ambiente (25–30°C) (Marcili et al., 2013). Posteriormente, amostras do material inoculado nos tubos foram tomadas para elaborar lâminas por esfregaço, para inspeção por microscópio de luz da presença ou não de tripanossomas e microfilárias.

As amostras de fígado foram mantidas congeladas em ultrafreezer e foram posteriormente utilizadas para inspeção de parasitas através de ferramentas moleculares. O material genético foi extraído das amostras teciduais utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Trata-se de um método rápido de extração, que dispensa o uso do fenol-clorofórmio e a precipitação alcoólica, o que permite minimizar a manipulação e que fornece DNA relativamente livre de inibidores para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma vez extraído, o material foi submetido a etapa de purificação, a partir dos materiais, reagentes e informações presentes no GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O processo de purificação permite a extração eficiente de *primers*, nucleotídeos, enzimas, sais e outras impurezas, tornando a amostra disponível para diversas aplicações. As amostras resultantes foram preparadas em volume de 20µL juntamente com os *primers* (iniciador e reverso), desoxinucleotídeos (DNTPs), enzima DNA-polimerase (Taq) e água estéril, sendo, a seguir, submetidas a uma bateria de ensaios de PCR, buscando identificar bactérias do gênero *Rickettsia* e os eucariontes *Trypanosoma*, *Hepatozoon* e Filarioidea. Controles positivos e negativos acompanharam as amostras em cada um dos ensaios, realizados num termociclador. As sequências de

primers, os genes para os quais foram desenhados e a referência para os programas de amplificação utilizados são apresentadas na Tabela 1. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (à 150V em 30 minutos), para posterior observação e documentação com o auxílio de fotodocumentador e câmera digital.

Para detecção dos parasitas sanguíneos, as amostras foram submetidos a um ensaio por PCR cada, com exceção de *Trypanosoma*. Este passou por dois testes, nos quais foram amplificadas duas regiões distintas do genoma. No primeiro teste, foi amplificada a região referente ao gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato, que é amplamente utilizada na avaliação destes parasitas (Hamilton et al., 2004). O segundo teste foi referente ao gene que codifica a enzima quitinase em tripanossomatídeos, ainda não teve sua sequência publicada pelos autores.

#### *Análises estatísticas*

Para obter um panorama geral dos resultados encontrados, testamos se as frequências de positivos se encontravam fora do esperado de acordo com diferentes fatores: o geográfico (para verificar se os espécimes de algum dos riachos se encontram mais propensos à infecção), o temporal (testando se a frequência de hemoparasitoses seria maior na estação seca ou úmida – as quais foram divididas com o início da primavera), o ecológico (buscando se existe maior propensão à infecção em animais que compartilham determinado hábito de vida – para os quais foram categorizados de acordo com Haddad et al., 2013) e o filogenético (para testar se a frequência de ocorrência das hemoparasitoses identificadas difere entre as famílias dos hospedeiros). Este primeiro levantamento foi realizado através de testes de chi quadrado por aderência, uma metodologia que compara se a diferença entre resultados observados e esperados é grande o suficiente para ser considerada como além do acaso.

A atuação de fatores ecológicos e filogenéticos da maneira como foi sugerida pode sofrer efeito de características morfológicas intrínsecas às espécies estudadas. Por exemplo, se as espécies que compõem determinada família apresentarem maior comprimento rostro cloacal (CRC), podem estar expostas com maior frequência a

insetos vetores. Além disso, sabe-se que o tamanho (CRC) e a massa do indivíduo podem ser determinantes na incidência e riqueza de parasitas (e.g. Poulin, 1997), inclusive em anfíbios (e.g. Campião et al., 2015). Por esse motivo, a ocorrência e a quantidade de espécies de hemoparasitas foi testada em função (ao mesmo tempo) do tamanho (CRC) dos anuros coletados e dos agrupamentos supracitados, através de análises de covariância (ANCOVA) realizadas no software R seguindo o modelo abaixo:

$$\text{Hemoparasitas} = \text{Fator} * (\text{Massa} + \text{Tamanho})$$

No qual “Hemoparasitas” representa tanto ocorrência quanto riqueza, “Fator” descreve os níveis de agrupamento citados e os valores de massa e comprimento rostro-cloacal (CRC) são as variáveis alométricas. Para isso, o CRC dos animais coletados foi tomado (com o auxílio de um paquímetro) e a massa dos indivíduos foi estimada a partir das equações de regressão sugeridas por Santini et al. (2017).

