UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

**Detecção molecular de *Ranavirus* em espécies de anfíbios anuros selvagens
da região centro-leste do estado de São Paulo**

Pirassununga

2018

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

**Deteccção molecular de *Ranavirus* em espécies de anfíbios anuros selvagens
da região centro-leste do estado de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro
de Sousa

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FM314d Felisberto dos Reis, Marcelo
Detecção molecular de Ranavirus em espécies de
anfíbios anuros selvagens da região centro-leste do
estado de São Paulo / Marcelo Felisberto dos Reis ;
orientador Ricardo Luiz Moro de Sousa. --
Pirassununga, 2018.
39 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. FV3. 2. Leptodactylus fuscus. 3. MCP. 4.
Ranavirus . 5. Diagnóstico molecular. I. Luiz Moro
de Sousa, Ricardo, orient. II. Título.

MARCELO FELISBERTO DOS REIS

Deteção molecular de *Ranavirus* em espécies de anfíbios anuros selvagens da região centro-leste do estado de São Paulo.

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Zootecnia

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a). Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a). Dr.(a) _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por todas as vezes que me iluminou e me abençoou, dando forças para continuar a seguir e me ajudar em determinados momentos da minha vida.

A minha família, que sempre me apoiou e deu carinho, e principalmente aos meus pais Antonio e Patricia, que me ajudaram nessa trajetória.

Aos meus amigos, que sempre me deram dicas e estão presentes comigo nessa etapa da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os acontecimentos e oportunidades que tive no meu mestrado e ao longo da minha pós-graduação, assim como as diversas amizades que ele pode me propor.

Aos meus pais Antonio e Patricia, e ao meu irmão Pedro Henrique, que sempre me apoiaram e me ouviram. Agradeço pelos conselhos e ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, por me amparar, de braços abertos em um momento ruim que estive, por me ajudar e me ensinar sobre o mundo da virologia, e por ser um grande humano.

A equipe do Laboratório de Higiene Zootécnica por toda a ajuda e suporte que me deram durante o mestrado, ficando agradecido pelo companheirismo da Loiane, Thaís, Silvia, Carol, Samara, Andréa e todos os estagiários que colaboraram com o andar do projeto.

Aos meus amigos queridos: Luciana Machado, por me ajudar na captura dos animais e por ser uma grande pessoa, ao Júlio Come, por sempre me ouvir e ser parceiro dos vinhos, a turma dos “Amiguxus”: Thayssa, Brunna, Rayssa e Thaís, que sempre damos risadas e descontraímos, e em especial a minha namorada Mariana, que me ajudou em diversos momentos, e me fez seguir adiante em vários momentos da minha vida, tanto profissional quanto emocional.

A CAPES pela concessão da bolsa para o desenvolvimento do projeto.

E a todos que, de alguma maneira, indireta ou diretamente, me ajudaram nessa etapa da vida. Muito obrigado a todos vocês.

“A verdadeira amizade supera qualquer desafio, ultrapassa qualquer obstáculo, suporta qualquer dor, nunca te abandona e faz da esperança um oxigênio pra vida.”

Alessandra Martins

RESUMO

REIS, M. F. Detecção molecular de *Ranavirus* em espécies de anfíbios anuros selvagens da região centro-leste do estado de São Paulo. 2018. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O objetivo do trabalho foi realizar investigação sobre ocorrência de ranavirose, infecção causada por vírus do gênero *Ranavirus*, família *Iridoviridae*, em anfíbios anuros silvestres nos municípios de Porto Ferreira e Pirassununga, cidades da região centro-leste do estado de São Paulo, Brasil, utilizando diagnóstico molecular. Ao todo, 40 anuros adultos silvestres da espécie *Leptodactylus fuscus* foram capturados nos municípios citados, sendo coletados três órgãos alvos (fígado, baço e rins) de replicação viral, com registro de eventuais alterações macroscópicas nesses órgãos, e dos quais extraiu-se DNA. Na sequência, realizou a reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se *primers* específicos para o gene MCP (*major capsid protein*) de *Frog Virus 3* (FV3), ranavírus circulante no Brasil, com isolado de FV3 pertencente ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP empregado como controle positivo e água livre de nuclease como controle negativo. Como resultados, em relação às alterações macroscópicas, somente um espécime apresentou hepatoesplenomegalia e hipopigmentação do coração. No entanto, ao diagnóstico molecular, nenhum dos 40 animais amostrados foi positivo à ranavirose. Tal resultado pode estar associado tanto a fatores intrínsecos (espécie, idade, resposta imune) como extrínsecos ao hospedeiro (alterações ambientais, patogenicidade viral). Em paralelo, em rãs de criação comercial, surtos por FV3 já foram detectados em vários ranários do país; contudo, essa é a primeira vez que uma prospecção para ranavirose é realizada especificamente com representantes da espécie *Leptodactylus fuscus*, em municípios da região centro-leste do estado de São Paulo. Assim, são necessárias mais pesquisas com espécies silvestres de rãs, particularmente no entorno de ranários com histórico de animais positivos para FV3, para melhor conhecimento da epidemiologia e dinâmica de transmissão da ranavirose entre rãs silvestres.

