



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
ICTA - INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**

**TÁSSIO ALVES COELHO**

**HEMOPARASITOS DE ANFÍBIOS ANUROS DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**SANTARÉM - PA  
2020**

**TÁSSIO ALVES COELHO**

**HEMOPARASITOS DE ANFÍBIOS ANUROS DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade – PPGBEES, da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Ricardo Alexandre Kawashita-Ribeiro

**SANTARÉM-PA**  
**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

C672h Coêlho, Tássio Alves  
Hemoparasitos de anfíbios anuros da Amazônia Oriental./ Tássio Alves Coêlho. –  
Santarém, 2020.  
70 p. : il.  
Inclui bibliografias.

Orientador: Ricardo Alexandre Kawashita-Ribeiro  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade.

1. Hemoparasitos. 2. Anfíbios. 3. Leptodactylidae. I. Kawashita-Ribeiro, Ricardo Alexandre, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 597.8098115



Universidade Federal do Oeste do Pará  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE

ATA N° 13

Em acordo com o Regimento do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará, a dissertação de mestrado é julgada por uma Banca Avaliadora não presencial, constituída por três avaliadores titulares, sendo um deles obrigatoriamente externo ao curso, com título de doutor ou equivalente (Artigo 57 do referido regimento), e dois suplentes. O acadêmico é considerado aprovado quando ao menos dois membros avaliadores emitirem pareceres Aprovado ou Aprovado com Correções. Alternativamente, o acadêmico que comprovar o aceite ou a publicação de pelo menos um artigo resultante da sua dissertação, como primeiro autor, em co-autoria com orientador (ou orientador e co-orientador quando for o caso) em periódico avaliado pela CAPES, no sistema Periódico Qualis, nível A2 ou superior na área de biodiversidade, será dispensado da avaliação da dissertação, cabendo ao discente apenas a apresentação pública do trabalho (Artigo 59). O acadêmico que tiver sua dissertação aprovada deverá apresentá-la em sessão pública com duração entre 40 e 50 minutos, no prazo máximo de vínculo com o curso, ou seja, 24 meses desde o ingresso, a que se refere essa ata, de acordo com o Artigo 65 do Regimento do PPGBEES.

Assim, aos 31 (trinta e um) dias do mês de março do ano de 2020 (dois mil e vinte) foi gravada a apresentação de seminário público da dissertação de mestrado do aluno TÁSSIO ALVES COELHO, intitulada HEMOPARASITOS DE ANFÍBIOS ANUROS DA AMAZÔNIA ORIENTAL. Disponibilizada on-line na página Web do curso, no dia 01 de abril de 2020. Concluída a exposição, o orientador comunicou ao discente que a versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo de 30 dias; contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante nos formulários de avaliação da banca. A banca examinadora foi composta pelos examinadores professores doutores listados abaixo. Os pareceres assinados seguem em sequência.

RICARDO ALEXANDRE KAWASHITA RIBEIRO

Orientador

TÁSSIO ALVES COELHO

Discente

Para minhas filhas Catarina e Olívia,  
minha esposa Ana Karenn e a todos os  
meus familiares e amigos.

## AGRADECIMENTO

Quero agradecer a Deus pela realização de mais uma etapa em minha vida, pela saúde e disposição para enfrentar os desafios dessa jornada. Agradeço à minha esposa Ana Karenn da Silva Brito, pela dedicação, companheirismo, todo carinho e amor, além da compreensão quando necessitei estar ausente para realizar as atividades do mestrado, os trabalhos de consultoria que financiaram a pesquisa e concluir a dissertação. Agradeço as minhas filhas Catarina e Olívia pelo amor mais puro e genuíno, incentivo para seguir em frente e enfrentar os desafios da pesquisa. Agradeço aos meus pais, meus sogros, meus irmãos, pelo apoio e por acreditarem em todo o esforço para a conclusão da pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Alexandre Kawashita-Ribeiro, por me receber de forma acolhedora, confiante no meu trabalho e na minha dedicação. Ao Prof. Dr. Lincoln Lima Corrêa, pelas correções, sugestões, críticas e paciência.

Agradeço a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade (PPGBEES) pela oportunidade de fazer pesquisa na minha região, a Amazônia.

Aos amigos, padrinhos, afilhados, compadres, irmãos, Darlison Chagas de Souza e Claysiara dos Santos Sá, pela parceria, ensinamentos, críticas, sugestões e toda forma de ajuda na condução do trabalho.

Ao amigo, parceiro, irmão, Gregory Henrique Sarmiento Canhetti Postigo, por estarmos juntos nesses 17 anos de amizade, nesses quase 10 anos de consultoria e pela grande ajuda nas coletas de campo para a dissertação.

Agradeço a Karina Barbosa, Prof. Hipócrates de Menezes Chalkidis e ao Ronierison Santos, todos da Faculdade da Amazônia (UNAMA), por abrirem as portas do laboratório para as análises clínicas e pela disponibilidade em ajudar com o andamento do trabalho, muito obrigado.

Aos membros da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para exercer esta função, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar e contribuir com este trabalho.

O meu profundo e sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

Este estudo objetivou descrever o primeiro registro de *Trypanosoma* sp. em *Rhinella major* como um novo hospedeiro e analisar a relação entre hemoparasitos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de anfíbios anuros coletados na Amazônia oriental. Foram produzidos dois capítulos para o presente estudo. No primeiro capítulo, 44 espécimes de *Rhinella major* foram capturados na área de influência da hidrelétrica de Curua-una, em Santarém, oeste do Pará. Extensões sanguíneas foram confeccionadas e analisadas em microscópio óptico de luz, sendo encontrados quatro indivíduos parasitados com formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. com apenas um morfotipo encontrado. As taxas de prevalência, intensidade média e abundância média foram relativamente baixas quando comparadas com estudos similares. Neste estudo, identificamos *R. major* como novo hospedeiro vertebrado para *Trypanosoma* sp. no Brasil. No segundo capítulo, foram capturados 32 espécimes de *Leptodactylus macrosternum* e 20 exemplares de *Rhinella major* provenientes de ambiente antropizados no oeste do estado do Pará, Brasil. Após a pesquisa de hemoparasitos sob microscópio de luz óptico realizada e quantificada, foram realizados testes estatísticos com o intuito de verificar relações entre a abundância parasitária encontrada e modificações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados. As análises revelaram altos índices de prevalência parasitária, com registro de infecções mistas, com presença de até três hemoparasitos (*Trypanosoma* sp., *Hepatozoon* sp. e microfilárias). Os testes de Mann-Whitney não revelaram diferenças entre os parâmetros analisados. Foi possível detectar correlações entre *Trypanosoma* sp. e valores de hematócrito e *Hepatozoon* sp. com níveis de glicose. A regressão linear revelou que há uma relação negativa significativa ( $p < 0.05$ ) dos hemoparasitos *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp. com os níveis de hematócrito.

**Palavras-chave:** Hemoparasitos. Anfíbios. Leptodactylidae. Trypanosomatidae. Hemogregarinas.



## ABSTRACT

This study aimed to describe the first record of *Trypanosoma* sp. in *Rhinella major* as a new host and to analyze the relationship between hemoparasites and hematological and biochemical parameters of anuran amphibians collected in the eastern Amazon. Two chapters were produced for the present study. In the first chapter, 44 specimens of *Rhinella major* were captured in the area of influence of the Curua-una hydroelectric plant, in Santarém, west of Pará. *Trypanosoma* sp. with only one morphotype found. The prevalence, average intensity and average abundance rates were relatively low when compared with similar studies. In this study, we identified *R. major* as a new vertebrate host for *Trypanosoma* sp. in Brazil. In the second chapter, 32 specimens of *Leptodactylus macrosternum* and 20 specimens of *Rhinella major* were captured from anthropized environments in the western state of Pará, Brazil. After looking for and quantified hemoparasites under a light microscope, statistical tests were carried out in order to verify relationships between the abundance of parasites found and changes in the hematological and biochemical parameters analyzed. The analyzes revealed high rates of parasitic prevalence, with a record of mixed infections, with the presence of up to three hemoparasites (*Trypanosoma* sp., *Hepatozoon* sp. And microfilariae). Mann-Whitney tests did not reveal differences between the parameters analyzed. It was possible to detect correlations between *Trypanosoma* sp. and hematocrit and *Hepatozoon* sp. with glucose levels. Linear regression revealed that there is a significant negative relationship ( $p < 0.05$ ) for hemoparasites *Trypanosoma* sp. and *Hepatozoon* sp. with hematocrit levels.

**Key words:** Hemoparasites. Amphibians. Leptodactylidae. Trypanosomatidae. Hemogregarinas.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Morphometric localization of the regions of *Trypanosoma* sp. measured, with values in  $\mu\text{m}$ , of total body length with flagellum (**TL**), body length along the midline (**BL**), body width at the center of the nucleus (**BW**), length of the free flagellum (**F**), nucleus length (**NL**), nucleus width in the central portion (**NW**), distance from the center of the nucleus to the anterior extremity (**NA**), distance from the center of the nucleus to the posterior extremity (**NP**), distance from the center of the kinetoplast to the center of the nucleus (**KN**), kinetoplast length (**KL**), kinetoplast width (**KW**) and distance from the center of the kinetoplast to the posterior extremity (**KP**)..... 18
- Figura 2.** Dendrogram of morphometric similarity between valid species of trypanosomes for anurans and morphotype identified in *Rhinella major* collected in Curuá-Una, Santarém, Pará (Brazil)..... 19
- Figura 3.** *Rhinella major* collected on the right bank of the Curuá-Una River. A – Male in dorsal position; B – Male in ventral position; C – Female in dorsal position; D – Female in ventral position (bar 5 cm) ..... 20
- Figura 4.** Trypomastigote forms of *Trypanosoma* sp. observed in the blood circulation of *Rhinella major* (bar 10  $\mu\text{m}$ )..... 21
- Fig. 1** - Exemplos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (a esq.) e *Rhinella major* (a dir.)..... 37
- Fig. 2** – Regressão linear apresentando a influência de *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp. nos valores de hematócrito dos espécimes de *L. macrosternum*. ..... 38

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Prevalência, intensidade média e abundância média dos hemoparasitos infectando *Leptodactylus macrosternum* e *Rhinella major*..... 39
- Tabela 2** – Parâmetros analisados em *Leptodactylus macrosternum* coletados em Alter do Chão, na Amazônia oriental (Brasil). ..... 40
- Tabela 3** – Parâmetros analisados em *Rhinella major* coletados em Curua-una, na Amazônia oriental (Brasil)..... 41
- Tabela 4** – Índices de correlação de Spearman ( $r_s$ ) entre os hemoparasitos e os parâmetros sanguíneos analisados em *Leptodactylus macrosternum*. ..... 42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>1.1. Parasitos de sangue em anfíbios anuros na Amazônia oriental</b> .....	1
1.1.1. Qual é o problema da pesquisa? .....	1
1.1.2. Como a pesquisa foi realizada? .....	2
1.1.3. Qual a importância da pesquisa? .....	3
<b>2. CAPÍTULO 1</b> .....	5
<b>2.1. Abstract</b> .....	6
<b>2.2. Introduction</b> .....	7
<b>2.3. Materials and Methods</b> .....	8
<b>2.4. Results</b> .....	10
<b>2.5. Discussion</b> .....	11
<b>2.6. Acknowledgements</b> .....	13
<b>2.7. References</b> .....	14
<b>3. CAPÍTULO 2</b> .....	22
<b>3.1. Resumo</b> .....	23
<b>3.2. Introdução</b> .....	24
<b>3.3. Materiais e Métodos</b> .....	25
<b>3.4. Resultados</b> .....	27
<b>3.5. Discussão</b> .....	28
<b>3.6. Agradecimentos</b> .....	32
<b>3.7. Referências</b> .....	33
<b>ANEXOS</b> .....	43

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1. Parasitos de sangue em anfíbios anuros na Amazônia oriental**

#### **1.1.1. Qual é o problema da pesquisa?**

Os parasitos são organismos que vivem em associação com outros organismos, dos quais retiram os meios para sua sobrevivência. Esta interação entre parasito-hospedeiro (chamada de parasitismo), pode causar no hospedeiro desde efeitos mínimos, que não afetam funções vitais, ou até mesmo levá-lo a morte. Os parasitos são classificados em três categorias, de acordo com a parte do hospedeiro que é afetada: ectoparasitos, quando infestam a parte exterior do corpo do hospedeiro; endoparasitos, quando infestam o interior do corpo do hospedeiro; e hemoparasitos, quando infectam o sangue dos hospedeiros. O parasitismo pode constituir uma força seletiva em populações por causar redução da energia destinada aos processos fisiológicos (reprodução, alimentação etc.) de seus hospedeiros, bem como servem como indicadores ambientais de alterações ambientais. Estudos relacionados com o parasitismo de anfíbios, suas relações e efeitos são escassos ou inexistentes na Amazônia brasileira. As populações de várias espécies de anfíbios sofrem uma alarmante diminuição de suas populações pela perda de seus ambientes de vivência, poluição, mudanças climáticas e ainda, doenças infecciosas emergentes. Neste sentido, este trabalho objetivou conhecer as relações parasito-hospedeiro de anfíbios capturados na Amazônia brasileira (Figura 1). Além disso, parâmetros hematológicos e bioquímicos foram utilizados para investigar como os parasitos se relacionam com seus hospedeiros, o que pode acarretar patogenias (doenças) nos anfíbios, podendo reduzir suas populações a níveis preocupantes.

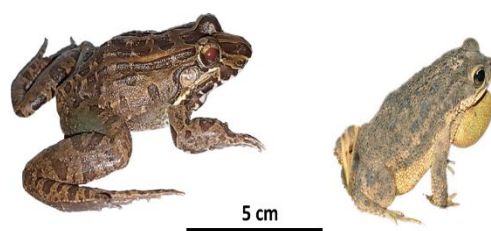


Figura 1 - Espécies de anfíbios utilizados na pesquisa (a esquerda *Leptodactylus macrosternum*; a direita *Rhinella major*).