## RESULTADOS

Um total de 93 indivíduos de distintas espécies de anuros coletados na região do PNMNP foram estudados, somando as duas metodologias de detecção (teste parasitológico e molecular). Destes, 87 apresentaram resultados positivos para infecções com ao menos um dos quatro grupos de hemoparasitas testados. Os testes moleculares mostraram-se eficientes para todos os hemoparasitas avaliados, de modo que complementaram os resultados oriundos do teste sorológico para os protozoários extracelulares (*Trypanosoma* e Filarioidea). Dentre os 87 indivíduos parasitados, 71 foram positivos para *Trypanosoma* e 65 para *Rickettsia*, o que demonstra grande incidência nos anuros inspecionados. No total, constatamos ainda 15 indivíduos positivos para *Hepatozoon* e 5 para nematódeos do táxon Filarioidea. Como essas quantidades são relativamente baixas para estes dois últimos grupos de organismos, os testes estatísticos foram realizados considerando as frequências de infecção por *Trypanosoma*, *Rickettsia* ou a riqueza total de hemoparasitas. O panorama geral dos resultados é apresentado na Tabela 2.

Dentre os fatores testados, os resultados apontam que as frequências de positivos para os hemoparasitas estudados diferiram do esperado entre as famílias, em relação à ocorrência ( $\chi^2 = 2340,97$ ; g.l. = 6;  $p \leq 0,01$ ). Neste caso, a ocorrência de Craugastoridae, Hylidae, Hylodidae e Leptodactylidae como hospedeiros foi muito superior ao cenário “ao acaso”. O mesmo foi observado em relação à ocorrência de *Trypanosoma* ( $\chi^2 = 1299,5$ ; g.l. = 6;  $p \leq 0,01$ ) e *Rickettsia* ( $\chi^2 = 1479,66$ ; g.l. = 6;  $p \leq 0,01$ ), com exceção da ocorrência de *Rickettsia* em Leptodactylidae, que foi similar ao esperado aleatoriamente. Padrão similar foi encontrado entre os riachos em relação à ocorrência de qualquer hemoparasita ( $\chi^2 = 916,2$ ; g.l. = 3;  $p \leq 0,01$ ), ocorrência de *Rickettsia* ( $\chi^2 = 756,42$ ; g.l. = 3;  $p \leq 0,01$ ) e *Trypanosoma* ( $\chi^2 = 611,17$ ; g.l. = 3;  $p \leq 0,01$ ). Nas três análises, os positivos encontrados no riacho Caixa do Gustavo não correspondem ao esperado, dada a quantidade amostrada.

Os valores encontrados para estes fatores mostram-se consistentemente diferentes daquelas que ocorreriam ao acaso, o que seria atingido caso não houvesse nenhuma divergência importante entre as categorias. Isso sugere a atuação de dois efeitos sobre o panorama encontrado: o geográfico e o filogenético, respectivamente. O papel destes efeitos não variou de acordo com medidas alométricas (massa e CRC), alguns dos mais tradicionais preditores para presença ou ausência de parasitas (Tabelas 3 e 6). Mesmo analisando a incidência das parasitoses uma à uma para hábitos de vida, famílias, espécies e localidades, não houve variação alométrica para as ocorrências de hemoparasitoses (Tabelas 3 à 6).

## DISCUSSÃO

O uso integrado das metodologias de microscopia e técnicas moleculares para detecção de tripanossomos e microfilárias nos forneceu maior nível de detalhamento para o grau de infecção em cada espécime. Os dois casos positivos (100%) para Filarioidea por teste microscópico deram negativo em análise por PCR. Como o primer escolhido foi efetivo em outros estudos (e.g. Dailey, 2009; Tranbenkova & Spiridonov, 2017), acreditamos que estas diferenças podem estar relacionadas à problemas com a qualidade da amostra, quantidade de parasitas

abaixo da sensibilidade da análise molecular ou ambos. Já no caso dos tripanossomos, situação oposta foi observada devido a dois resultados moleculares positivos nos quais não se pôde observar parasitas em lâmina, provavelmente devido à baixa quantidade desses organismos nas amostras. Apesar de ter sido encontrada certa discordância entre as metodologias de detecção, o emprego de ambas teve um interessante caráter complementar, permitindo maior amplitude de análise.

Por suas dimensões continentais e configurar como o país mais biodiverso do mundo para anuros (Segalla et al., 2014; Frost, 2018), o Brasil apresenta consideráveis diferenças latitudinais e entre biomas no padrão de distribuição de espécies (Toledo & Batista, 2012). Diferença similar à encontrada nos padrões de distribuição de hospedeiros anuros é apresentada por linhagens de parasitas (Ferreira et al., 2015), o que sugere a necessidade de atenção à escala geográfica na realização de comparações. Estudos como o aqui realizado ainda são infrequentes em áreas de Mata Atlântica, o que dificulta a comparação entre taxas de ocorrência.