Palavras-chave: *Iridoviridae*. Diagnóstico. *Frog Virus 3*. *Leptodactylus fuscus*.

ABSTRACT

REIS, M. F. Molecular detection of Ranavirus in wild anuran species of the central-eastern region of the state of São Paulo. 2018. 40 f. M. Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The objective of this study was to investigate the occurrence of ranavirus infection caused by virus belonging to genus *Ranavirus*, *Iridoviridae* family, in wild anuran amphibians from Porto Ferreira and Pirassununga municipalities, located in the central-eastern region of the state of São Paulo, Brazil, using molecular diagnostics. In all, 40 wild adult anurans of the species *Leptodactylus fuscus* were captured in the mentioned municipalities, and three target organs (liver, spleen and kidneys) of the viral replication were collected, being possible macroscopic changes in these organs recorded, and from which DNA was extracted. In the sequence, the polymerase chain reaction (PCR) was carried out using primers specific for the MCP (major capsid protein) gene of Frog Virus 3 (FV3), a circulating ranavirus in Brazil, with a FV3 isolate belonging to the biobank of the Laboratory of Zootechnical Hygiene of FZEA-USP employed as positive control and nuclease-free water as negative control. As a result, in relation to macroscopic alterations, only one specimen showed hepatosplenomegaly and heart hypopigmentation. However, for molecular diagnostics, none of the 40 animals sampled were positive for ranavirus. This result may be associated to both intrinsic (species, age, immune response) and extrinsic (environmental changes, viral pathogenicity) factors to the host. In parallel, FV3 outbreaks have already been detected in several frog farms in the country. However, this is the first time that a prospection for ranavirus infection is performed specifically with specimens of the *Leptodactylus fuscus* from municipalities in the central-eastern region of the state of São Paulo. Thus, more studies on wild-type frogs are needed, particularly in the settings of frog farms with positive animal history for FV3, to better understand the epidemiology and dynamics of ranavirus transmission among wild frogs.

Keywords: *Iridoviridae*. *Ranavirus*. *Frog Virus 3*. *Leptodactylus fuscus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de anfíbios distribuídos no mundo	14
Figura 2 – Ciclo Reprodutivo dos anuros	16
Figura 3 – Espécie <i>Leptodactylus fuscus</i> (rã-assovio) e uma de suas formas de reprodução ...	16
Figura 4 – Diferença entre rã pimenta (esquerda) e rã touro gigante (direita)	19
Figura 5 – Distribuição mundial de FV3	21
Figura 6 – Apresentação do vírion de <i>Ranavirus</i>	22
Figura 7 – Local de coleta das amostras	25
Figura 8- Captura da espécie <i>Leptodactylus fuscus</i> , análise macroscópica e extração dos órgãos alvos	26
Figura 9 - Análise espectrofotométrica das extrações de DNA.....	27
Figura 10- Fotografias dos géis de agarose 1,5% utilizando a coloração SYBR® Gold sob visualização à luz UV	29
Figura 11 – Análise macroscópica dos órgãos do <i>Leptodactylus fuscus</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para investigação de <i>Ranavirus</i> nas amostras teciduais.....	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FV3	Frog Virus 3
MCP	Major Capsid Protein – Proteína Principal do Capsídeo
OIE	Organização Internacional das Epizootias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotações por minuto
TAE	Tampão Tris – Acetato - EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Anfíbios selvagens na natureza e sua importância	14
2.2. Ranicultura no Brasil e no mundo	14
2.3. <i>Ranavirus</i>	14
2.3.1. Classificação e distribuição mundial	19
2.3.2. Morfologia e biologia	21
2.3.3. Importância epidemiológica	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Autorização do Sisbio/CEUA	25
4.1.1. Coleta das amostras	26
4.2. Extração de DNA dos tecidos	26
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase	27
4.4. Eletroforese das amostras	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Animais amostrados	29
5.2. Análise macroscópica dos animais	30
5.3. Análise de PCR e verificação de presença de <i>Ranavirus</i>	30
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Uns dos grupos de animais mais antigos e importantes do mundo são os anfíbios, sendo sua existência datada a mais de 70 milhões de anos (ALFORD; RICHARD; MCDONALD, 2007). São animais pecilotérmicos, não possuidores de bolsa amniótica e que são pertencentes à classe Amphibia (FROST, 2017). Em relação à biodiversidade, apresenta-se em quase toda a extensão territorial do planeta, somente não sendo encontrados nos desertos e nos Pólos Norte e Sul com um número estimado de espécies entre 8.800 a 12.000 distribuídas pelo planeta, ultrapassando o número de mamíferos e até mesmo de répteis (ALFORD, 2011).