### 1.1.2. Como a pesquisa foi realizada?

Essa pesquisa possui dois trabalhos cumprindo objetivos diferentes. Foram capturados 64 exemplares de *Rhinella major* na área da hidrelétrica de Curuá-Una e 32 indivíduos de *Leptodactylus macrosternum* nas margens do rio Tapajós, no distrito de Alter do Chão, ambos locais de coleta estão localizados no município de Santarém – Pará (Figura 2). O sangue dos sapos foi coletado diretamente do coração (punção cardíaca) para confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo e o restante do volume obtido, foi utilizado para análise hematológica e bioquímica. As extensões sanguíneas foram utilizadas para pesquisa de hemoparasitos com auxílio de microscópio óptico de luz. Os parasitos identificados foram fotografados e medidos para análises estatísticas, morfométricas e descrição morfológica. Uma parte do sangue foi processado para análises hematológicas com realização de hemograma completo e análise bioquímica com dosagem dos níveis de glicose, hemoglobina, TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) que são enzimas encontradas no fígado. Após a obtenção dos resultados das análises, testes estatísticos foram empregados para investigar as relações entre esses parâmetros do sangue e o número de parasitos encontrados.

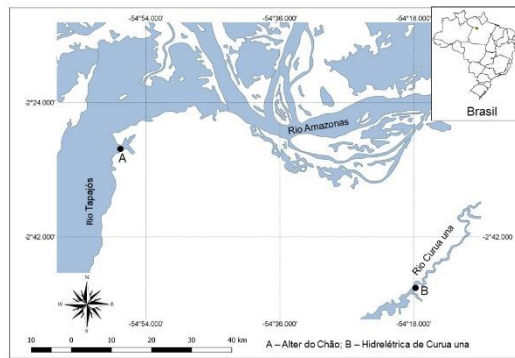


Figura 2 – Mapa de localização dos pontos amostrais para coleta dos anuros no município de Santarém-PA. **Ponto A** - distrito de Alter do Chão; **Ponto B** - Usina Hidrelétrica de Curuá-Una.

### 1.1.3. Qual a importância da pesquisa?

O conhecimento acerca das relações entre parasitos e seus hospedeiros anfíbios são importantes, uma vez que esses animais são indicadores de qualidade ambiental. Em ambientes naturais e ecossistemas estáveis, as relações parasitas-hospedeiros possuem a oportunidade de evoluírem juntos (coevolução), a princípio ocasionando poucos ou nenhum efeito patogênico para os hospedeiros saudáveis. Entretanto, se essas relações forem, por exemplo, perturbadas pela redução e fragmentação de habitats (desmatamento), movimentação indiscriminada de animais hospedeiros entre habitats (tráfico de animais, entrada de animais exóticos etc.); efeitos patogênicos (doenças) podem se tornar comuns e aparentes, ocasionando reduções populacionais nos anfíbios hospedeiros. As relações entre diferentes grupos de parasitos e seus hospedeiros (anfíbios, répteis, aves, mamíferos etc.) ainda permanecem desconhecidas, ou pouco exploradas, além disso os efeitos das modificações proporcionadas pelo homem (modificações antrópicas) sobre prevalências parasitárias e efeitos negativos nos hospedeiros são pouco estudados. As modificações antrópicas podem resultar em efeitos danosos a populações de anfíbios, declinando espécies que cumprem papéis essenciais nas teias tróficas. Os pesquisadores agora deverão se concentrar em novos estudos buscando encontrar relações entre parasitos e suas patogenias associadas nas mais diferentes espécies de anfíbios.

**Autores:** Tássio Alves Coêlho, Darlison Chagas de Souza, Lincoln Lima Correa e Ricardo Alexandre Kawashita-Ribeiro.

**Instituição:** Universidade Federal do Oeste do Pará e Universidade Federal do Mato Grosso.

**Sugestões de leitura:**

Bardsley JE, Harmsen R 1973. The Trypanosomes of Anura. In: Advances in Parasitology. Elsevier, pp. 1–73. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60184-0](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60184-0)

Forzán MJ, Heatley J, Russell KE, Horney B. 2017. Clinical pathology of amphibians: a review. *Veterinary Clinical Pathology* 46: 11–33.

Menezes Leal DD, Dreyer CS, Da Silva RJ, Ribolla PEM, Dos Santos Paduan K, Bianchi I, O'dwyer LH. 2015. Characterization of *Hepatozoon* spp. in *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasitology Research* 114: 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4338>

Vidal-Martínez VM, Pech D, Sures B, Purucker ST, Poulin R. 2009. Can parasites really reveal environment impacts?. *Trends in Parasitology* 26(1): 44-51.

## **2. CAPÍTULO 1**

Título: First record of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasiting *Rhinella major* in the Brazilian Amazon

Formatação de acordo com: Anais da Academia Brasileira de Ciências (ISSN 0001-3765)

Qualis CAPES: B2

Fator de impacto JCR 2017: 0.956

Status: Artigo aceito.



1 **First record of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasiting *Rhinella***  
2 ***major* in the Brazilian Amazon**

3 TÁSSIO ALVES COELHO<sup>1</sup>, DARLISON CHAGAS DE SOUZA<sup>1</sup>, RICARDO  
4 ALEXANDRE KAWASHITA-RIBEIRO<sup>2</sup>, LINCOLN LIMA CORRÊA<sup>2\*</sup>

5 <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade (PPGBEES), Universidade Federal do Oeste  
6 do Pará. Avenida Mendonça Furtado, nº 2946, Fátima, CEP 68040-470, Santarém, PA, Brasil.

7 Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas - ICTA, Santarém, PA, Brasil.

8 <sup>2</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Avenida Mendonça Furtado, nº 2946,  
9 Fátima, CEP 68040-470, Santarém, PA, Brasil. Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas -

10 ICTA, Santarém, PA, Brasil.

11 \*Correspondence to: Lincoln L Corrêa. e-mail: [lincorre@gmail.com](mailto:lincorre@gmail.com)

12 ORCIDs:

13 First AUTHOR: <https://orcid.org/0000-0002-0264-4526>

14 Second AUTHOR: <https://orcid.org/0000-0002-7610-9665>

15 Third AUTHOR: <https://orcid.org/0000-0001-6812-0904>

16 Fourth AUTHOR: <https://orcid.org/0000-0002-6453-4824>

17  
18 **2.1. ABSTRACT**

19 *Rhinella major* is one of the component species of the *Rhinella granulosa* complex and is  
20 distributed in the neotropical region of the South American continent, being found in  
21 anthropized environments. The occurrence of trypanosomes in anurans involves a yet unknown  
22 diversity of species and hosts. In the present study, we aimed to describe the first record of  
23 *Trypanosoma* sp. at *R. major* as a new host. Of the species captured, four were positive for  
24 trypomastigote forms of *Trypanosoma* sp. The morphometry of the trypomastigote forms

25 revealed parasitemia by only one morphotype. There is a need for reports and studies of  
26 parasite-host relationships in anurans and a lack of records regarding hemoparasite diversity  
27 linked to the *Rhinella granulosa* complex.

28 **Palavras-chave:** Amphibians, Brazil, Hemoparasites and trypanosomatids.

29

## 30 **2.2. INTRODUCTION**

31 Amphibians are animals that live in the most diverse habitats, playing an important role  
32 in the food webs, contributing to the regulation of invertebrates in natural environments and in  
33 anthropic areas. Furthermore, they are hosts of a variety of parasites, showing no signs of disease  
34 (O'Rourke and Rosenbaum 2015). The invertebrate hosts and vectors of anuran trypanosomes  
35 are related to the habitat of these animals, with hirudinea and hematophagous arthropods  
36 reported as the main vectors (Bailey 1962, Anderson and Ayala 1968, Siddall and Desser 1992).  
37 Relatively, little is known about vectors of trypanosomes of amphibians (Bardsley and Harmsen  
38 1973, Martin and Desser 1991, Johnson et al. 1993). The descriptions of all the records of  
39 *Trypanosoma* species found parasitizing anurans are based on morphological aspects observed  
40 in the trypomastigote form in the peripheral blood (Martin et al. 2002). Due to the plasticity of  
41 these hemoflagellates, the species may differ in body size and shape, in the position of the  
42 nucleus and the kinetoplast, as well as in the degree of development of the undulating membrane  
43 and flagellum (Martin et al. 2002).

44 *Rhinella major* (Müller and Helmich 1936) is a component species of the *Rhinella*  
45 *granulosa* complex (Spix 1824) and is distributed in the Neotropical region of the South  
46 American continent. These anurans are characterized by their small parotid gland, warty skin  
47 and well developed cranial ridges (Narvaes and Rodrigues 2009). Adult males have a variable  
48 length of 35.8 to 75.8 mm while females range from 33.9 to 81.1 mm, have a dorsum with dark

49 spots scattered or nearby, forming a mosaic, with a cream-colored and non-pigmented belly  
50 (Narvaes and Rodrigues 2009).

51 Despite the lack of knowledge about the pathological effects of the parasite-host  
52 relationship involving anuran trypanosomes, most reports suggest a nonpathogenic relationship  
53 (Desser 2001). However, high rates of parasitemia can damage the health of hosts, especially  
54 in the early forms of their life cycle (Bardsley and Harmsen 1973). Studies in the European and  
55 North American continents have shown that the introduction of exotic trypanosomes into new  
56 habitats has potential lethality for native amphibian populations (Bardsley and Harmsen 1973).  
57 In this study, we describe the morphology and morphometry of the first record of *Trypanosoma*  
58 sp. parasitizing the *R. major* species in the Brazilian Amazon, also addressing data on  
59 prevalence, intensity and abundance of infection.

60

### 61 **2.3. MATERIALS AND METHODS**

62 Between June 20 and 22 2018, 44 specimens of *R. major* were collected by an active  
63 search in the area of direct influence of the Curuá-Una Hydroelectric Power Plant, in the  
64 municipal region of Santarém, in the west of the state of Pará, Brazil, at the coordinates  
65 2°48'52.00"S, 54°17'56.66"O.

66 The collected specimens were individualized in plastic bags and sent to the Curuá-Una  
67 scientific base of the Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), for night-time blood  
68 sampling and collection procedures (Johnson et al. 1993). In a laboratory environment, the  
69 subjects were anesthetized and euthanized using (2%) Lidocaine Hydrochloride, and their  
70 weight and snout-vent length (SVL) in millimeters was measured. The blood was collected by  
71 cardiac puncture using syringes containing EDTA (10%). It was used to make panchromatic-  
72 stained blood extensions using Fast Panoptic (Laborclin® Brazil), to evaluate the  
73 Trypanosomatidae morphotypes. Individuals of *R. major* were deposited in the Herpetology

74 Collection of the Laboratory of Ecology and Animal Behavior - LECAN of UFOPA for use in  
75 studies involving endoparasites, ecology and taxonomy.

76 The blood extensions were examined for trypanosomes with the aid of an optical  
77 microscope. The parasites were photographed using a Zeiss Axioplan optical microscope with  
78 an Axiocam ERc 5S camera. The Zen Blue 2 software package was used to determine the  
79 morphometric characteristics of trypanosomes were measured according to Dessler (2001) and  
80 Borges et al. (2016) (Figure 1).

81 The parameters of prevalence, mean abundance and mean intensity were calculated  
82 according to Bush et al. (1997). The Spearman coefficient ( $r_s$ ) was used to determine possible  
83 injurious correlations between parasite abundance and SVL and weight (Zar 2014). The Bray-  
84 Curtis similarity test and distance indices were used with the Past. 3.0 program to verify  
85 possible morphological similarities with the *Trypanosoma* species validated by França (1925),  
86 Woo (1969), Martin and Dessler (1990), Ferreira et al. (2007), Lemos et al. (2008), Malysheva  
87 (2009), Ferreira et al. (2015) and Bernal and Pinto (2016).

88

#### 89 ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

90 The collection of anurans for this study was authorized by the Brazilian government  
91 through the Biodiversity Authorization and Information System – (SISBIO n° 52610-1). This  
92 study was approved by the Animal Use Committee of the Federal University of Western Pará  
93 (Authorization n° 0320180024). All the procedures performed are in accordance with the  
94 principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA.

95

#### 96 CONFLICT OF INTEREST

97 The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of the  
98 manuscript.

## 100 2.4. RESULTS

101 Of the 44 captured specimens of *R. major* (35 males and 9 females), four males (9.09%)  
102 presented positivity for trypomastigote forms, with mean weight ( $\bar{x}=13.5$ ;  $s=\pm 1.7$  g) and mean  
103 SVL ( $\bar{x}=51.9$ ;  $s=\pm 1.7$  mm). Parasite average abundance was 0.31 and with mean intensity of  
104 3.5 parasites per infected host. Spearman analyzes revealed no correlation between host SVL  
105 and parasite abundance ( $p > 0.05$ ), as well as host weight and parasite abundance ( $p > 0.05$ ).

106 When comparing morphometry with valid amphibian trypanosomes species using the  
107 Bray-Curtis similarity index, the trypomastigote forms found in the present study (Table 1)  
108 showed a similarity of 96% to *Trypanosoma fallisi* (Martin and Dessler, 1990). Grouping in an  
109 isolated class (Figure 2), providing evidence for a morphometric identification. Despite the  
110 morphometric similarity, it is still not possible to associate at the species level, due to the  
111 morphological and morphometric parasite plasticity (Spodareva et al., 2018).

112 For the morphological study, twenty specimens of the only morphotype found of  
113 *Trypanosoma* sp. were analyzed, presenting a body that is longer than wide, from two to three  
114 flexions, with shapes varying from S and C. The present flagellum represents on average one-  
115 third of the total length, with two to four flexions. The cytoplasm presents granulations with  
116 two to three vacuoles in the anterior region and the nucleus presents an oval shape, positively  
117 displaced to the posterior region of the body with absent cariosoma. In the posterior region, two  
118 to three vacuoles are observed, being predominantly located near the nucleus. The kinetoplast  
119 presents a shape varying from oval to circular, displaced to the margin of the cytoplasmic  
120 membrane, having a distance between the posterior extremity of easy visualization, as well as  
121 the undulating membrane.

122 Morphometric analyzes of *Trypanosoma* sp. showed that in *R. major* (Figure 3) was  
123 infected by a morphotype of these hemoparasites (Figure 4), and the measurements are  
124 presented in Table 2.