Nossos resultados demonstram alta prevalência de hemoparasitas (~ 93%), principalmente dos gêneros *Trypanosoma* e *Rickettsia*, em uma localidade de floresta tropical, a qual apresenta grande incidência de chuvas durante todo o ano. Considerando este panorama, podemos supor que a ocorrência de *Trypanosoma* encontrada foi relativamente alta (~80% de indivíduos positivos), comparativamente a outros estudos com taxas que variam de 15,6% à 44,4% de indivíduos parasitados (e.g. Woo & Bogart 1984; Werner et al., 1988). É válido ressaltar que estes estudos foram realizados em florestas temperadas, muito distintas da região aqui estudada, tanto no que diz respeito a fatores abióticos, como temperatura média anual e índice de pluviosidade, quanto a fatores bióticos, como riqueza e diversidade de espécies. Comparando os resultados obtidos com estudos realizados em território nacional, índice distinto do nosso foi encontrado por Ferreira et al. (2015), no qual 7% dos anuros submetidos a testes moleculares apresentaram resultados positivos para *Trypanosoma*. Paralelamente, 20% de indivíduos positivos para tripanossomos foram encontrados em outro estudo envolvendo anuros da região centro-sul do Brasil (Leal et al., 2009). É importante ressaltar que ambos os trabalhos foram



desenvolvidos no bioma Cerrado ou em regiões de transição Cerrado-Mata Atlântica, as quais apresentam características climáticas distintas do PNMNP, como maior temperatura média anual e menor índice pluviométrico. Na Mata Atlântica, os poucos trabalhos realizados indicam maiores índices de infecção dos aqui encontrados, além de grande diversidade de linhagens de tripanossomos na região (Ferreira et al., 2008). Índice de 45% de indivíduos positivos foi encontrado por Ferreira et al. (2007) em regiões da Mata Atlântica, Amazônia e Pantanal. Especificamente na Mata Atlântica, 30% dos anuros avaliados deram positivo em testes parasitológicos e moleculares. Apesar da grande diferença na prevalência, assim como neste trabalho, foram submetidos a testes animais dos gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hylodes*, *Physalaemus* e *Scinax*, todos coletados no estado de São Paulo. A maior parte dos indivíduos infectados foram coletados durante as estações chuvosas, quando há maior índice de insetos vetores e exposição à ambientes aquáticos, onde estão sujeitos a serem parasitados por sanguessugas.

A incidência de infecções por *Rickettsia* (72% dos espécimes) foi consideravelmente mais alta do que em outros estudos (Barta & Dessler, 1984; Dessler, 2001; Roldan, 2015). Barta & Dessler (1984), ao avaliarem 329 anuros, encontraram somente 3,5% de indivíduos infectados. No entanto, o estudo foi realizado em uma floresta boreal da região de Ontário (Canadá). Dessler (2001) encontrou uma taxa de 9,7% de indivíduos positivos em uma região de floresta tropical na Costa Rica. Neste mesmo estudo, 23% dos indivíduos também apresentaram infecções por protozoários do gênero *Hepatozoon*, demonstrando pequena divergência dos 16% de indivíduos positivos deste trabalho. Infecções por microfilarídeos somaram aproximadamente 13% dos indivíduos, em oposição aos 5,4% encontrados nos anfíbios do PNMNP. Anuros da família Leptodactylidae da região do Pantanal apresentaram 29% de espécimes positivos para *Hepatozoon* e 83% para *Trypanosoma* (Leal, 2012), demonstrando congruência com os resultados aqui obtidos.

Considerando a diversidade de espécies reofilicas encontradas e o pico de reprodução associado ao inverno, quando há menos chuvas e mais sítios de vocalização (Narvaes & Rodrigues, 2005), era de se esperar modulação sazonal nos índices de parasitoses. No entanto, tal resultado não foi encontrado, talvez pela

modulação oposta, oriunda da relação positiva entre maior densidade de corpos d'água em períodos de chuva e transmissão de parasitas por vetores (Ruggeri et al., 2018). A transmissão destes parasitas sanguíneos se dá através de vetores invertebrados, como ácaros, pulgas, piolhos, carrapatos, sanguessugas e mosquitos hematófagos (Parola et al., 2005; Sato, 2015). Roldan (2015) reforça o papel de ácaros como ectoparasitas da herpetofauna, estando associados a uma série de doenças em anfíbios de diferentes regiões de São Paulo, inclusive parasitoses causadas por indivíduos dos gêneros *Rickettsia* e *Hepatozoon*. Paralelamente, tripanossomos e outros parasitas de anuros são transmitidos por sanguessugas e mosquitos hematófagos (Hamilton et al., 2005; Simpson et al., 2006), como os do táxon Phlebotominae (Ferreira et al., 2008). É possível que a relação observada entre incidência de parasitas e região geográfica se dê por uma maior densidade de vetores infectados em determinados riachos em relação a outros, hipótese que seria fortalecida com um levantamento dos vetores carregando estes parasitas.