Além disso, são importantes para a natureza, uma vez que se apresentam como indicadores do habitat em que vivem, sendo importantes na dinâmica do ciclo de vida de diferentes animais, seja como predadores de alguns tipos de insetos e aracnídeos, seja como presas de algumas aves e cobras, no ciclo dos fluxos de energia entre a água e a terra. Uma vez que a denominação anfíbia vem do grego e significa “vida em ambos”, eles conseguem viver em ambos ambientes citados, e são de grande importância para o controle de pragas.

Vale destacar também sua participação em diferentes áreas, como na medicina, e também, na produção animal - ranicultura - sendo uma das áreas de maior interesse para investimento comercial, porque apresentam um elevado potencial produtivo, além de bom retorno financeiro e eficiência na conversão alimentar, particularmente nas espécies de interesse zootécnico. Dentre estas, está a *Lithobates catesbianus* (rã-touro gigante), vinda dos Estados Unidos e que se adaptou muito bem ao clima tropical do Brasil, sendo a única espécie autorizada para criação e produção comercial no país.

Hoje, o Brasil se apresenta como um dos principais países produtores de rã no mundo (LIMA; AGOSTINHO, 1995; FROST et al., 2006).

Apesar de todas as características citadas e por ser uma classe animal de grande importância tanto para a biodiversidade como para a produção alimentar, vale destacar que os anfíbios, principalmente os da ordem Anura, apresentam-se com alto risco de extinção. Estudos indicam que 37% das espécies possuem reais possibilidades de extinção em médio prazo, e, segundo Hof *et al.* (2011), até o ano de 2080, a perspectiva é que mais da metade das espécies será extinta da Terra.

Vários são os motivos para a redução dessa diversidade, como mudanças climáticas, ações antropogênicas (liberação de resíduos químicos e agrotóxicos no ambiente, destruição do habitat) e surgimentos de doenças emergentes. Destaca-se a ranavirose, que já ocasionou mortalidade em 72 espécies de anfíbios no mundo, assim como em peixes e répteis, destacando-se América do Norte, Europa e Ásia como as principais regiões com surtos da doença registrados (MILLER; GRAY; STORFER, 2011; ROLLINS-SMITH, 2016). Nesse contexto, a espécie *Frog Vírus 3* (FV3) o agente etiológico mais comum da ranavirose, capaz de infectar não apenas animais de vida livre, como também espécies comerciais, gerando elevado impacto econômico em criações comerciais (GRAY; CHINCHAR, 2015; PRICE, 2017) .

No Brasil, alguns ranários comerciais já identificaram a espécie FV3 de ranavírus, tendo sido detectada em diversas regiões, como no centro-oeste (GALLI *et al.*, 2006; MAZZONI, 2009; MESQUITA, 2014), e na região Sudeste, onde no interior do estado de São Paulo já foram identificados em 3 ranários de diferentes regiões (OLIVEIRA, 2015; ALENCAR, 2016). Entretanto, os relatos ou estudos envolvendo a pesquisa de ranavirose em anuros de vida livre são escassos.