125

## 126 **2.5. DISCUSSION**

127 The present study identified low prevalence rates, mean intensity and average  
128 abundance of *Trypanosoma* sp. in *R. major*. Indeed, these parasites appear to be found at a low  
129 frequency in these host. Leal et al. (2009) found a prevalence of 20% in 40 anurans captured in  
130 the Brazilian states of Mato Grosso do Sul and São Paulo. In addition, Ferreira et al. (2007)  
131 reported prevalence rates of 36% of infection in 75 anurans collected in the Amazon biome and  
132 a study performed by Desser (2001) in Costa Rica, trypanosomes occur in 12% of anurans from  
133 seven species.

134 However, Spodareva et al. (2018) found in two lakes in Kiev, Ukraine region, a high  
135 prevalence of isolated amphibian trypanosomes. Their work used fewer individuals, when  
136 compared to our study, totaling eight trypanosomes isolates of 11 individuals in an Oxbow lake  
137 (prevalence of 73%) and three of 12 individuals in an acidic peatbog (prevalence of 25%).

138 In a pathological study of blood parasites, using 140 specimens of the species  
139 *Hoplobatrachus rugulosus* (Rice Field Frogs) in Thailand, revealed prevalence of *Trypanosoma*  
140 *rotatorium*-like (11.4%), *Trypanosoma chattoni* (22.2%) and other hemoparasites were  
141 detected: *Hepatozoon* sp. (5.7%) and *Lankesterella minima* (7.1%). In addition,  
142 histopathological study was conducted in liver, kidney, lungs and spleen, but no evidence of  
143 pathological lesions associated with trypanosomas was found, only for *Hepatozoon* sp. and  
144 *Lankesterella minima* (Sailasuta et al. 2011). Parasitism by trypanosomes in amphibians is not  
145 uncommon and is mostly reported as nonpathogenic (Wright 2006, Densmore and Green 2007).

146 In our study, no physical changes were found in hosts corroborating with Bardsley and  
147 Harmsen (1973) which describe pathogenicity caused by *Trypanosoma* spp. in anurans is an  
148 extremely difficult phenomenon to establish, as it does not result in changes in the physical  
149 development of the host.

150 Trypanosomes of anurans are traditionally described on the basis of their host and  
151 geographical origin, but this approach is weakened when the extreme polymorphism and  
152 plasticity of trypomastigote forms is considered (Ferreira et al. 2007). Recently, Rodrigues et  
153 al. (2019) described *Trypanosoma* sp. parasitizing two amphibian species from Brazilian  
154 midwest using morphology and morphometry. The morphological and morphometric study of  
155 trypanosomes continues to be used for the description and validation of new hosts and records  
156 of new distributions (Miyata and Yong 1990, Desser (2001), Lemos et al. 2008 and Leal et al.  
157 2009).

158 Using Bray-Curtis similarity indices, the present study corroborates the morphometric  
159 characterization and descriptions of the trypanosomes, providing statistical support for the  
160 morphological determination of the *Trypanosoma* sp. species, presenting high degrees of  
161 similarity with the species type, described by Martin and Desser (1990). Using molecular tools  
162 have been able to describe new species of *Trypanosoma* parasitizing amphibians species of  
163 genus *Leptodactylus* from Caatinga and Cerrado biomes and three species of alligators from the  
164 Amazon and Pantanal, all in Brazil (Fermino et al. 2015; Attias et al. 2016). In addition, were  
165 able to identify the leech of the genus *Haementheria* as *Trypanosoma* vector for alligators,  
166 being found in the oral cavity of the animals (Fermino et al. 2015). However, more studies using  
167 a broad sample of *Trypanosoma* species and characters are necessary, since the morphometric  
168 and morphological similarity presented in the present study does not match the molecular  
169 phylogenies presented by Martin et al. (2002), Ferreira et al. (2008) and Spodareva et al. (2018).

170 The present study, records *R. major* parasitized by trypanosomes, which represents a new  
171 vertebrate host for *Trypanosoma* sp. in Brazil.

172 Hematophagous diptera can act as vectors of different lineages of *Trypanosoma* spp.,  
173 especially for Amazon terrestrial anurans (Ferreira et al. 2008). *Rhinella major* is a species with  
174 predominantly terrestrial habits in the adult phase and uses holes in the ground to shelter, which  
175 could increase the chances of contact with hematophagous diptera. There are evidence that  
176 some species of *Corethrella* may transmit *Trypanosoma* by feeding on calling frogs and this  
177 association is likely an ancient one (Johnson et al. 1993, Borkent 2008). Nevertheless, the  
178 mechanism of transmission of these hemoflagellates in the Amazon region is relatively  
179 unknown.

180 More comprehensive studies on the physiological aspects of host response to  
181 trypanosomatid infection are needed, as well as studies to improve and extend the taxonomy of  
182 this group using molecular tools. It is important to know the diversity of hosts, since their  
183 performance can be affected by parasitism.

184

## 185 **2.6. ACKNOWLEDGEMENTS**

186 The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
187 Superior (the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) (CAPES) for  
188 the scholarship for Darlison C. Souza.

189

190

191

192

193



194 **2.7. REFERENCES**

- 195 ANDERSON JR AND AYALA SC. 1968. Trypanosome transmitted by Phlebotomus: first  
196 report from the Americas. *Science* 161(3845): 1023-1025.
- 197 ATTIAS M, SATO LH, FERREIRA RC, TAKATA CSA, CAMPANER M, CAMARGO EP,  
198 TEIXEIRA MMG AND DE SOUZA W. 2016. Developmental and ultrastructural  
199 characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp. of  
200 Brazilian Leptodactilydae frogs. *J Eukaryot Microbiol.* 63:610–622.
- 201 BAILEY JK. 1962. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes.  
202 *Exp Parasitol* 12(3): 155-163.
- 203 BARDSLEY JE AND HARMSSEN R. 1973. The Trypanosomes of Anura. In: *Adv Parasit.*  
204 Elsevier, pp. 1–73.
- 205 BORKENT A. 2008. The frog-biting midges of the world (Corethrellidae: Diptera). *Zootaxa*  
206 1804: 1–456.
- 207 BERNAL XE AND PINTO CM. 2016. Sexual differences in prevalence of a new species of  
208 trypanosome infecting túngara frogs. *Int J Parasitol: Parasites and Wildlife* 5(1): 40-47.
- 209 BORGES AR, LEMOS M, MORAIS DH, SOUTO-PEDRÓN T AND D’AGOSTO A. 2016.  
210 In vitro Culture and Morphology of Fish Trypanosomes from South American Wetland  
211 Areas. *SOJ Microbiol Infect Dis* 4(2): 1-5.
- 212 BUSH AO, LAFFERTY KD, LOTZ JM AND SHOSTAK AW. 1997. Parasitology Meets  
213 Ecology on Its Own Terms: Margolis et al., Revisited. *The Journal of Parasitology* 83(4):  
214 575-583.
- 215 DENSMORE CL AND GREEN DE. 2007. Diseases of amphibians. *Iilar Journal* 48(3): 235-  
216 254.
- 217 DESSER SS. 2001. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the  
218 taxonomy of their Trypanosomes. *J Parasitol* 87(1): 152-160.

219 DIAMOND LS. 1965. Studies on the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes  
220 of anura. J Wildl Dis 44: 1–85.

221 FERMINO BR, PAIVA F, SOARES P, TAVARES LER, VIOLA LB, FERREIRA RC,  
222 BOTERO-ARIAS R, DE-PAULA CD, CAMPANER M, TAKATA CSA, TEIXEIRA  
223 MMG AND CAMARGO EP. 2015. Field and experimental evidence of a new caiman  
224 trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and  
225 transmitted by leeches. Int J Parasitol Parasites Wildl. 4:368–378.

226 FERREIRA JIGDAS, DA COSTA AP, RAMIREZ D, ROLDAN JAM, SARAIVA D,  
227 FOUNIER GFRDAS, SUE A, ZAMBELLI ER, MINERVINO AHH, VERDADE VK,  
228 GENNARI SM AND MARCILI A. 2015. Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence  
229 for new clades in Brazil. Syst Parasitol 91(1): 63–70.

230 FERREIRA RC, CAMPANER M, VIOLA LB, TAKATA CSA, TAKEDA GF  
231 ANDTEIXEIRA MMG. 2007. Morphological and molecular diversity and phylogenetic  
232 relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and  
233 Pantanal biomes in Brazil. Parasitol 134(11): 1623-1638.

234 FERREIRA RC, SOUZA AA, FREITAS RA, CAMPANER M, TAKATA CSA, BARRETT  
235 TV, SHAW JJ AND TEIXEIRA MMG. 2008. A phylogenetic lineage of closely related  
236 Trypanosomes (Trypanosomidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies  
237 (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in brazilian Amazonia. J Eukariot  
238 Microbiol 55(5): 427-435.

239 JOHNSON RN, YOUNG DG AND BUTLER JF. 1993. Trypanosome transmission by  
240 *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura:  
241 Hylidae). J Med Entomol 30(5):918–921.

242 LEAL DDM, O'DWYER LH, RIBEIRO VC, SILVA RJ, FERREIRA VL AND RODRIGUES  
243 RB. 2009. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

244 and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil.  
245 An. Acad. Bras. Ciênc. 81(2): 199-206.

246 LEMOS M, MORAIS DH, CARVALHO VT AND D'AGOSTO M. 2008. First record of  
247 *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian  
248 frogs (Anura, Leptodactylidae). J Parasitol 94: 148-151.

249 MALYSHEVA MN. 2009. Contributions of the fauna of haemoparasites of batrachians  
250 (Amphibia, Anura) in Kyrgyzstan. Parazitol 43(1): 32-44.

251 MARTIN DS AND DESSER SS. 1990. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma*  
252 *fallisi* N. Sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. J Protozool  
253 37(3): 199-206.

254 MARTIN DS AND DESSER SS. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech,  
255 *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron  
256 microscopic study. Parasitol Res 77(1): 18-26.

257 MARTIN DS, WRIGHT ADG, BARTA JR AND DESSER SS. 2002. Phylogenetic position of  
258 the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*,  
259 *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred  
260 from 18s rRNA gene sequences. J Parasitol 88(3): 566–571.

261 MENEZES LEAL DD, DREYER CS, DA SILVA RJ, RIBOLLA PEM, DOS SANTOS  
262 PADUAN K, BIANCHI I AND O'DWYER LH. 2015. Characterization of *Hepatozoon*  
263 spp. in *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the  
264 Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Parasitol Res 114(4): 1541–1549.

265 MIYATA A AND YONG HS. 1990. A new trypanosome, *Trypanosoma hosei* (Protozoa:  
266 Trypanosomatidae), in *Rana hosei* (Amphibia: Anura: Ranidae) from peninsular  
267 Malaysia. Raff Bull Zool 39(1): 131-134.

268 NARVAES P AND RODRIGUES MT. 2009. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa*  
269 species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. Arq.  
270 Zool 40(1): 1-73.

271 O'ROURKE DP AND ROSENBAUM MD. 2015. Chapter 18 - Biology and Diseases of  
272 Amphibians, Third Edit. Elsevier Inc.

273 RAJABI F, JAVANBAKHT H AND SAJJADI SS. 2017. A preliminary study of  
274 haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. J. Entomol.  
275 Zool. Stud 5(4): 1314-1317.

276 RODRIGUES AFSF, MORAIS DH, CARVALHO VT, D'AGOSTO M AND LEMOS M.  
277 2019. Morphological and morphometric characterization of trypanosomes in  
278 *Leptodactylus lineatus* and *Osteocephalus* sp. (Anura) from Brazilian Midwest. Rev Bras  
279 Zoociências. 20:1–10.

280 SAILASUTA A, SATETASIT J AND CHUTMONGKONKUL M. 2011. Pathological study  
281 of blood parasites in rice field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). Vet  
282 Med Int. 2011.

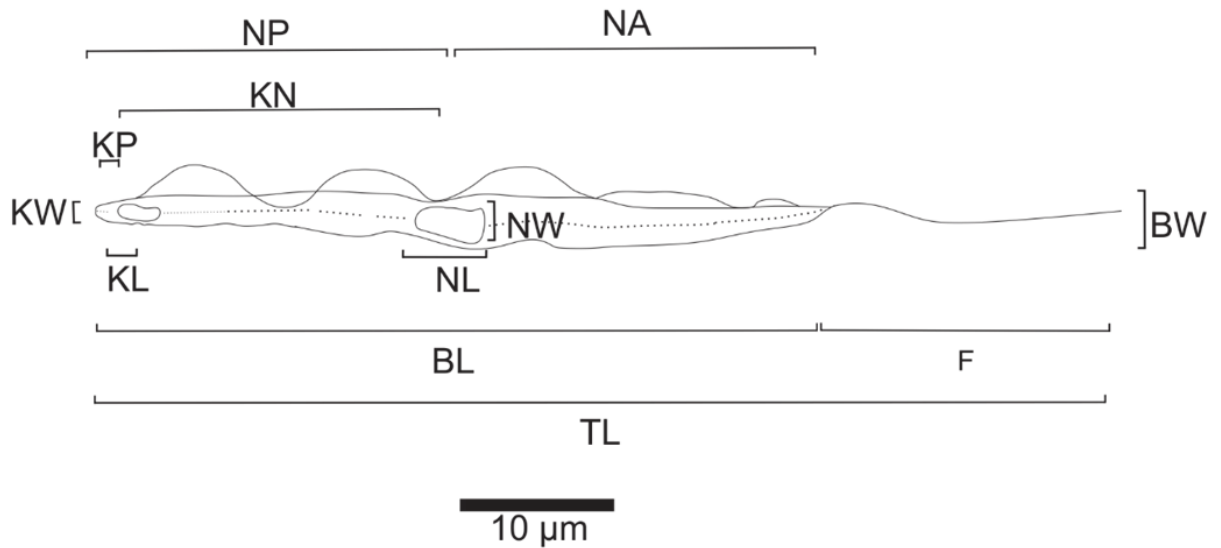
283 SIDDALL ME AND DESSER SS. 1992. Alternative leech vectors for frog and turtle  
284 trypanosomes. J Parasitol 78(3): 562-563.