Diversas espécies e linhagens destes grupos de hemoparasitas foram identificadas parasitando distintas famílias de anuros em diferentes localidades (e.g. Smith, 1996; Ferreira et al., 2008). Apesar da maior parte das investigações com hemoparasitas de anfíbios terem sido feitas em localidades distintas do fragmento de Mata Atlântica aqui avaliado (e.g. Barta & Dessler 1984; Dessler 2001; Werner et al., 1988), muitas das espécies de anuros destes trabalhos pertencem a famílias presentes no PNMNP, o que permitiria que relações fossem feitas quanto à prevalência de hemoparasitas e o modo de vida dos membros destes táxons. De modo geral, o hábito de vida das espécies encontradas é homogêneo em cada família (Haddad et al., 2013), variando pouco somente entre os membros de Brachycephalidae e Bufonidae, nos quais há espécies arborícolas e terrestres, ou criptozóicas. Nossos resultados não apontam para uma modulação nas taxas de infecções entre indivíduos de hábitos ecológicos distintos (quando consideramos a riqueza de hemoparasitas por espécime), o que poderia estar relacionado à prevalência de infecções em cada uma das famílias. Apesar da massa e CRC serem variáveis entre os membros das famílias encontradas, não há efeito alométrico, nem tampouco ecológico, modulando a ocorrência de hemoparasitas nesta localidade, ao

contrário do que sugerem outros trabalhos (e.g. Brooks et al., 2006; Hamann et al., 2006; Møller et al., 2013).

A especificidade na relação parasita-hospedeiro (Brooks et al., 2006; Ferreira et al., 2007) demonstra que diferentes linhagens de parasitas devem ser encontradas em localidades e famílias distintas, o que pode explicar tanto o efeito geográfico quanto o filogenético na prevalência de parasitas sanguíneos. É possível que determinadas linhagens parasitárias sejam mais prevalentes na região do PNMNP, porém sem distribuição uniforme entre os riachos. Linhagens com maior densidade populacional na região podem ser responsáveis por maiores taxas de parasitismo nas espécies das famílias mais susceptíveis. O sequenciamento dos fragmentos encontrados na análise molecular deve trazer importante contribuição sobre a diversidade de espécies e linhagens de parasitas dentro de cada um dos grupos taxonômicos analisados. Considerando a ampla distribuição geográfica e prevalência entre diferentes hospedeiros (Smith, 1996; Barrett et al., 2003), inclusive em estudo realizado em florestas tropicais brasileiras (Ferreira et al., 2007), é possível que encontremos espécies distintas, inclusive espécies novas.

Sabe-se que diversas espécies parasitas dos grupos encontrados não são patogênicas (Klaphake, 2009). No entanto, algumas estão associadas à doenças em uma ampla variedade de vertebrados (Barrett et al., 2003; Kiel et al., 2008; Smith, 1996), inclusive em anfíbios. Das mais de 60 espécies de *Trypanosoma* documentadas em anuros, algumas destas foram relacionadas à morte em diferentes espécies, podendo se acumular em rins, causar eritemas, hemorragia, inchaço de glândulas linfáticas, anemia e esplenomegalia (Klaphake, 2009). Em cativeiro, muitas destas infecções estão relacionadas a alimentação por alimentos vivos. Níveis altos de parasitemia por espécies de Nematódeos no fígado, olho, epiderme, corrente sanguínea e pulmões de anuros foram associados a problemas de crescimento, aptidão e sobrevivência, podendo levar indivíduos a morte (Klaphake, 2009).

No âmbito natural, eventos históricos de mortalidade em massa de diferentes populações de anfíbios foram associados ao fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Carvalho et al., 2017). Apesar do PNMNP fazer parte da suposta área de ocorrência do fungo (Carnaval et al., 2006) e deste ter sido encontrado associado a anuros de

regiões da Mata Atlântica próximas à localidade de coleta (Ruggeri et al., 2015), um trabalho recente com os mesmos indivíduos aqui analisados não acusou a presença do Bd em nenhuma amostra nos quatro riachos do PNMNP (Almeida-Silva, 2016). Neste mesmo trabalho, Almeida-Silva (2016) encontrou diversas lesões nos rins e fígados destes indivíduos. Sabe-se que poluentes de origem antrópica, como pesticidas e metais pesados, podem causar danos nestes órgãos (Loumbourdis, 2005; Cooley et al., 2000), além de problemas de imunidade que comprometem a capacidade de defesa contra parasitas em anuros (Christin et al., 2003). Por estar localizado próximo ao Polo Industrial de Cubatão, região conhecida mundialmente pelo impacto ambiental devido a emissão de poluentes nas décadas de 70 e 80 (Alonso & Godinho, 1992), a prevalência de hemoparasitas e de lesões renais e hepáticas encontradas em anfíbios do PNMNP pode estar associada à concentração de poluentes industriais. O processo de bioacumulação de poluentes em plantas da região (Gutberlet, 1996; Klumpp et al., 1998) fortalece a hipótese de que estes fatores ainda estão atuantes sobre a biodiversidade no local.