Diante do impacto que a doença provoca, das escassas informações em estudos com anuros silvestres, e em face à dinâmica de interação entre ambientes de criação comercial e silvestres, torna-se importante e urgente a investigação da ocorrência da ranavirose em espécies de rã brasileiras, no ambiente silvestre, abordagem objetivada no presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anfíbios selvagens na natureza e sua importância

Os anfíbios são vertebrados tetrápodes da classe *Amphibia* que está presente em quase todo o planeta, com exceção das regiões desérticas, regiões geladas e em ilhas oceânicas mais remotas do planeta (Figura 1) (STUART *et al.*, 2008).

O Brasil possui a maior riqueza de espécies anuras do mundo, com um total de 1080 espécies já catalogadas, correspondendo mais de 13,2% de todas as espécies do planeta (DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016), tendo o estado de São Paulo como um dos estados com o maior número de espécies já descritas na literatura, com mais de 236 espécies já catalogadas (sendo 230 da ordem *Anura* e 6 da ordem *Gymnophiona*), representando um total de 27% desse grupo no Brasil (ROSSA-FERES *et al.*, 2011). Um dos principais motivos para o país apresentar esta proporção é decorrente dos grandes biomas existentes, destacando: a mata atlântica, o cerrado, o pantanal, os pampas e a floresta amazônica (MITTERMEIER *et al.*, 2005).

Figura 1 - Número de espécies de anfíbios distribuídos no planeta.

Fonte: Global Amphibian Assessment. Global Diversity of Amphibian Species. Disponível em: <amphibianweb.org/images/gaa_global_amphib_diversity.jpg>. Acesso em: 19 de Agosto de 2017.

Na atualidade, existem mais de 7000 espécies de anfíbios catalogadas e conhecidas na natureza, sendo divididos em três grupos principais: os sapos, as rãs e pererecas, pertencentes à ordem *Anura*, salamandras, ordem *Caudata*, e cecílias, ordem *Gymnophiona* (STUART *et al.*, 2008).

Os *Anuros* constituem a ordem com mais espécies catalogadas, com aproximadamente 5208 espécies já identificadas, destacando o clima tropical como o bioma com a maior diversidade dessa ordem no mundo. De uma forma geral, apresentam uma variedade de aspectos morfológicos; entretanto, destaca-se nos sapos e rãs adultas a ausência de caudas. Apresentam corpo limitado, porém diferenciando quando comparado com outros animais vertebrados, e com uma forma adaptada para o seu habitat, tendo como característica, em sua maioria, cabeça relativamente grande e achatada contendo poucos ossos, corpo curto e duas patas traseiras bem desenvolvidas, utilizadas para as funções de nadar e/ou saltar para capturar sua presa (BLAUSTEIN, 1994). Esses apresentam: sistemas esquelético, muscular e nervoso, uma pele com ausência de exoesqueleto escamoso, aparelhos circulatório, digestivo, excretor, reprodutor e respiratório (STORE; USINGER; STEBBINS, 1991; COUTINHO, 2002).

O ciclo reprodutivo dos anfíbios ocorre desde a primavera até o final do verão, caracterizada pelas chuvas e temperaturas quentes, que são condições essenciais para o desenvolvimento dos ovos. Os ovos aquáticos são depositados pela fêmea e irão se desenvolver em girinos exotróficos e estes, por sua vez, sofrerão metamorfose, diferenciando em sua forma adulta, podendo ser terrestres ou semi-aquáticos de quatro patas. Parte do desenvolvimento energético desses animais é obtida da gema vitelogênica e, no período larval, é derivada do alimento na água.

Os anfíbios – em especial, os anuros – possuem 29 métodos de reprodução conhecidos, mostrando a grande diversidade de reprodução, maior do que qualquer outro grupo de vertebrados tetrápodes (Figura 2) (HADDAD; PRADO, 2005).

Em algumas espécies de anuros, como por exemplo, *Lepdotactylus fuscus* SCHNEIDER, 1799 (Figura 3), os machos da espécie constroem câmaras subterrâneas de formato oval em margens secas perto de lagos ou em poças temporárias ocasionadas pelas chuvas. Após a construção, utiliza do cochar da espécie, similar a um assovio, para atrair as fêmeas próximas dessas câmaras, nas quais ocorrerá o acasalamento. Depois da deposição dos ovos, a fêmea fica abrigada dentro do local, enquanto o macho irá defender o abrigo lutando contra outros machos da mesma espécie (LUCAS *et al.*, 2010).