285 SPODAREVA VV, GRYBCHUK-IEREMENKO A, LOSEV A, VOTÝPKA J, LUKES J,  
286 YURCHENKO V AND KOSTYGOV AY. 2018. Diversity and Evolution of anuran  
287 trypanosomes: insights from the study of European species. Parasite Vector 11(1): 447.

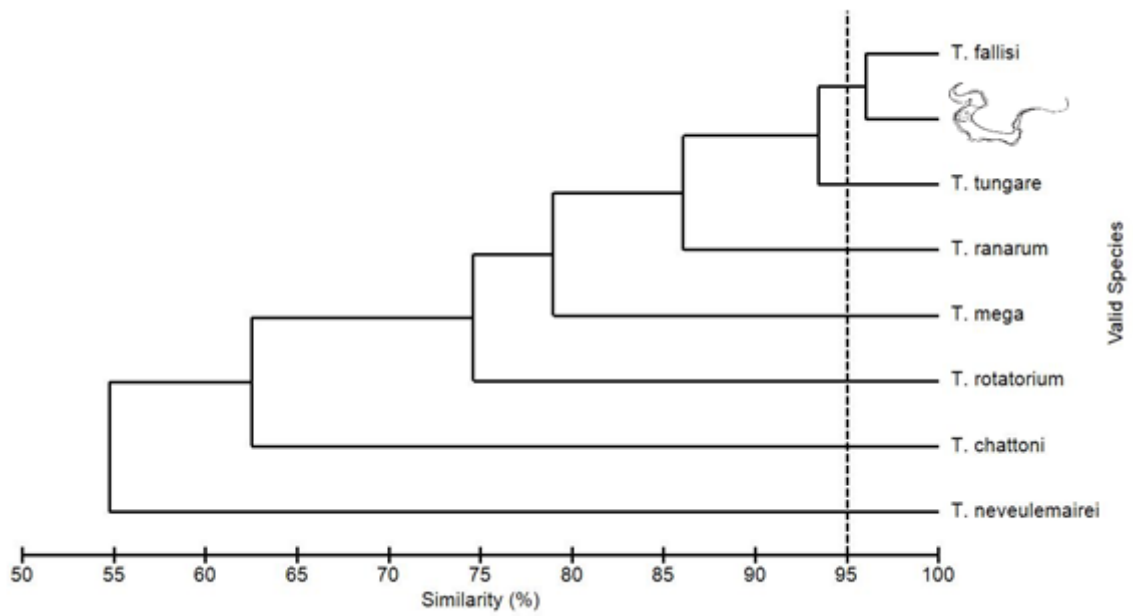
288 WOO PTK. 1969. Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. Can J Zool  
289 47(5): 981-988.

290 WRIGHT KM. 2006. Overview of amphibian medicine. In: Mader DR ed. Reptile Medicine  
291 and Surgery. Elsevier, St. Louis, 941–971.

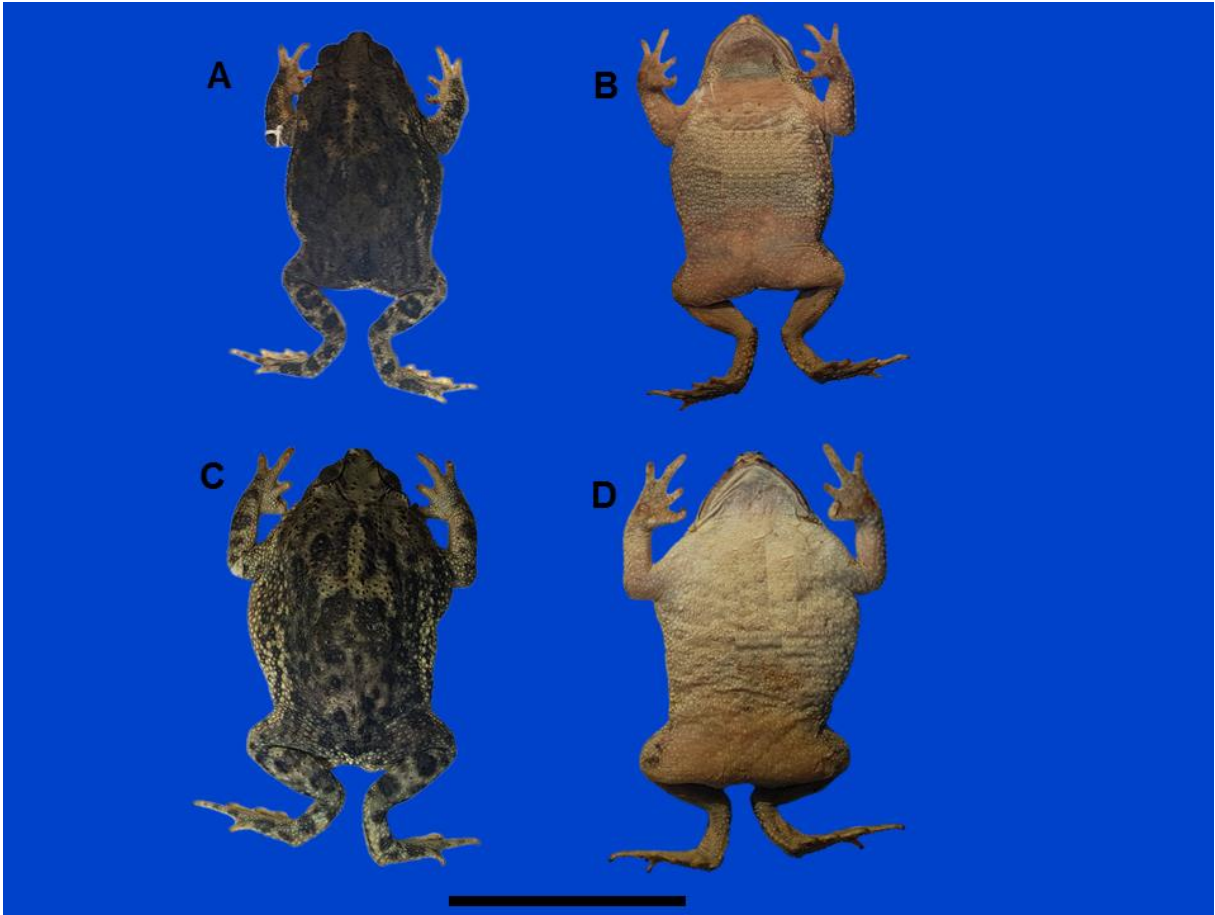
292 ZAR JH. 2010. Bioestatística analysis. New Jersey, Prentice Hall.



**Figura 1.** Morphometric localization of the regions of *Trypanosoma* sp. measured, with values in  $\mu\text{m}$ , of total body length with flagellum (**TL**), body length along the midline (**BL**), body width at the center of the nucleus (**BW**), length of the free flagellum (**F**), nucleus length (**NL**), nucleus width in the central portion (**NW**), distance from the center of the nucleus to the anterior extremity (**NA**), distance from the center of the nucleus to the posterior extremity (**NP**), distance from the center of the kinetoplast to the center of the nucleus (**KN**), kinetoplast length (**KL**), kinetoplast width (**KW**) and distance from the center of the kinetoplast to the posterior extremity (**KP**)



**Figura 2.** Dendrogram of morphometric similarity between valid species of trypanosomes for anurans and morphotype identified in *Rhinella major* collected in Curuá-Una, Santarém, Pará (Brazil)



**Figura 3.** *Rhinella major* collected on the right bank of the Curuá-Una River. A – Male in dorsal position; B – Male in ventral position; C – Female in dorsal position; D – Female in ventral position (bar 5 cm)



**Figura 4.** Trypomastigote forms of *Trypanosoma* sp. observed in the blood circulation of *Rhinella major* (bar 10  $\mu\text{m}$ )



### **3. CAPÍTULO 2**

Título: Parâmetros hematológicos e a relação parasito/hospedeiro: uma análise de anfíbios anuros infectados por hemoparasitos na Amazônia oriental

Formatação de acordo com: Journal of Zoology (ISSN 1469-7998)

Qualis CAPES: A2

Fator de impacto (JCR 2017): 1.676

Status: Aguardando revisão para realizar submissão.

293 **Parâmetros hematológicos e a relação parasita/hospedeiro: uma análise de anfíbios anuros**  
294 **infectados por hemoparasitos na Amazônia oriental**

295 **Título curto: Parâmetros hematológicos e a relação parasita/hospedeiro**

296 Tássio Alves Coêlho<sup>1\*</sup>, Darlison Chagas de Souza<sup>1</sup>, Lincoln Lima Correa<sup>2</sup>, Ricardo Alexandre  
297 Kawashita-Ribeiro<sup>2</sup>

298 <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade (PPGBEES), Universidade Federal do Oeste do Pará.  
299 Rua Vera Paz, S/N, Salé, CEP 68040-255, Santarém, Pará, Brazil.

300 <sup>2</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Rua Vera Paz, S/N, Salé, CEP 68040-255,  
301 Santarém, Pará, Brazil.

302

303 \*Autor correspondente: Tássio Alves Coêlho. E-mail: coelho.tassio@gmail.com

304 ORCID's:

305 Primeiro autor: <https://orcid.org/0000-0002-0264-4526>

306 Segundo autor: <https://orcid.org/0000-0002-7610-9665>

307 Terceiro autor: <https://orcid.org/0000-0002-6453-4824>

308 Quarto autor: <https://orcid.org/0000-0001-6812-0904>

309

310 **3.1. RESUMO**

311 Neste estudo, objetivamos avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas causadas pela infecção por  
312 hemoparasitos em anfíbios anuros no neotrópico. Foram capturados 32 espécimes de *Leptodactylus*  
313 *macrosternum* e 20 exemplares de *Rhinella major* provenientes de ambiente antropizados no oeste do  
314 estado do Pará, Brasil. As coletas sanguíneas ocorreram por punção cardíaca para confecção de  
315 extensões sanguíneas e avaliação dos parâmetros bioquímicos de glicose, TGO e TGP e hemoglobina.  
316 A pesquisa de hemoparasitos foi realizada com microscópio óptico de luz com ampliação de 400x e  
317 1000x. O teste de Mann-Whitney foi utilizado com o intuito de verificar diferenças nos parâmetros entre  
318 anfíbios infectados e não infectados. bem como testes de correlação de Spearman (rs) e regressões  
319 lineares entre a abundância parasitária e os parâmetros analisados. As análises revelaram altos índices  
320 de prevalência parasitária, com registro de infecções mistas com presença de até três hemoparasitos

321 (*Trypanosoma* sp., *Hepatozoon* sp. e microfilárias). Os testes de Mann-Whitney não revelaram  
322 diferenças entre os parâmetros analisados. Foi possível detectar correlações entre *Trypanosoma* sp. e  
323 valores de hematócrito e *Hepatozoon* sp. com níveis de glicose. A regressão linear revelou que há uma  
324 relação negativa significativa ( $p < 0.05$ ) entre *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp. com os níveis de  
325 hematócrito. Os efeitos envolvendo abundâncias parasitárias e parâmetros hematológicos e bioquímicos  
326 negativos nos hospedeiros são escassos, apresentamos aqui relações negativas entre hemoparasitos e os  
327 seus hospedeiros anfíbios, revelando que esses animais estão passíveis de patogenias associadas a essas  
328 relações.

329 **Palavras-chave:** Hemoparasitos, anfíbios, Leptodactylidae, Bufonidae, Amazônia brasileira

330

### 331 3.2. INTRODUÇÃO

332 Interações ecológicas tem como papel principal a regulação de populações em ambientes naturais. O  
333 parasitismo pode ser influenciado pelo ambiente, afetando o desenvolvimento das infecções e o provável  
334 surgimento de doenças, oriundas de diversos patógenos (bactérias, fungos, helmintos e protozoários)  
335 (Blaustein & Kiesecker, 2002; Luz & Faccini, 2013). O parasitismo, assim como a predação e a  
336 competição, constitui uma força seletiva em populações por reduzir a energia destinada a processos  
337 fisiológicos de seus hospedeiros, além de servir como um potencial bioindicador de alterações  
338 ambientais (Vidal-Martínez *et al.*, 2010).

339 Populações de anfíbios sofrem um alarmante declínio em muitas regiões do mundo pela perda de  
340 hábitat, poluição, mudanças climáticas e doenças infecciosas emergentes, como é o caso do fungo  
341 quitrídio (*Batrachochytrium dendrobatidis*) e de ranaviruses (Blaustein & Wake, 1995; Blaustein &  
342 Kiesecker, 2002). Juntamente com o quitrídeo, os anfíbios são hospedeiros de uma ampla variedade de  
343 parasitos (Netherlands *et al.*, 2015), incluindo hemoparasitos intra-eritrocíticos e extracelulares que  
344 variam de protozoários, incluindo apicomplexos intracelulares e flagelados extracelulares (Davies &  
345 Johnston, 2000), a microfilárias de nematóides extracelulares (Nguiffo *et al.*, 2019), bem como os  
346 parasitas intracelulares de identidade incerta, como infecções virais e bacterianas (Davies & Johnston,  
347 2000).

348 Os hemoparasitos de anuros são comumente reportados como não patogênicos para seus hospedeiros,  
349 porém podem causar alterações fisiológicas em girinos ou adultos que estejam com altos níveis de  
350 infecção, refletindo diretamente no peso e comprimento total dos indivíduos, podendo resultar na morte  
351 do hospedeiro, sendo a esplenomegalia um dos aspectos pós-morte relatado para anfíbios (Bardsley &  
352 Harmsen, 1973; Wright & Whitaker, 2001; Densmore & Green, 2007).