Ainda que o Bd tenha sido majoritariamente associado a eventos de diminuição populacional em anfíbios, nossos resultados sugerem que outros fatores podem estar envolvidos na problemática, como hemoparasitas patogênicos, possivelmente associados à diversidade de vetores e atuação de poluentes na região. Diagnósticos mais detalhados devem ser feitos a fim de se levantar com fidelidade os fatores envolvidos nos eventos de mortalidade de anfíbios, principalmente em regiões nas quais o fungo não foi encontrado. Estudos posteriores deverão elucidar a influência destes parasitas no desenvolvimento e capacidade reprodutiva destes anfíbios, a fim de auxiliar no difícil trabalho de conservação do grupo. Como parte destes próximos passos, espera-se sequenciar parte das amostras a fim de estabelecer com clareza a diversidade de hemoparasitas, principalmente dos gêneros *Trypanosoma* e *Rickettsia*, que apresentaram grande incidência nos indivíduos analisados.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Aliny P. et al. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 2012.
- ALMEIDA-SILVA, Diego. **Estrutura e aspectos clínicos de uma taxocenose pós-declínio: anuros da Mata Atlântica do sudeste do Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do ABC.
- ALONSO, Claudio D.; GODINHO, Roberto. A evolução da qualidade do ar em Cubatão. **Química Nova**, v. 15, n. 02, 1992.
- BAKER, David G. (Ed.). **Flynn's parasites of laboratory animals**. John Wiley & Sons, 2008.
- BARNOSKY, Anthony D. et al. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived?. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51-57, 2011.
- BARRETT, Michael P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BARTA, John R.; DESSER, Sherwin S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 3, p. 180-189, 1984.
- BERGER, Lee et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036, 1998.
- BROOKS, Daniel R. et al. Ecological fitting as a determinant of the community structure of platyhelminth parasites of anurans. **Ecology**, v. 87, n. sp7, 2006.
- BURROWES, Patricia A.; JOGLAR, Rafael L.; GREEN, David E. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. **Herpetologica**, v. 60, n. 2, p. 141-154, 2004.
- CAMPIÃO, Karla Magalhães et al. How many parasites species a frog might have? Determinants of parasite diversity in South American anurans. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140577, 2015.
- CARVALHO, Tamilie; BECKER, C. Guilherme; TOLEDO, Luís Felipe. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proc. R. Soc. B**, v. 284, n. 1848, p. 20162254, 2017.
- CATENAZZI, Alessandro et al. *Batrachochytrium dendrobatidis* and the collapse of anuran species richness and abundance in the upper Manu National Park, southeastern Peru. **Conservation Biology**, v. 25, n. 2, p. 382-391, 2011.
- CEBALLOS, Gerardo et al. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Science advances**, v. 1, n. 5, p. e1400253, 2015.

CHRISTIN, Marie-Soleil et al. 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.

COOLEY, H. M.; EVANS, R. E.; KLAVERKAMP, J. F. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 495-515, 2000.

CZECHURA, GREGORY V.; INGRAM, GLEN J. *Taudactylus diurnus* and the case of the disappearing frogs. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 29, n. 2, p. 361-365, 1990.

DA SILVA, F. Maia et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-561, 2004.

DAILEY, Murray D. A new species of *Parafilaroides* (Nematoda: Filaroididae) in three species of fur seals (Carnivora: Otariidae) from the southern hemisphere. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 156-159, 2009.

DAVIS, A. K.; STERRETT, S. C. Prevalence of haemogregarine parasites in three freshwater turtle species in a population in northeast Georgia, USA. **International journal of zoological Research**, v. 7, n. 2, p. 156, 2011.

DE QUEIROZ CARNAVAL, Ana Carolina Oliveira et al. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **EcoHealth**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 2006.

DE SANTO ANDRÉ, Prefeitura do Município. Atlas do Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba. **Annablume, São Paulo**, 2008.

DESSER, Sherwin 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. 152-160, 2001.

DOBSON, Andrew. Population dynamics of pathogens with multiple host species. **the american naturalist**, v. 164, n. S5, p. S64-S78, 2004.

DOBSON, Andy et al. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. Supplement 1, p. 11482-11489, 2008.

DU PREEZ, Louis H.; CARRUTHERS, Vincent; BURGER, Marius. **A complete guide to the frogs of southern Africa**. Struik Nature, 2009.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. *Biology of Amphibians* –John Hopkins University Press. **Baltimore, London**, 1994.