Figura 2 - Ciclo reprodutivo dos anuros

Fonte: HAYASAKA, E., NISHIDA, S. M. Reprodução de anfíbios. Disponível em: http://ww2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Origami/Documentos/Anfibios.htm. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

Figura 3 - Espécie *Leptodactylus fuscus* (rã-assoio) (A) e uma de suas formas de reprodução (B).

Fonte: BERNARDE, P. S. Reprodução de anfíbios anuros. Disponível em: <http://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html>. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

Os anfíbios desempenham importantes funções em diferentes habitats, tanto de ambientes terrestres quanto de ambientes aquáticos. Vale destacar que várias espécies desses animais são fundamentais para o equilíbrio biológico por serem capazes de viver nos ambientes citados, e servirem como parâmetro para avaliação de alterações do meio onde se encontram (HEYER, 1994).

São encontrados em maior abundância em ambientes de clima temperado e tropical, podendo exceder outras classes de vertebrados, como os répteis, as aves e os mamíferos, tanto na proporção de biomassa quanto na proporção de indivíduos por área. Uma provável

razão de seu maior número deve-se ao fato de serem predadores naturais de invertebrados (principalmente insetos) presentes nos ambientes úmidos e terrestres, uma vez que grande parte das larvas de insetos são degradadores de matéria vegetal, principalmente algas e detritos (STEBBINS; COHEN, 1995). Em algumas regiões onde há plantações de arroz, os anfíbios são de suma importância para controle de pragas (ABDULALI, 1985), e acredita-se que uma redução do número de anfíbios nessas plantações poderia levar ao aumento dessas pragas e, posteriormente, um aumento da quantidade de aplicação de inseticidas e outros agroquímicos necessários para combatê-las.

Esses animais são importantes para estudos em áreas médicas, por serem considerados uma fonte notável de substâncias químicas que podem ter importante valor terapêutico, sendo que na China o uso desses animais para esse fim é datado há mais de 1500 anos (FEI *et al.*, 2006).

Substâncias encontradas no veneno de algumas espécies de anfíbios foram identificadas e isoladas para estudos, sendo descritas em seis categorias: amins biogênicas, bufodienolides (também conhecido com bufogeninas), alcaloides, esteroides, peptídeos e proteínas (PUKALA *et al.*, 2006). Um estudo produzido por Badio e Daly (1994) utilizou o veneno extraído da espécie *Epipedobates tricolor* (rã-fantasma) e isolou o alcaloide epibatidina, um potente analgésico não viciante e que é em torno de 100 a 200 vezes mais eficiente que a morfina.

2.2 Raniculturas no Brasil e no mundo

Além de terem importância no meio ambiente, os anfíbios, principalmente as rãs, têm sido utilizadas em criações comerciais. Um dos primeiros países a explorar o comércio de rãs foi Cuba, no século 20, com a introdução da espécie *Lithobates catesbeianus*, conhecida popularmente como rã-touro, que apresentou uma boa adaptação ao local e possibilitou o aumento populacional da espécie (LIMA, AGOSTINHO, 1992).

No Brasil, a ranicultura começou na década de 1930, quando Tom Cyril Harrison, ao vir para o país, trouxe 300 espécimes para o Estado do Rio de Janeiro, sendo implantado, em 1935, o primeiro ranário do país. Contudo, foi nos anos de 1980 que houve uma maior valorização da produção zootécnica com estudos mais aprimorados quanto aos métodos de manejo, manutenção da temperatura e da água onde os animais eram alojados, criação e

produção de rações apropriadas (FERREIRA; PIMENTA; PAIVA-NETO, 2002; RODRIGUES et al., 2010).

Nesses parâmetros e com pesquisas cada vez mais aprimoradas nesse campo da aquicultura, o Brasil apresenta uma boa produção, e sendo essa exportada para outros países, porque a demanda nacional é menor, e assim, tornando-se um negócio atrativo para novas empresas interessadas nessa atividade (OLIVEIRA, 2017).