353 Aspectos relativos à significância da correlação entre a presença de hemoparasitos e parâmetros  
354 morfométricos, hematológicos e bioquímicos de anfíbios são escassos ou inexistentes (Desser, 2001;  
355 Forzán *et al.*, 2017). Além disso, poucos estudos examinaram o impacto combinado de parasitas e  
356 estresse ambiental em biomarcadores imunológicos e fisiológicos em anfíbios. Os anfíbios enfrentam  
357 estresse ambiental devido a mudanças climáticas que envolvem regimes imprevisíveis de temperatura e  
358 precipitação, além disso o estresse causado pelas mudanças ambientais, pode aumentar a exposição à  
359 patógenos e seus vetores, mas essas relações possuem estudos limitados no aspecto sobre manifestações  
360 clínicas do parasitismo nos anuros (Marcogliese *et al.*, 2009; Rollins-Smith, 2017). Neste estudo,  
361 analisamos a relação entre hemoparasitos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de anfíbios anuros  
362 coletados na Amazônia oriental. Pesquisamos especificamente os parasitos sanguíneos de hemoparasitos  
363 encontrados no sangue de anfíbios e avaliamos as alterações hematológicas em sapos naturalmente  
364 infectados com esses parasitos.

365

### 366 **3.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 367 **Área de estudo e coleta dos anuros**

368 No mês de outubro de 2019, 32 espécimes de *Leptodactylus macrosternum* foram coletados por busca  
369 ativa em área periurbana da vila de Alter do Chão (2°30'9.57"S 54°57'29.12"O) e 20 exemplares de  
370 *Rhinella major* na área de influência direta da hidrelétrica de Curua-una, no município de Santarém,  
371 oeste do estado do Pará, Brasil nas seguintes coordenadas 2°48'50.32"S 54°17'49.61"O (Fig 1).

372 Os espécimes coletados foram individualizados em sacos plásticos e enviados para a Universidade  
373 Federal do Oeste do Pará para os procedimentos de amostragem e coleta de sangue serem realizados  
374 ainda no período noturno. Em ambiente laboratorial, os exemplares foram anestesiados e eutanasiados  
375 usando cloridrato de lidocaína (2%) (Sebben, 2007), além disso a massa corporal (g) e o comprimento

376 rostro-cloacal (mm) foram aferidas. Durante a captura e os procedimentos laboratoriais, os animais  
377 foram tratados com cuidado e foram asseguradas boas práticas veterinárias.

378 As amostras sanguíneas foram coletadas via punção cardíaca utilizando seringa hipodérmica e o  
379 volume obtido transferido imediatamente para tubos heparinizados e colocados sob refrigeração. Dentro  
380 de 12 h da coleta foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicatas, utilizando um volume de  
381 10µl do sangue coletado, sendo estas coradas usando Fast Panoptic (Laborclin®, Brazil). Os anfíbios  
382 coletados foram depositados na Coleção Herpetológica do Laboratório de Ecologia e Comportamento  
383 Animal – LECAN para uso em estudos envolvendo endoparasitas, ecologia e taxonomia.

#### 384 **Análises hematológicas, bioquímicas e das extensões sanguíneas**

385 As extensões sanguíneas foram examinadas para pesquisa de hemoparasitos com auxílio de  
386 microscópio óptico com ampliação de 400x e 1000x. A quantificação dos hemoparasitos foi realizada  
387 pela contagem do número de parasitos encontrados em 100 campos analisados. A contagem diferencial  
388 dos eritrócitos e leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer utilizando solução de Natt-  
389 Herrick (Natt & Herrick, 1952; Forzán *et al.*, 2017).

390 Nos anfíbios, como em outros vertebrados, os eritrócitos são as células mais abundantes no sangue  
391 e sua função é transportar oxigênio e dióxido de carbono de e para os tecidos, respectivamente. A  
392 contagem de leucócitos foi usada para determinar uma resposta imune contra uma infecção bacteriana,  
393 viral ou parasitária.

394 Os valores de hematócrito (Ht) foram obtidos a partir do método de microhematócrito, um baixo  
395 nível de hematócrito pode indicar anemia, que pode ser causada pela diminuição da produção de  
396 eritrócitos, perda de sangue, infecção viral, exposição a toxinas ou fome. A partir dos valores de  
397 hematócrito, foram calculados os índices de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina  
398 corpuscular média) (Jacobson, 2007; Sperry *et al.*, 2009; Zenklusen *et al.*, 2014). A glicose tem como  
399 principal função fornecer energia, além disso as enzimas produzidas no fígado, podem servir de  
400 marcadores para manifestações clínicas no órgão (Zenklusen *et al.*, 2014). Os parâmetros bioquímicos  
401 de hemoglobina (Hb), glicose, TGO (transaminase glutâmico oxalacética) e TGP (transaminase

402 glutâmico pirúvica) foram analisados pelo método cinético em analisador semiautomático utilizando  
403 kits Doles® (Zenklusen *et al.*, 2011, 2014; Forzán *et al.*, 2017).

#### 404 **Análise estatística**

405 Os termos ecológicos utilizados e os parâmetros de prevalência, abundância e intensidade média  
406 foram calculados de acordo com os propostos por Bush *et al.*, (1997). Esses parâmetros foram calculados  
407 no software Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel *et al.*, 2019). Todos os dados foram avaliados  
408 previamente com base nas premissas de normalidade usando Shapiro-Wilk. Os parâmetros sanguíneos  
409 dos anfíbios infectados e não infectados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-  
410 Whitney (U), para comparação entre medianas.

411 O coeficiente de correlação de Spearman (rs) foi utilizado para verificar possíveis correlações da  
412 abundância de parasitas com os níveis de cada parâmetro (Zar, 2010). Além disso, a regressão linear foi  
413 usada para atribuir efeitos dos parasitas em cada parâmetro analisado. As análises foram realizadas  
414 usando os softwares GraphPad prism versão 8 e R v.3.6.2 (R Core Team, 2019).

415

### 416 **3.4. RESULTADOS**

417 Dos 32 espécimes de *L. macrosternum* (30 machos e duas fêmeas), 21 estavam infectados com até  
418 três hemoparasitos: *Trypanosoma* sp., *Hepatozoon* sp. e microfilária, com peso médio ( $\bar{X} = 38.36$ ;  $s =$   
419  $\pm 14.69$  g) e CRC médio ( $\bar{X} = 75.64$ ;  $s = \pm 9.036$  mm). Nos 20 espécimes de *R. major* (12 machos e oito  
420 fêmeas), apenas dois indivíduos estavam infectados com até dois hemoparasitos: *Trypanosoma* sp. e  
421 *Hepatozoon* sp., com peso médio ( $\bar{X} = 14.78$ ;  $s = \pm 4.882$  g) e CRC médio ( $\bar{X} = 57.72$ ;  $s = \pm 5.727$  mm)  
422 (Fig. 1). Prevalência, intensidade média e abundância média da infecção de cada hemoparasito são  
423 mostrados na Tabela 1.

424 Utilizando a análise de Mann-Whitney para comparação das medianas dos parâmetros analisados  
425 entre os indivíduos infectados e não infectados, foi possível inferir que o peso e CRC, os níveis de  
426 glicose, TGO e TGP, eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e HCM são similares entre  
427 os anfíbios infectados e não infectados em ambas as espécies coletadas, conforme as tabelas 2 e 3.

428 A correlação de Spearman, utilizada para verificar as correlações entre a abundância absoluta de  
429 cada hemoparasito encontrado e os parâmetros analisados em ambas as espécies de anfíbios  
430 analisados, revelou que em *L. macrosternum*, os valores de hematócrito (Ht) é correlacionado com  
431 *Trypanosoma* sp. ( $p = 0.01$ ) e os níveis de glicose com *Hepatozoon* sp. ( $p = 0.02$ ) (Tabela 4). Os níveis  
432 de TGP obtiveram valores próximos da correlação significativa, sendo assim assumimos que  
433 biologicamente há correlação entre o parâmetro analisado e *Hepatozoon* sp. ( $p = 0.07$ ) (Tabela 4). Em  
434 *R. major* não foram detectadas correlações significativas entre os hemoparasitos e os parâmetros  
435 analisados ( $p > 0.05$ ).

436 Utilizando regressões lineares para verificar a influência dos hemoparasitos encontrados nos  
437 parâmetros analisados, foi possível determinar que ocorre influência de *Trypanosoma* sp. e  
438 *Hepatozoon* sp. nos valores de hematócrito de *L. macrosternum*. Juntos, eles explicam 30% da  
439 variação nos valores de hematócrito, apresentando valores significativos ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). Os  
440 resultados encontrados para *R. major* não revelaram influências dos parasitos nos parâmetros  
441 analisados, apresentando valores não significativos ( $p > 0.05$ ).

442

### 443 3.5. DISCUSSÃO

444 Esse estudo é o primeiro a relatar hemoparasitos e dados hematológicos e bioquímicos de  
445 *Leptodactylus macrosternum* e *Rhinella major*. Além disso, é o primeiro a avaliar a relação entre os  
446 parasitos do sangue dos anfíbios e parâmetros hematológicos e bioquímicos, revelando que os  
447 parâmetros são afetados quando estão infectados por *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp. Esse estudo é  
448 o primeiro relato de infecção por *Trypanosoma* sp., *Hepatozoon* sp. e microfilária em *L. macrosternum*  
449 e o primeiro registro de infecção por *Hepatozoon* sp. em *R. major* no Brasil, sendo estas espécies  
450 relativamente comuns e de ampla distribuição no nordeste da América do Sul (Sodré, Martins &  
451 Vallinoto, 2014).

452 A descrição das inferências quanto aos padrões hematológicos e bioquímicos dos anfíbios anuros é  
453 escassa. A maioria dos trabalhos existentes é relacionada apenas a contagens celulares e principalmente  
454 a morfometria e morfologia das células hemáticas (Arserim & Mermer, 2008; Zenklusen *et al.*, 2011).  
455 Por outro lado, alguns estudos são conduzidos para investigar a relação de agentes químicos com a

456 hematologia dos anfíbios, ou ainda como ferramenta de avaliação animal em ambientes de uso comercial  
457 (Fenerick Junior, Stéfani & Martins, 2006; Zenklusen *et al.*, 2011). Com isso, esse estudo é um dos  
458 primeiros, a avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos, relacionando esses dados com o  
459 parasitismo em *L. macrosternum* e *R. major*.

460 O parasitismo por hemoparasitos em anfíbios não é incomum e é reportado como não patogênico  
461 (Wright & Whitaker, 2001; Densmore & Green, 2007). Neste estudo, modificações físicas não foram  
462 encontradas nos anfíbios, corroborando com Bardsley & Harmsen, (1973) que descrevem a  
463 patogenicidade causada por *Trypanosoma* spp. em anuros, como um aspecto extremamente difícil de  
464 ser estabelecido, não promovendo mudanças no desenvolvimento físico dos hospedeiros. No presente  
465 estudo, não foram encontradas modificações físicas nos hospedeiros, considerando que foram  
466 encontrados mais de um hemoparasito no sangue dos anuros analisados.

467 Em um estudo patológico de parasitas sanguíneos, utilizando 140 espécimes da espécie  
468 *Hoplobatrachus rugulosus* na Tailândia, revelou prevalência de *Trypanosoma rotatorium* (11,4%),  
469 *Trypanosoma chattoni* (22,2%) e outros hemoparasitos: *Hepatozoon* sp. (5,7%) e *Lankesterella minima*  
470 (7,1%) (Sailasuta, Satetasit & Chutmongkonkul, 2011). Em nosso estudo, os índices de prevalência são  
471 superiores a esses achados, sendo a prevalência por *Hepatozoon* sp. em *L. macrosternum* acima de 50%  
472 e de 25% por *Trypanosoma* sp., além disso, essas espécies de anuro também estava infectada por  
473 microfilárias (15%). Ainda no estudo de Sailasuta *et al.*, (2011), foi conduzido um estudo  
474 histopatológico de fígado, rim, pulmões e baço nesses animais, encontrando lesões apenas no fígado  
475 associado a *Hepatozoon* sp. e *Lankesterella mínima*. Não conduzimos estudo histopatológico, mas  
476 nossos dados apresentaram correlação próxima a valores significativos entre o parasitismo por  
477 *Hepatozoon* sp. e níveis de TGP em *L. macrosternum*.

478 Nos achados de Garrido & Pérez-Mellado, (2014) que realizaram testes de corrida em lagartos de  
479 Aire Island, foi encontrada uma relação negativa entre parasitas sanguíneos e a velocidade de corrida.  
480 Nossos achados demonstram correlação entre hematócrito e *Trypanosoma* sp. e níveis de glicose com  
481 *Hepatozoon* sp., além disso há uma relação negativa do hematócrito sendo afetado por ambos os  
482 hemoparasitos. Hemogregarinas reduzem concentrações de hemoglobina em seus hospedeiros,



483 reduzindo sua capacidade do transporte de oxigênio para os músculos (Oppliger, Célrier & Clobert,  
484 1996). Sendo assim, nosso estudo corrobora com esses achados, uma vez que se há redução nas  
485 hemácias, a consequência é que o hematócrito também seja reduzido, conforme demonstrado em nosso  
486 estudo por meio das regressões lineares. Além disso, se existe redução nos níveis de glicose, haverá  
487 menos disponibilidade energética para os exemplares infectados, reduzindo sua performance. Embora  
488 os níveis de TGP tenha alcançado valores próximos da significância, consideramos que no sentido  
489 biológico, os animais infectados com *Hepatozoon* sp. possuem correlações com reduções na função  
490 hepática, em virtude do ciclo realizado por este hemoparasito no fígado (Desser, Hong & Martin, 1995;  
491 Sailasuta *et al.*, 2011).