EDMAN, John D.; KALE, Herbert W. Host behavior: its influence on the feeding success of mosquitoes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 64, n. 2, p. 513-516, 1971.

ERKENSWICK, Gideon A. et al. Temporal and demographic blood parasite dynamics in two free-ranging neotropical primates. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 2, p. 59-68, 2017.

FERREIRA, Juliana IG da S. et al. Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. **Systematic parasitology**, v. 91, n. 1, p. 63-70, 2015.

FERREIRA, Liliane Garcia. **A gestão ambiental do pólo industrial de Cubatão a partir do Programa de Controle da Poluição iniciado em 1983: atores, instrumentos e indicadores**. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.

FERREIRA, R. C. et al. 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.

FERREIRA, R C. et al. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 427-435, 2008.

FROST, Darrel R. 2018. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (04/25/2018). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA

GRÜNDLER, Michael C. et al. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 97, n. 3, p. 173-184, 2012.

GULLAND, F. M. D. The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. **Ecology of infectious diseases in natural populations**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 20-51, 1995.

GUTBERLET, Jutta. **Cubatão: desenvolvimento, exclusão social, degradação ambiental**. Ed. da Univ. de São Paulo-EDUSP, 1996.

HADDAD, Célio FB. **Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. Anolis Books, 2013.

HALLAM, Anthony; WIGNALL, Paul B. **Mass extinctions and their aftermath**. Oxford University Press, UK, 1997.

HAMANN, Monika; GONZÁLEZ, Cynthia; KEHR, Arturo. Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 4, p. 294-299, 2006.

HAMILTON, Patrick B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393-1404, 2004.

HAMILTON, P. B. et al. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International journal for parasitology**, v. 35, n. 4, p. 431-443, 2005.

HEYER, W. Ronald et al. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. **Biotropica**, p. 230-235, 1988.

HOOPER, David U.; VITOUSEK, Peter M. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1302-1305, 1997.

HOOPER, David U. et al. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 105-108, 2012.

JOHNSON, Pieter TJ et al. Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 230, 2013.

JOHNSON, Pieter TJ; HOVERMAN, Jason T. Parasite diversity and coinfection determine pathogen infection success and host fitness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 9006-9011, 2012.

KEESING, Felicia et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647-652, 2010.

KIEL, Johnathan L. et al. Viral association with the elusive rickettsia of viper plague from Ghana, West Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 318-321, 2008.

KLAPHAKE, Eric. Bacterial and parasitic diseases of amphibians. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 597-608, 2009.

KLUMPP, A. et al. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic rain forest near Cubatão, Brazil. **Chemosphere**, v. 36, n. 4-5, p. 989-994, 1998.

KNAPP, Roland A.; MORGAN, Jess AT. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. **Copeia**, v. 2006, n. 2, p. 188-197, 2006.

LABRUNA, Marcelo B. et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.



LEAL, Denise DM et al. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States-Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 199-206, 2009.

LEAL, Denise Dutra Menezes. **Investigação de hemoparasitas em anfíbios anuros do gênero *Leptodactylus***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2012.

LIPS, Karen R. et al. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3165-3170, 2006.

LOUMBOURDIS, Nikolaos S. Hepatotoxic and nephrotoxic effects of cadmium in the frog *Rana ridibunda*. **Archives of toxicology**, v. 79, n. 8, p. 434-440, 2005.

LUTZ, Holly L. et al. Correction: Parasite Prevalence Corresponds to Host Life History in a Diverse Assemblage of Afrotropical Birds and Haemosporidian Parasites. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128851, 2015.

MANDEL, Alex et al. **QGIS 2 Cookbook**. Packt Publishing Ltd, 2016.

MARCILI, Arlei et al. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1071-1076, 2013.

MCCALLUM, Hamish; DOBSON, Andy. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. **Trends in ecology & evolution**, v. 10, n. 5, p. 190-194, 1995.

MCCAULEY, Douglas J. et al. Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. **Science**, v. 347, n. 6219, p. 1255641, 2015.

MØLLER, Anders Pape et al. Assessing the effects of climate on host-parasite interactions: a comparative study of European birds and their parasites. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82886, 2013.

MURRAY, Kris A.; SKERRATT, Lee F. Predicting wild hosts for amphibian chytridiomycosis: integrating host life-history traits with pathogen environmental requirements. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 18, n. 1, p. 200-224, 2012.

NARVAES, Patrícia; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Visual communication, reproductive behavior, and home range of *Hylodes dactylocinus* (Anura, Leptodactylidae). **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 147-158, 2005.

NETHERLANDS, Edward C. et al. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 1, p. 135-141, 2015.

OSTFELD, Richard S.; KEESING, Felicia. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 722-728, 2000.

OSTFELD, Richard S.; KEESING, Felicia. Effects of host diversity on infectious disease. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, 2012.