492 Recentemente, Nguiffo *et al.*, (2019) relatou a infecção por microfilária em sapos golias (*Conraua*  
493 *goliath*) com prevalência de 42.3% em seis localidades da região litorânea de Camarões. Além disso,  
494 realizaram análises hematológicas com eritrócitos e leucócitos, além de níveis de glicose e colesterol  
495 nos anfíbios. Foi possível constatar um aumento nos leucócitos durante o ataque dos parasitos, indicando  
496 uma resposta imune às microfilárias. Os demais parâmetros analisados apresentaram normalidade em  
497 relação a infecção por microfilárias (Nguiffo *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, apenas em *L.*  
498 *macrosternum* foram registradas microfilárias com prevalência de 15.6%, ainda assim não foram  
499 apresentadas após os testes executados, relações entre o parasitismo por esses parasitos e os parâmetros  
500 analisados. Dessa forma, para o presente estudo, a infecção por microfilária foi considerada não  
501 patogênica. Estudos que demonstram consequências de parasitos sanguíneos em anfíbios são escassos,  
502 sendo esta relação e seus efeitos melhor documentada em outros grupos de vertebrados como peixes,  
503 mamíferos e répteis (Oppliger *et al.*, 1996; Garrido & Pérez-Mellado, 2014; Hodžić *et al.*, 2017, 2018;  
504 Honório *et al.*, 2017; Jesus *et al.*, 2018)

505 Em trabalhos realizados com hemoparasitos, Leal *et al.*, (2009) encontrou uma prevalência de 20%  
506 para *Trypanosoma* sp. e 10% para *Hepatozoon* sp. em 40 anuros capturados nos estados brasileiros de  
507 Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo inferior aos nossos achados. Em um trabalho conduzido no  
508 bioma amazônico, Ferreira *et al.*, (2007) reportou taxas de prevalência de 36% por *Trypanosoma* sp. em  
509 75 anuros coletados. Em nosso estudo, utilizamos um menor número de indivíduos de *L. macrosternum*

510 e foi possível constatar uma prevalência de 25%. Além disso, um estudo realizado por Desser, (2001)  
511 na Costa Rica, revelou a prevalência de 12% de infecção por *Trypanosoma* sp. em sete espécies de  
512 anuros. Utilizamos apenas duas espécies de anfíbios anuros, sendo a espécie mais parasitada  
513 representada por *L. macrosternum*, exibindo índices de prevalência muito superiores aos encontrados  
514 por Desser, (2001).

515 As infecções por hemogregarinas foram encontradas em baixa prevalência por Calil *et al.*, (2017)  
516 quando comparadas com nossos achados. No estudo conduzido por Calil *et al.*, (2017), foram avaliados  
517 2972 animais oriundos da Fundação Zoo de São Paulo, com prevalência de 1.1% apenas, sendo  
518 encontrada em anfíbios e répteis.

519 Em anfíbios oriundos da região do pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul, no Brasil, Menezes  
520 Leal *et al.*, (2015) avaliou 68 *Leptodactylus chaquensis* e 77 *Leptodactylus podicipinus* e encontrou  
521 prevalências de *Hepatozoon* sp. de 11.76% e 2.60% respectivamente nesses anfíbios, utilizando a técnica  
522 de esfregaços sanguíneos. Utilizando os esfregaços sanguíneos, nosso estudo encontrou para 32  
523 exemplares de *L. macrosternum*, uma prevalência de 56.3%. Nossos resultados apresentam alta  
524 prevalência de hemoparasitos em *L. macrosternum*, o que de fato, é relativamente proporcional a  
525 abundância de Culicidae, Psychodidae e ceratopogonidae (Baker, 2007). Por outro lado, os exemplares  
526 de *R. major* não obtiveram valores elevados de prevalência de hemoparasitos, embora o local de coleta  
527 contenha uma alta diversidade de culicídeos e flebotomíneos (Gonçalves *et al.*, 2016).

528 Em um estudo realizado na África do Sul, a diversidade de hemoparasitos era maior em áreas  
529 preservadas, diminuindo nas regiões mais antropizadas (Netherlands *et al.*, 2015). Em 436 anuros  
530 analisados, *Hepatozoon* spp. foi o hemoparasito com o maior índice de prevalência (14%), seguido por  
531 *Trypanosoma* spp. (11%), além de *Dactylosoma* sp. (3%), infecções por vírus ou bactérias (1%) e  
532 microfilárias (0.5%). No presente estudo, todos os animais foram capturados em áreas antropizadas e a  
533 prevalência encontrada para *Hepatozoon* sp. em *L. macrosternum* foi de 56.3%, além de 25% para  
534 *Trypanosoma* sp. e de 15.6% para microfilária. Em *R. major*, a prevalência foi de 0.050% para  
535 *Hepatozoon* sp. e de 5% para *Trypanosoma* sp. Não podemos inferir sobre diferenças entre áreas

536 antropizadas e áreas mais preservadas, porque no presente estudo apenas os locais mais antropizados  
537 foram amostrados.

538 Em ambientes naturais e ecossistemas estáveis, as relações parasitas-hospedeiros possuem a  
539 oportunidade de coevoluir, a princípio ocasionando poucos ou nenhum efeito patogênico para os  
540 hospedeiros saudáveis. Entretanto, se essas relações forem, por exemplo, perturbadas pela redução e  
541 fragmentação de habitats, movimentação indiscriminada de animais hospedeiros entre habitats; efeitos  
542 patogênicos podem se tornar aparentes, ocasionando desestabilizações populacionais nos hospedeiros  
543 (Combes, 1996). As relações entre os parasitos e seus hospedeiros para diversos grupos animais ainda  
544 permanecem desconhecidas, além disso os efeitos antrópicos sobre prevalências parasitárias e efeitos  
545 negativos nos hospedeiros são escassos. Essas modificações antrópicas podem resultar em efeitos  
546 danosos a populações de anfíbios, declinando espécies que cumprem papéis essenciais nas teias tróficas.  
547 Novos estudos concentrando em encontrar relações parasitos hospedeiros e suas patogenias associadas  
548 deverão ser conduzidos para melhor inferirmos sobre os efeitos das modificações antrópicas no meio  
549 ambiente.

550

### 551 **3.6. AGRADECIMENTOS**

552 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de  
553 estudos concedida a Darlison Chagas de Souza. Este estudo foi aprovado pelo Comitê para Uso Animal  
554 da Universidade Federal do Oeste do Pará (Autorização #102018044). A licença para a coleta dos  
555 anfíbios anuros utilizados no presente estudo, foi concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente  
556 e dos Recursos Naturais Renováveis por meio de autorização emitida pelo Sistema de Autorizações e  
557 Informações da Biodiversidade – SISBIO nº. 66047-4.

558

559 **CONFLITO DE INTERESSES:** Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

560

561

562

563 **3.7. REFERÊNCIAS**

- 564 Arserim, S.K. & Mermer, A. (2008). Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger  
565, 1885 in Uludağ National Park ( Bursa, Turkey ).
- 566 Bardsley, J.E. & Harmsen, R. (1973). The Trypanosomes of Anura. *Adv. Parasitol.* **11**, 1–73.
- 567 Blaustein, A.R. & Kiesecker, J.M. (2002). Complexity in conservation : Lessons from the global  
568 decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* **5**, 597–608.
- 569 Blaustein, A.R. & Wake, D.B. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Am.* **272**,  
570 56–61.
- 571 Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its  
572 Own Terms: Margolis et al. Revisited. *J. Parasitol.* **83**, 575.
- 573 Calil, P.R., Gonzalez, I.H.L., Salgado, P.A.B., Cruz, J.B. da, Ramos, P.L. & Chagas, C.R.F. (2017).  
574 Hemogregarine parasites in wild captive animals, a broad study in São Paulo Zoo. *J. Entomol.*  
575 *Zool. Stud.* **5**, 1378–1387.
- 576 Combes, C. (1996). Parasites, biodiversity and ecosystem stability. *Biodivers. Conserv.* **5**, 953–962.
- 577 Davies, A.J. & Johnston, M.R.L. (2000). The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes,  
578 amphibia and reptiles. *Adv. Parasitol.* **45**, 1–107.
- 579 Densmore, C.L. & Green, D.E. (2007). Diseases of Amphibians **48**.
- 580 Desser, S.S. (2001). The Blood Parasites of Anurans from Costa Rica with Reflections on the  
581 Taxonomy of Their Trypanosomes. *J. Parasitol.* **87**, 152.
- 582 Desser, S.S., Hong, H. & Martin, D.S. (1995). The Life History, Ultrastructure, and Experimental  
583 Transmission of *Hepatozoon catesbiana* n. comb., an Apicomplexan Parasite of the Bullfrog,  
584 *Rana catesbeiana* and the Mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. *J. Parasitol.* **81**,  
585 212.
- 586 Fenerick Junior, J., Stéfani, M.V. de & Martins, M.L. (2006). Hematological parameters of bullfrog,  
587 *Rana catesbeiana*, fed with different commercial rations. *Bol. do Inst. Pesca* **32**, 173–181.
- 588 Ferreira, R.C., Campaner, M., Viola, L.B., Takata, C.S.A., Takeda, G.F. & Teixeira, M.M.G. (2007).  
589 Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran  
590 trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*

591           **134**, 1623–1638.

592   Forzán, M.J., Heatley, J., Russell, K.E. & Horney, B. (2017). Clinical pathology of amphibians: a  
593           review. *Vet. Clin. Pathol.* **46**, 11–33.

594   Garrido, M. & Pérez-Mellado, V. (2014). Sprint speed is related to blood parasites, but not to  
595           ectoparasites, in an insular population of lacertid lizards. *Can. J. Zool.* **92**, 67–72.

596   Hodžić, A., Alić, A., Beck, R., Beck, A., Huber, D., Otranto, D., Baneth, G. & Duscher, G.G. (2018).  
597           Hepatozoon martis n. sp. (Adeleorina: Hepatozoidae): Morphological and pathological features  
598           of a Hepatozoon species infecting martens (family Mustelidae). *Ticks Tick. Borne. Dis.* **9**, 912–  
599           920.

600   Hodžić, A., Alić, A., Prašović, S., Otranto, D., Baneth, G. & Duscher, G.G. (2017). Hepatozoon  
601           silvestris sp. Nov.: Morphological and molecular characterization of a new species of  
602           Hepatozoon (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*).  
603           *Parasitology* **144**, 650–661.

604   Honório, T.G.A. de F., Araújo, E.K.D., Lima, L.T. dos R., Silva, M.G. da, Fonseca, A.P.B., Costa,  
605           S.D.P. & Souza Neto, J.B. de. (2017). Infecção por Hepatozoon sp. em canino doméstico: Relato  
606           de caso. *Pubvet* **11**, 272–275.

607   Jacobson, E.R. (2007). *Infectious diseases and pathology of reptiles*. CRC Press. Taylor Fr. Gr.

608   Jesus, R.B. de, Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Pala, G., Silva, T.F.A. da, Costa, J.C. da, Kotzent, S.  
609           & Pilarski, F. (2018). Trypanosomiasis causing mortality outbreak in Nile tilapia intensive  
610           farming: Identification and pathological evaluation. *Aquaculture* **491**, 169–176.

611   Leal, D.D.M., O’Dwyer, L.H., Ribeiro, V.C., Silva, R.J., Ferreira, V.L. & Rodrigues, R.B. (2009).  
612           Hemoparasites of the genus Trypanosoma (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and  
613           hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil. *An. Acad.*  
614           *Bras. Cienc.* **81**, 199–206.

615   Luz, H.R. & Faccini, J.L.H. (2013). Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil. Revisão.  
616           *Veterinária e Zootec.* **20**, 100–111.

617   Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L.,

618 McLaughlin, J.D. & Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on  
619 biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol.* **91**, 126–134.

620 Menezes Leal, D.D., Dreyer, C.S., da Silva, R.J., Ribolla, P.E.M., dos Santos Paduan, K., Bianchi, I.  
621 & O’Dwyer, L.H. (2015). Characterization of Hepatozoon spp. in *Leptodactylus chaquensis* and  
622 *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil.  
623 *Parasitol. Res.* **114**, 1541–1549.

624 Natt, M.P. & Herrick, C.A. (1952). A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and  
625 Leucocytes of the Chicken. *Poult. Sci.* **31**, 735–738.

626 Netherlands, E.C., Cook, C.A., Kruger, D.J.D., du Preez, L.H. & Smit, N.J. (2015). Biodiversity of  
627 frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *Int. J. Parasitol.*  
628 *Parasites Wildl.* **4**, 135–141.

629 Nguiffo, D.N., Wondji, C.S., Wabo, J.P. & Mpoame, M. (2019). Microfilariae infestation of goliath  
630 frogs (*Conraua goliath*) from Cameroon. *PLoS One* **14**, 1–10.

631 Oppliger, A., Célérier, M.L. & Clobert, J. (1996). Physiological and behaviour changes in common  
632 lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology* **113**, 433–438.

633 Reiczigel, J., Marozzi, M., Fábíán, I. & Rózsa, L. (2019). Biostatistics for Parasitologists – A Primer  
634 to Quantitative Parasitology. *Trends Parasitol.*

635 Rollins-Smith, L.A. (2017). Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. *Dev. Comp.*  
636 *Immunol.* **66**, 111–119.

637 Sailasuta, A., Satetasit, J. & Chutmongkonkul, M. (2011). Pathological study of blood parasites in rice  
638 field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Vet. Med. Int.* **2011**.

639 Sebben, A. (2007). Microdissecção fisiológica a fresco: uma nova visão sobre anatomia de répteis e  
640 anfíbios. *Herpetol. no Bras.* **II** 311–325.

641 Sodr , D., Martins, A.A.V. & Vallinoto, M. (2014). Heterospecific amplexus between the frog  
642 *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) and the toad *Rhinella* cf. *granulosa*  
643 (Anura: Bufonidae). *Herpetol. Notes* **7**, 287–288.

644 Sperry, J.H., Butler, L.K., Romero, L.M. & Weatherhead, P.J. (2009). Effects of parasitic infection

645 and radio-transmitters on condition, hematological characteristics and corticosterone  
646 concentrations in Texas ratsnakes. *J. Zool.* **278**, 100–107.

647 Vidal-Martínez, V.M., Pech, D., Sures, B., Purucker, S.T. & Poulin, R. (2010). Can parasites really  
648 reveal environmental impact? *Trends Parasitol.* **26**, 44–51.

649 Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (2001). *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar,  
650 Florida: Krieger Publishing Company.

651 Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall.

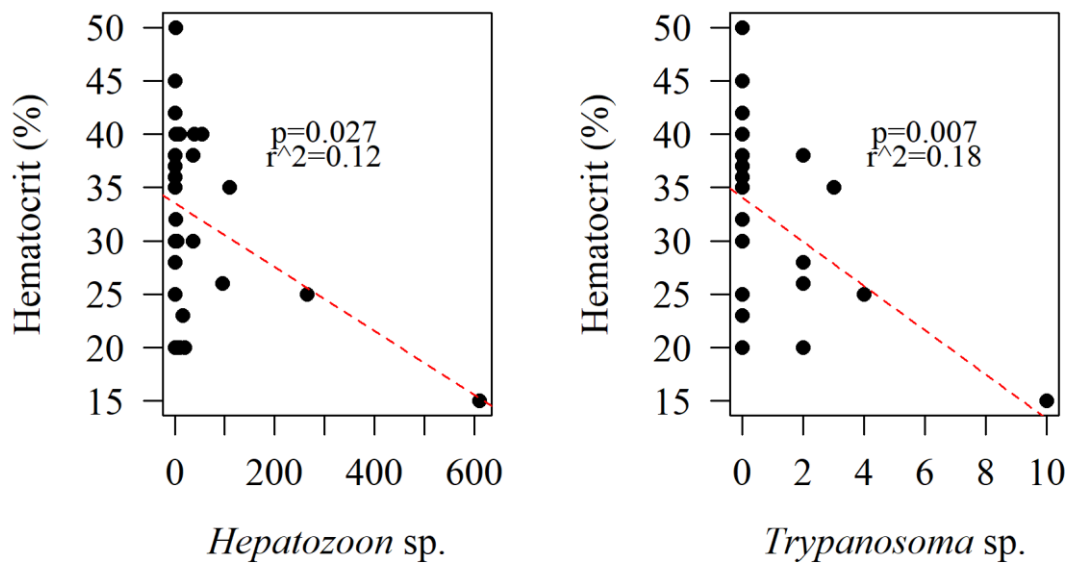
652 Zenklusen, M.C.C., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Paola, M., Junges, C.M., Biancucci, G.F. &  
653 Bassó, A. (2011). Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernadezae*  
654 (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* **59**, 17–  
655 28.

656 Zenklusen, M.C.C., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Biancucci,  
657 G.F. & Bassó, A. (2014). Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. *Mus. Prov.*  
658 *Ciencias Nat. "Florentino Ameghino"* **18**, 1–16.



**Fig. 1** - Exemplos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (a esq.) e *Rhinella major* (a dir.).





**Fig. 2** – Regressão linear apresentando a influência de *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp. nos valores de hematócrito dos espécimes de *L. macrosternum*.

	<i>Leptodactylus macrosternum</i>			<i>Rhinella major</i>	
	Microfilaria	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Trypanosoma</i> sp.
Prevalence (%)	15.6 (0.052-0.327)	56.3 (0.37-0.73)	25.0 (0.11-0.43)	0.050 (0.0012-0.2488)	5.0 (0.001-0.248)
Mean Abundance	0.31 (0.09-0.81)	43.22 (17.84-110.97)	0.84 (0.38-1.91)	4.25 (0.00-12.75)	0.10 (0.00-0.30)
Mean Intensity	2.00 (1.00-3.60)	76.83 (33.17-185.50)	3.38 (2.25-6.25)	85.00 (35.18-95.50)	2.00 (0.00-2.00)

Values inside the parenthesis represent 95 % confident intervals

**Tabela 1** - Prevalência, intensidade média e abundância média dos hemoparasitos infectando

*Leptodactylus macrosternum* e *Rhinella major*.

Parameters	Non-parasitized <i>L. macrosternum</i> (n=11)	Parasitized <i>L.</i> <i>macrosternum</i> (n=21)	<i>U</i>	p-value
Weight (g)	38.36±14.69	40.86±16.01	102.0	0.604
CRC (mm)	75.64±9.036	80.57±9.064	81.0	0.176
Red blood cells (x10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	146.2±85.68	151.0±79.99	113.0	0.937
White blood cells (µL <sup>-1</sup> )	63.73±42.45	57.71±31.96	109.0	0.807
Hematocrit (%)	33.18±8.471	31.90±9.354	106.5	0.731
Hemoglobin (g/dL <sup>-1</sup> )	10.56±2.974	8.71±3.615	69.0	0.065
MCV (fL)	3.129±1.987	2.797±1.921	104.5	0.674
MCHC (g/dL)	32.61±10.08	30.78±15.94	108.0	0.777
Glucose (mg/dL)	53.27±21.79	42.38±27.21	71.50	0.082
Aspartate aminotransferase (AST) (U/L)	40.70±37.54	54.38±52.05	105.0	0.688
Alanine aminotransferase (ALT) (U/L)	30.05±15.06	40.93±19.58	76.5	0.125

**Tabela 2** – Parâmetros analisados em *Leptodactylus macrosternum* coletados em Alter do Chão, na Amazônia oriental (Brasil).

Parameters	Non-parasitized <i>R. major</i> (n=18)	Parasitized <i>R. major</i> (n=2)	<i>U</i>	p-value
Weight (g)	14.78±4.882	13.50±0.707	18.50	0.999
CRC (mm)	57.72±5.727	55.0±2.828	14.50	0.619
Red blood cells (x10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	139.8±25.31	120.0±43.84	13.50	0.547
White blood cells (µL <sup>-1</sup> )	43.44±23.29	74.0±7.071	3.0	0.052
Hematocrit (%)	41.17±6.810	30.0±0.00	4.0	0.085
Hemoglobin (g/dL <sup>-1</sup> )	22.15±9.772	27.59±8.632	13.0	0.523
MCV (fL)	3.014±0.628	2.679±0.978	14.0	0.609
MCHC (g/dL)	56.72±27.75	91.98±28.77	6.0	0.152
Glucose (mg/dL)	18.44±6.214	14.50±0.707	11.50	0.419

**Tabela 3** – Parâmetros analisados em *Rhinella major* coletados em Curua-una, na Amazônia oriental (Brasil).

Parameters	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Microfilaria</i> sp.
Weight (g)	0.040	0.182	0.077
CRC (mm)	0.149	0.241	0.229
Red blood cells ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	-0.265	0.055	0.054
White blood cells ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	-0.157	0.072	-0.131
Hematocrit (%)	-0.431 <sup>a</sup>	-0.243	0.055
Hemoglobin (g/dL <sup>-1</sup> )	-0.248	-0.252	-0.266
MCV (fL)	0.006	-0.249	-0.059
MCHC (g/dL)	0.188	0.083	-0.103
Glucose (mg/dL)	-0.253	-0.387 <sup>b</sup>	-0.033
Aspartate aminotransferase (AST) (U/L)	0.118	0.149	-0.190
Alanine aminotransferase (ALT) (U/L)	0.156	0.322 <sup>c</sup>	0.163

**Tabela 4** – Índices de correlação de Spearman (rs) entre os hemoparasitos e os parâmetros sanguíneos analisados em *Leptodactylus macrosternum*.

## ANEXOS

### Comentários à coordenação do PPGBEES:

A dissertação está bem redigida, com objetivos claros e metodologia adequada para responder às questões principais. Como o primeiro capítulo está aceito, não fiz alterações mas aproveitei a oportunidade para parabenizar os autores e também o PPGBEES, visto que publicação discente é um dos critérios com maior peso nas avaliações pela CAPES (sobretudo em tempos nebulosos como o atual). O segundo capítulo merece uma atenção especial, principalmente com relação a revisão bibliográfica e reordenação do texto, de forma a torná-lo mais conciso e com maiores chances de sucesso na ambiciosa submissão ao Journal of Zoology (o que acho plenamente viável a aceitação e, mais uma vez parabenizo os autores).

### Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado

#### I - Aprovado ( )

*indica que o revisor aprova a dissertações em correções ou com correções mínimas*

#### II - Aprovado com Correções ( X )

*indica que o avaliador aprova o projeto com correção extensas, mas que a dissertação não precisa retornar ao avaliador para reavaliação*

#### III - Necessita Revisão ( )

*indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que avaliador quer reavaliar a nova versão da dissertação antes de emitir uma decisão final*

#### IV - Reprovado ( )

*indica que a dissertação não é adequada, nem com modificações substanciais*

Identificação do membro da banca: Robson Waldemar Ávila

CPF:

Data: 27/03/1978

Assinatura:



Comentários à coordenação do PPGBEE S:

Cordiais saudações,

Tive o prazer de ter sido um dos revisores do artigo 1: "~~First record of~~ Trypanosoma sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasiting Rhinella major in the Brazilian Amazon". As considerações já foram realizadas na época da revisão para o periódico em que o trabalho foi submetido. O segundo artigo trata de uma importante contribuição ao entendimento da relação parasito-hospedeiro, uma abordagem relativamente rara com animais silvestres no nosso país. Não tenho dúvida que o segundo trabalho será aceito em breve. Os artigos são bem escritos e traduzem a suficiência para obtenção do grau de mestre pelo acadêmico. Agradeço a oportunidade de contribuir novamente com o PPGBEE S. Aproveito para comunicar que minhas sugestões mais pontuais e considerações serão entregues ao candidato por ~~email~~.

Atenciosamente,  
Lucio Viana

#### Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado

I - Aprovado  )

Indica que o revisor aprova a ~~dissertações em correções~~ ou com ~~correções mínimas~~.

II - Aprovado com ~~Correções~~  )

Indica que o avaliador aprova o projeto com ~~correção extensas~~, mas que a ~~dissertação não~~ precisa retornar ao avaliador para ~~reavaliação~~.

III - Necessita ~~Revisão~~  )

Indica que ~~há~~ necessidade de ~~reformulação~~ do trabalho e que ~~avaliador~~ ~~dever~~ reavaliar a nova ~~versão~~ da ~~dissertação~~ antes de emitir uma ~~decisão final~~.

IV - Reprovado  )

Indica que a ~~dissertação não~~ é adequada, nem com ~~modificações~~ substanciais.

Identificação do membro da banca: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS

CPF:

Data: 30/03/2020

Assinatura:

**Comentários à coordenação do PPGBEES:**

Os comentários para a correção vão inseridos pontualmente o pdf da dissertação. O aluno deve implementar as correções para versão final da mesma.

**Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado**

**I - Aprovado ( )**

*indica que o revisor aprova a dissertações em correções ou com correções mínimas*

**II - Aprovado com Correções (X)**

*indica que o avaliador aprova o projeto com correção extensas, mas que a dissertação não precisa retornar ao avaliador para reavaliação*

**III - Necessita Revisão ( )**

*indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que avaliador quer reavaliar a nova versão da dissertação antes de emitir uma decisão final*

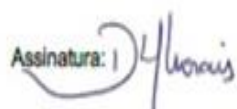
**IV - Reprovado ( )**

*indica que a dissertação não é adequada, nem com modificações substanciais*

Identificação do membro da banca:

CPF:

Data: 28/03/2020

Assinatura: 





ISSN 0001-3765 *printed version*  
ISSN 1678-2690 *online version*

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Aim and editorial policy](#)
- [Preparation of manuscripts](#)

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

### Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

### Types of Papers

#### Reviews

Reviews are published by **invitation only** and still have to undergo our peer review process. However, a proposal for a Review may be submitted via e-mail to our editorial staff ([aabc@abc.org.br](mailto:aabc@abc.org.br)). The e-mail should state the topics and authors of the proposed review, as well as the abstract, academy section and the justification why the topic is of particular interest to the field.

The AABC allows authors to deposit preprints of their submission in community preprint servers such as ArXiv.org and bioRxiv.org. However, the authors must update their entries expressly acknowledging that the article has been accepted/published by AABC.

#### Letters to the Editor

Letters to the Editor will be subjected to editing and revision and should not contain material that has been submitted or published elsewhere. Letters in reference to an article published by the AABC should not exceed 250 words (excluding references), and must be received within four weeks after online publication of the article. Letters not related to an article published by the AABC should not exceed 500 words (excluding references). A letter can have no more than ten references and one figure or table.

## Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: **1.** Front Page; **2.** Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, if applicable; **8.** Author Contributions (when the paper has more than one author); **9.** References. **10.** Figure legends, if applicable. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases, it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

## Short communications

Short communications aim to report a **concise, but important contribution on research**, which has progressed to the stage when it is considered that results should be publicized to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract (100 words or less), a short introduction (up to 200 words) and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. This section of the AABC should contain extremely relevant contributions and competition is very high.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

## Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

### Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability. They must not, however, exceed 50 pages, including all items (figures, tables, references, etc...), unless previously agreed with the Editor-in-Chief.

### Title page

The title page of the manuscript should present the following items: **1.** Title of the article (the title should be up to 150 characters including spaces, and informative to a broad scientific community); do not include abbreviations in the title. **2.** Full name(s) of all author(s); use superscript numbers right after each author name to indicate the affiliation; **3.** Professional address and [ORCID](#) of all authors, including Department and Institution name, street name and number, ZIP/Postal code, City, State and Country; **4.** Key words (four to six in alphabetical order separated by commas); **5.** Running title (a short version of the title, up to 50 characters including spaces); **6.** Academy Section to

which the content of the work belongs; **7.** Name, address, phone number, e-mail of the correspondent author, including to whom all correspondence and proofs should be sent to (please indicate the corresponding author with an \* after the name). Should any of these requirements not be met, we may unsubmit your paper and ask for corrections.

### **Abstract**

The abstract must contain no more than 200 words and present the main findings of the article, including a brief introduction, the objectives of the work and a conclusion based on the presented findings. If the authors are submitting an invited/authorized review, the abstract must introduce the main theme of the review and explicit the contribution of the revision to the field. References should not be included in the abstract.

### **Manuscript text**

All text should be written in double-space using 12-point Times New Roman or equivalent typeface. Please organize, whenever possible, the text into the following parts: **1.** Title Page; **2.** Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, if applicable; **8.** Author contributions, when there is more than one author, explaining briefly how each author has contributed for the paper **9.** References. **10.** Figure and table legends, if applicable.

Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals. All procedures must be described in detail. Use American English style to write the text. Chemical names should be provided according to IUPAC, and strains of organisms should be specified. Provide names of reagents and/or equipment suppliers. Use units and symbols according to Bureau International des Poids et Mesures (SI) symbols whenever possible.

### **Acknowledgments**

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section. Include the full name of the funding agency, country, and funded project number (if applicable).