PAROLA, Philippe; DAVOUST, Bernard; RAOULT, Didier. Tick-and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary research**, v. 36, n. 3, p. 469-492, 2005.

POULIN, Robert. **Evolutionary ecology of parasites**. Princeton university press, 2011.

PREUSS, Jackson Fabio et al. Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. **Studies on neotropical fauna and environment**, v. 51, n. 1, p. 68-77, 2016.

QUILLFELDT, Petra et al. Prevalence of blood parasites in seabirds-a review. **Frontiers in zoology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2011.

RACHOWICZ, Lara J.; VREDENBURG, Vance T. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. **Diseases of aquatic organisms**, v. 61, n. 1-2, p. 75-83, 2004.

RIGAUD, Thierry; PERROT-MINNOT, Marie-Jeanne; BROWN, Mark JF. Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1701, p. 3693-3702, 2010.

ROLDAN, Jairo Alfonso Mendoza. **Estudos morfológicos e investigação da presença de bactérias e protozoários em ácaros (Trombidiformes), parasitos de répteis e anfíbios, no estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RUGGERI, Joice et al. Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic forest. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0130554, 2015.

RUGGERI, Joice et al. Amphibian chytrid infection is influenced by rainfall seasonality and water availability. **Diseases of aquatic organisms**, v. 127, n. 2, p. 107-115, 2018.

SANTINI, L. et al. Length–Mass allometries in Amphibians. **Integrative Zoology**, 2017.

SANTO ANDRÉ (Município). Prefeitura do Município de Santo André. 2013. Prefeitura Municipal de Santo André. Disponível em: <<http://www2.santoandre.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 de setembro de 2017

SÃO PAULO (Estado). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.ibot.sp.gov.br/instituto/unidades/paranapiacaba.php>>. Acesso em: 20 de setembro de 2017.

SATO, Lyslaine Hatsue. **Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SAVAGE, Amy F. et al. Blood parasites in birds from Madagascar. **Journal of wildlife diseases**, v. 45, n. 4, p. 907-920, 2009.

SCHMIDT, Kenneth A.; OSTFELD, Richard S. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. **Ecology**, v. 82, n. 3, p. 609-619, 2001.

SEGALLA, Magno Vicente et al. Brazilian amphibians—List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 37-48, 2014.

SHERMAN, Cynthia Kagarise; MORTON, Martin L. Population declines of Yosemite toads in the eastern Sierra Nevada of California. **Journal of Herpetology**, p. 186-198, 1993.

SIMPSON, Alastair GB; STEVENS, Jamie R.; LUKEŠ, Julius. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

SKERRATT, Lee Francis et al. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. **EcoHealth**, v. 4, n. 2, p. 125, 2007.

SMITH, Todd G. The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). **The Journal of parasitology**, p. 565-585, 1996.

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

TER BRAAK, Cajo JF. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1167-1179, 1986.

TER BRAAK, Cajo JF; PRENTICE, I. Colin. A theory of gradient analysis. **Advances in ecological research**, v. 18, p. 271-317, 1988.

TO, Kelvin KW et al. A novel *Dirofilaria* species causing human and canine infections in Hong Kong. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3534-3541, 2012.

TOLEDO, Luis Felipe; BATISTA, Rômulo Fernandes. Integrative study of Brazilian anurans: geographic distribution, size, environment, taxonomy, and conservation. **Biotropica**, v. 44, n. 6, p. 785-792, 2012.

TRANBENKOVA, Nina A.; SPIRIDONOV, Sergei E. Molecular characterization of *Baylisascaris devosi* Sprent, 1952 (Ascaridoidea, Nematoda) from Kamchatka sables. **Helminthologia**, v. 54, n. 2, p. 105-112, 2017.

VAN RIPER, Charles et al. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. **Ecological monographs**, v. 56, n. 4, p. 327-344, 1986.

Verdade, V. Kruth et al.. 2011. Decline of Amphibians in Brazil, p. 85-127. In: Heatwole H.; Barrio-Amorós L. & Wilkinson J. (Eds). *Amphibian Biology*. Sydney, **Surrey Beatty & Sons**, vol. 9, 296p

VOYLES, Jamie et al. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. **Diseases of aquatic organisms**, v. 77, n. 2, p. 113-118, 2007.

WERNER, J. Kirwin; DAVIS, Jeffrey S.; SLAGHT, Karen S. Trypanosomes of *Bufo americanus* from northern Michigan. **Journal of wildlife diseases**, v. 24, n. 4, p. 647-649, 1988.

WEYGOLDT, Peter. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations?. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 24, n. 4, p. 249-255, 1989.

WOO, Patrick TK; BOGART, Jim P. *Trypanosoma* spp.(Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distributions and prevalences. **Canadian journal of zoology**, v. 62, n. 5, p. 820-824, 1984.

WOOLHOUSE, Mark EJ. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 10, p. s3-s7, 2002.

WOOLHOUSE, Mark EJ; GOWTAGE-SEQUERIA, Sonya. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842, 2005.

## TABELAS

Tabela 1: *Primers* utilizados neste trabalho, indicando o hemoparasita e o gene ou região de interesse para identificação. Os programas de amplificação específicos para cada caso estão disponíveis nas referências apontadas.

Alvo		Sequência do primer (5'—3')	Referência
Hemoparasita	Gene/Região		
<i>Rickettsia</i>	CS-62F	GCAAGTATCGGTGAGGAT GTAAT	Labruna et al., 2004
	CS-462R	GCTTCCTTAAAATTCAATAA ATCAGGAT	Labruna et al., 2004
<i>Trypanosoma</i>	Quit224F	GTTCCACTACGAGGCCTTC TTCAA	Dados não publicados
	Quit1182R	CAGATCATTATCCCAGACA AGTT	Dados não publicados
	GAP3F	GTGAAGGCGCAGCGCAAC	Hamilton et al. 2004
	GAP5R	CCGAGGATGYCCTTCATG	Hamilton et al. 2004
<i>Hepatozoon</i>	HEP1	CGCGAAATTACCCAATTCT A	Almeida et al., 2012
	HEP4	TAAGGTGCTGAAGGAGTC GTTTAT	Almeida et al., 2012
Filarioidea	COX1	GCTTTRTCTTTTTGGKTTAC TTTT	To et al., 2012

Tabela 2: Razão entre animais infectados com hemoparasitas (Rick. = *Rickettsia*, Tryp. = *Trypanosoma*, Hept. = *Hepatozoon* e Filr = Filarioidea) e totais para cada fator em cada nível (temporal, geográfico, ecológico e filogenético). Classificação segundo Frost (2018).

Nível	Fator	Hemoparasita			
		Rick.	Tryp.	Hept.	Filr.
Temporal	Estação seca	40/57	55/57	6/57	4/57
	Estação úmida	25/36	16/36	9/36	1/36
Geográfico	Água Fria	20/35	29/35	11/35	0/35
	Bica dos Namorados	14/19	11/19	0/19	2/19
	Caixa do Gustavo	10/12	9/12	1/12	0/12
	Pontinha	21/27	22/27	3/27	3/27
Ecológico	Arborícola	24/32	25/32	5/32	4/32
	Terrestre/Criptozóico	33/46	36/46	7/46	1/46
	Aquático/Semi-aquático	8/15	10/15	3/15	0/15
Filogenético	Brachycephalidae	33/47	38/47	8/47	1/47
	Bufonidae	7/8	7/8	0/8	0/8
	Centrolenidae	4/7	5/7	1/7	0/7
	Craugastoridae	2/2	1/2	1/2	0/2
	Hylidae	11/12	9/12	2/12	4/12
	Hylodidae	8/15	10/15	3/15	0/15
	Leptodactylidae	0/2	1/2	0/2	0/2

Tabela 3: Resultado da análise ANCOVA dos dados de famílias, massa e CRC.

Fator	g.l.	MS	F	p valor
Massa	1	0,19	0,1856	0,318
CRC	1	0,10	0,1011	0,173
Família	6	7,62	1,2692	2,171
Massa x Família	6	0,91	0,1519	0,260
CRC x Família	4	0,25	0,0633	0,108
Res	74	43	0,5845	

Tabela 4: Resultado da análise ANCOVA dos dados de espécies, massa e CRC.

Fator	g.l.	MS	F	p valor
Massa	1	0,19	0,1856	0,320
CRC	1	0,10	0,1011	0,174
Família	15	11,52	0,7678	1,324
Massa x Família	9	2,02	0,2249	0,388
CRC x Família	8	4,86	0,6073	1,047
Res	58	33,64	0,5799	

Tabela 5: Resultado da análise ANCOVA dos dados de hábitos de vida, massa e CRC.

Fator	g.l.	MS	F	p valor
Massa	1	0,19	0,1856	0,318
CRC	1	0,10	0,1011	0,173
Família	3	2,73	0,9114	1,561
Massa x Família	2	0,35	0,1734	0,297
CRC x Família	2	0,49	0,2448	0,419
Res	83	48,47	0,5839	

Tabela 6: Resultados da análise ANCOVA dos dados de riachos, massa e CRC.

Fator	g.l.	MS	F	p valor
Massa	1	0,19	0,1856	0,330
CRC	1	0,10	0,1011	0,180
Família	3	1,89	0,6313	1,123
Massa x Família	3	1,08	0,3592	0,3592
CRC x Família	3	3,52	1,1732	2,087
Res	81	45,54	0,5623	