### **Abbreviations**

These should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

### **Figure Legends**

This information must be provided at the end of the manuscript, after the abbreviations. All figures must contain a descriptive legend. The legend must contain an introductory sentence that describes the main findings. All panels (if applicable) must be identified in the figure legend by lower case letters (1a, 2a, 2b, 3c, 3d, etc.). When presenting

error bars, please inform if a number that follows the  $\pm$  sign is a standard error of mean (SEM) or a standard deviation of mean (SD). Or include in the legend if the presented result is representative of N individual experiments.

### Tables

Each table should have a brief title above it. Table footnotes should be placed below the table. Tables have to be cited in the paper in Roman numerals (Table I, Table II, Tables IV and V, etc.). Tables must be submitted as separate files in editable format, preferably as \*.doc or \*.docx file.

### Figures

Only high-quality figures will be accepted (minimum of 300 dpi). All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs, etc. Their tentative placement in the text should be indicated and all figures must be cited with their respective number along the text. Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format .PS/.EPS or .CDR (PostScript or Corel Draw) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format .TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved and sent in a separate file; 4. Figures should, in principle, be submitted at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.2 cm (two columns) wide, with maximal height for each figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm.

The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction. Colored figures are accepted just as much as b/w ones, but up to 5 black and white figures are free of charge, while every colored figure will be charged, due communication will be made in the production phase (after the evaluation process), should the author want them colored as well in the printed version. For the purpose of counting black and white figures, tables occupying two thirds of the page or having more than 12 columns or 24 rows will be considered b/w figures; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in TEX, AMS-TEX or LaTeX; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in .RTF or doc/docx for Windows.

### References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith & Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated without dots or commas. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be



used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

## REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P & LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R & CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG & MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID & SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

### *Books and book chapters*

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W & BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Rua Anfilóbio de Carvalho, 29, 3º andar  
20030-060 Rio de Janeiro RJ Brasil  
Tel: +55 21 2533-6274  
+55 21 2532-0562



[aabc@abc.org.br](mailto:aabc@abc.org.br)

## Author Guidelines

The average handling time from article submission to final decision is 33 days.

Papers should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jzo>. Full upload instructions and support are available online from the submission site via the 'Get Help Now' button. Please submit your covering letter or comments to the editor when prompted online.

Articles should be written in a style that can be understood by the general reader and be of broad interest, as outlined in the journal [Aims and Scope](#). Proposals for reviews and forum papers intended to promote discussion are particularly welcomed by the Editors. Authors wishing to submit review or forum papers are advised to contact the Editors prior to submission. Reports on the systematics of a restricted number of taxa or on topics of specialist interest will not normally be accepted. Please note that Appendices are not included in the printed version of the *Journal of Zoology* but may be published as supplementary material online. Please click [here](#) for our supplementary material guidelines.

Papers that report experimental work must comply with the standards and procedures laid down by British national or equivalent legislation and the research permit number must be stated in the acknowledgments section of your manuscript. Attention is drawn to the 'Guidelines for the Use of Animals in Research' published in each January issue of the journal *Animal Behaviour*. Papers will not be accepted if they are based on work involving cruelty to animals or if the work may have put at risk endangered populations, species or habitats. Where radio collars are used, authors must provide details on the removal of the collar at the end of the research. The Editors may seek advice from the Ethical Committee of the Zoological Society of London on ethical matters. The *Journal of Zoology* is a member of and subscribes to the principles of the Committee on Publication Ethics.

## Preprints

*Journal of Zoology* will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

## Data Sharing

*Journal of Zoology* expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. Exceptions may be granted at the discretion of the editor for sensitive information such as human subject data or the location of endangered species. Authors are expected to provide a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, to accompany their paper.

Authors of manuscripts reporting DNA and protein sequences must submit the relevant data to public databases, such as GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, EMBL Nucleotide Sequence Database <http://www.ebi.ac.uk/embl/>, DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>, UniProtKB/Swiss-Prot <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/> or another equivalent database. Animal movement data can be optionally deposited to Movebank Data Repository <https://www.datarepository.movebank.org/>. An accession number should be supplied at a relevant location in the text. Data that are integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions

published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Authors may include this data as part of the main article where practical.

## Data Citation

Authors are required to include data citations as part of their reference list. When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. Author should reference data following the format: Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI).

## Conflict of interest

Authors must declare details of any potential conflict of interest. A conflict of interest exists when professional judgement concerning a primary interest (such as animal welfare or the validity of research) may be influenced by secondary interests (personal matters such as financial gain, personal relationships or professional rivalry).

## Submission

Submission of a manuscript will be taken to imply that the material is original and that no similar paper is being, or will be, submitted elsewhere, either in whole or substantial part. Serialized studies should not be submitted and titles should not contain part numbers. The Editors reserve the right to accelerate the publication of high-profile papers and commissioned reviews. Authors may suggest up to four referees for their paper, however the Editor reserves the right to choose referees other than those suggested.

## Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

## For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/licensing/licensing-info-faqs.html> and visit <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/index.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Wiley Online Library. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of US\$3600 to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online



publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. For the full list of terms and conditions, see <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/open-access/onlineopen.html>

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form also available here (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## Presentation

Papers should not exceed 5000 words (excluding references, the abstract and figure and table legends). Typescripts must be typed in double spacing, and pages should be numbered consecutively, including those containing acknowledgements, references, tables and figures. Lines must be numbered, preferably within pages.

Manuscripts for review must consist of a single text file with figure and table legends included at the end of this file on separate pages and with figure files uploaded separately. Please note that separate high resolution figure files will be required upon acceptance (see below). Typescripts must be in English (both English and American English are acceptable). The Editors reserve the right to modify accepted manuscripts that do not conform to scientific, technical, stylistic or grammatical standards, and these minor alterations may not be seen by the authors until the proof stage.

## Conventions

The Metric system must be used and SI units where appropriate. For further details see Baron, D.N. (1988). *Units, symbols and abbreviations*. 5th edition. London: Royal Society of Medicine Series. Whole numbers one to nine should be spelled out and number 10 onwards given in numerals. If a new taxon is described, the institution in which the type material is deposited must be given, together with details of the registration assigned to it. Full binomial names should be given on the first occasion an organism is mentioned (and abbreviated thereafter), except at the beginning of a sentence. Avoid footnotes except to add information below the body of a table. Do not use initial capitals for the common names of animals unless derived from a proper noun.

## Typescript

The typescript should follow the conventional form and must include:

1. **Title page** giving a concise title (do not include scientific names in the title), followed by a list of authors' names and the institutions where the work was carried out. The name, address and email address of the corresponding author should also be given. A short title for page headings must be provided (maximum eight words).
2. **Abstract** of not more than 300 words which should list the main results and conclusions. The abstract should also explain the importance of the paper in a way that is accessible to non-specialists. Authors may submit non-English abstracts for online publication to allow the international research community greater access to published articles. Translated abstracts should be submitted in pdf format as supplementary material. The Editors have no input into the content of supplementary material, therefore accuracy is the sole responsibility of the authors.
3. **Keywords**. A maximum of eight keywords may be suggested.
4. **Introduction**, which should not provide a review of the area of work but should introduce the reader to the aims and context for the work described.
5. **Materials and Methods** should be sufficient to allow the work to be replicated, but should not repeat information described fully elsewhere.



6. **Results** should be restricted to a factual account of the findings obtained and the text must not duplicate information given in Tables and Figures.
7. **Discussion.** This should point out the significance of the results in relation to the reasons for undertaking the research.

**Please note that appendices are no longer published in the printed version of the journal. Supplementary material may be published in electronic form. Please click [here](#) for our supplementary material guidelines.**

## References

Accuracy of references is the responsibility of the author(s). References must be checked against the text to ensure (a) that the spelling of authors' names and the dates given are consistent and (b) that all authors quoted in the text (in date order if more than one) are given in the reference list and vice versa. The full title of the paper must be given together with the first and last pages.

Journal titles should be abbreviated in accordance with the Zoological Record Serial Sources, published annually by BIOSIS.

Book titles should be followed by the place of publication and the publisher. Please give the name of the editor(s) if different from the author cited.

**In the text, references must be arranged chronologically with the surname(s) of the author(s) followed by the date.**

Use *a, b*, etc. after the year to distinguish papers published by the same author(s) in the same year. Reference should not be made to unpublished data.

- i. *Two authors*: use both names and the year. Do not use et al.
- ii. *Three authors*: on first citation use all authors' names and the year. Thereafter it is usually sufficient to give the name of the first author followed by et al. and the date.
- iii. *More than three authors*: on first citation and thereafter give the name of the first author followed by et al. and the date.

**In the list, references must be arranged first alphabetically under author(s) name(s) and then in chronological order if several papers by the same author(s) are cited.**

## Examples

Lemelin, P. (1996a). Relationships between hand morphology and feeding strategies in small-bodied prosimians. *Am. J. phys. Anthrop.* (Suppl.) 22, 148.

Lemelin, P. (1996b). *The evolution of manual prehensility in primates: a comparative study of prosimians and didelphid marsupials*. PhD thesis, State University of New York at Stony Brook.

Pianka, E. R. (1978). *Evolutionary ecology*. 2nd edn. New York: Harper & Row.

Whitear, M. (1992). Solitary chemosensory cells. In *Fish chemoreception*: 103-125. Hara, T. J. (Ed.). London: Chapman & Hall.

## References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote and Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://endnote.com/downloads/styles>

## Figures

Figures should be submitted as separate electronic files and figure legends should be included at the end of the main manuscript file. Illustrations may be line drawings or photographs and should be numbered

consecutively in the text as Fig. 1, Fig. 2 etc. Component parts of figures should be labelled (a), (b), (c) etc. Captions for figures, which should be self-explanatory, must be typed, double spaced, on a separate page. Our preferred electronic file type is vector-format encapsulated post script (EPS) because these images are scaleable and therefore do not lose quality in the online PDF. All line drawings or photographs with added labelling should be supplied in EPS format. Half tones without any labelling should be supplied in TIFF format at 300 dots per inch minimum. If line drawings cannot be supplied as EPS files then they must be in TIFF format with a minimum resolution of 800 dpi. These resolutions also apply to any images embedded into an EPS file. Please [click here](#) for our artwork guidelines. Please see the illustration submission section in the Wiley house style guide available [here](#), and the electronic artwork guidelines provided [here](#).

### Line drawings

Should not be larger than **twice** the final size and in no circumstances should exceed 168 x 220 mm. The axes of graphs should be carefully chosen so as to occupy the space available to the best advantage. When reduced, the drawing should fit into either one (80 mm) or two (168 mm) columns, preferably the former. Lines should be bold enough to stand reduction to about 0.25-0.35 mm. Line drawings should be as simple as possible and many computer-generated figures, such as 3-dimensional graphs, fine lines, gradations of stippling and unusual symbols, cannot be reproduced satisfactorily when reduced. Unsatisfactory line drawings will have to be redrawn at the author's expense. Preferred symbols are open and filled circles, boxes and triangles, and these should be used consistently. Lettering should be kept to a minimum and should be self-explanatory and unambiguous and of sufficiently high quality and size to be clearly visible after reduction to final size. Lettering of all figures within the manuscript should be of uniform style in a sans serif typeface (Helvetica) and capitals should be used for the initial letter of the first word only. Bold lettering should not be used. Photographs should be the same size as they will appear in the journal and should be selected to fit neatly into one column (80 mm) or two columns (168 mm).

### Photographs

Should be labelled and numbered as for line drawings. For microscopical preparations, scale bars with appropriate units must be provided; statements of magnification are not acceptable.

### Colour figures

Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in color in print. If the author supplies color figures at Early View publication, they will be invited to complete a color charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

### Tables

These must fit the page size (220 x 168 mm) without undue reduction. Oversize tables will not be accepted. Tables should be kept simple and where possible, the use of vertical lines should be avoided. Tables are referred to as Table 1, Table 2, etc., and any sub-sections as (a), (b), etc. Footnotes in tables should be indicated by superscript a, b, etc.

### Decisions and invitations to revise

All submissions are subject to peer review and authors can expect a decision, or an explanation for the delay, within 3 months of receipt. If a revision is requested, the corresponding author should submit the revised manuscript within 2 months unless there are special reasons for a delay, agreed in advance with

the Editor. Papers not received within 2 months may be treated as new submissions and sent for further evaluation by new referees.

## Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at <http://wileyeditingservices.com/en/>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

## Accepted manuscripts

Following acceptance of a manuscript, authors will be asked to send their final version as a Word file. Figures should be saved in an EPS format and photographs saved as TIFF files. Authors will be asked to complete an Exclusive Licence Form.

## NEW: Online production tracking via Wiley Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <https://authorservices.wiley.com/author-resources/index.html> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

## Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site from where a PDF file of the proof can be downloaded. The corresponding author must provide a reliable email address and inform the Production Editor of any extended period when the email address is not effective. Instructions for returning the proofs will be sent with the proof. Excessive alterations to the text, other than printer's errors, may be charged to the author. The Editors reserve the right to correct the proof themselves, using the accepted version of the typescript, if the author's corrections are overdue and the journal would otherwise be delayed. The *Journal of Zoology* has had a change in journal style, Latin species names are no longer given in the article title but are instead inserted in the abstract, please keep this in mind when choosing the titles for submitted articles.

## Early View Publication

The *Journal of Zoology* is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text papers published online in advance of the print issue. Articles published online are complete and in their final form: the author's final corrections have been incorporated and changes cannot be made after online publication. Early View articles do not have volume, issue or page numbers, and therefore cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is assigned to an issue. After print publication the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

## Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of material submitted please inform the Production Editor when your paper is accepted for publication.

## Offprints



Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. A copy of the Publisher's Terms and Conditions for the use of the PDF file will accompany the electronic offprint and the file can only be distributed in accordance with these requirements. Additional paper offprints may be ordered when proofs are sent out, provided that the order is placed promptly (i.e. at the time of proof correction).

#### Tools

-  [Submit an article](#)
-  [Browse sample issue](#)
-  [Get Content alerts](#)
-  [Subscribe to this journal](#)
-  [Recommend to a librarian](#)

#### Journal Resources

- [Author Services](#)
- [Editing Services](#)
- [Podcasts](#)
- [Promotional Toolkit](#)
- [Subscribe/Renew](#)
- [Wiley Open Access](#)
- [Advertising](#)
- [Blog](#)
- [Publications News](#)