Em tempo, *Lithobates catesbeianus* apresenta elevado potencial produtivo, eficiência na conversão alimentar e retorno financeiro positivo no comércio de carnes e outros produtos, despertando assim a atenção de diversas empresas e investidores. Do gênero *Lithobates*, é uma das maiores espécies, podendo alcançar 20 cm desde o focinho até as patas traseiras, e alcançando um peso de 800 gramas a 1 quilogramas quando na fase adulta. Sua coloração é de um verde bem claro, quase beirando ao pálido, apresentando manchas marrons nas partes dorsal e lateral do corpo, e sua pele não apresenta nenhum tipo de ruga, verruga ou espinhos, o que facilita no momento do abate do animal. Quanto às suas características zootécnicas, apresenta: alta prolificidade e rusticidade e um crescimento bem precoce e produção maior em relação às espécies nativas, como a rã pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) (Figura 5), que apresenta um tamanho menor comparado à rã touro, e possui alta rugosidade em sua pele, além de espinhos para confrontar o macho de outras espécies (FERREIRA, PIMENTA, PAIVA NETO, 2002).

A carne de rã, por sua vez, apresenta-se mais saudável quando comparada a de outros animais de produção (bovinos, suínos, etc.), possuindo uma menor porcentagem de calorias, menor teor de gordura (3%), além de aminoácidos necessários para o ser humano, e podendo ser recomendada para crianças com sensibilidade à proteína animal de outras espécies, uma vez que a carne dos anfíbios possui uma alta digestibilidade (FREITAS et al., 2017).

Figura 4 - Diferença entre Rã pimenta (esquerda) e Rã touro gigante(direita). Nota-se a diferença na pele dos animais.

Fonte: BERNARDE, P. S. Rã – pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*). Disponível em: <herpetofauna.com.br/anfibios.htm>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

HOWE, C. D. North American bullfrog (*Rana catesbeiana*). Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Rã-touro-americana>>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

Criadores precisam monitorar a criação e produção do animal, uma vez que o aumento da tecnificação contribui para o desenvolvimento de potenciais agentes patogênicos oportunistas. Dentre eles, os que mais afetam a rã touro são: a doença “Red Legs” ocasionada geralmente por diversos gêneros de bactérias, como *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*; que podem afetar a produção e, principalmente, gerar despesas e gastos com os animais, além de acometer mortalidade entre os animais adultos e girinos. Uma boa higienização das baias como troca da água utilizada, e cuidados nos manejos dos ovos e dos girinos são fundamentais para se ter um melhor cuidado com o animal e evitar exposição às doenças (HIPOLITO *et al.*, 2012).

2.3 Ranavirus

2.3.1. Classificação e distribuição mundial

Ambos os diferentes grupos de anfíbios, tanto de vida livre quanto os de criação comercial, podem sofrer com diferentes tipos de estresses. Alguns desses fatores de estresse ecológico são uma das maiores preocupações em espécies tanto ameaçadas de extinção quanto as de ranários, que podem inclusive dividir o mesmo espaço no qual convivem (ROLLINS-SMITH, 2016). Um fator que é determinante para a mortalidade desses animais são as doenças ocasionadas por vírus ou fungos que podem concorrer para a diminuição ou extinção de populações (DE CASTRO; BOLKER, 2005; EARL *et al.*, 2016).

Uma das doenças que tem sido incriminada na redução acentuada de espécies anfíbias é a micose por *Batrachochytrium dendrobatidis*, um fungo emergente que vem ocasionando o

declínio de inúmeras espécies de anfíbios de vida livre (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2003; WAKE; VREDENBURG, 2008; FORZAN et al., 2010; JULIAN et al., 2016).

Ranavírus é um patógeno que tem ocasionado diversos óbitos, não somente em anfíbios, mas também em peixes e répteis. Classificado dentro da família *Iridoviridae*, cujas espécies conhecidas são: *Amblystoma tigrinum virus* (ATV), *Bohle iridovirus* (BIV), *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV), *European catfish virus* (ECV), *Frog virus 3* (FV3) e *Santee-Cooper ranavirus* (SCRV) (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010a), e a mais recente, o *Singapore grouper iridovirus* (CHINCHAR et al., 2017).

Estes vírus já foram identificados em espécies animais de diferentes regiões do mundo como em rãs da América do Norte, América do Sul, Ásia, Austrália e Europa (MAZZONI et al., 2009), em peixes na América do Norte, Ásia, Austrália e Europa (HUANG et al., 2011) e em répteis na África, América do Norte, Austrália e Europa (DRURY; GOUGH; CALVERT, 2002) (Figura 5). Na Ásia, por exemplo, iridovírus foi identificado em sete pisciculturas de Taiwan, entre os anos de 2001 até 2009, e analisados para identificação de quais espécies estavam a acometer a mortalidade dos animais nessa região, e foram identificadas 4 espécies diferentes para a mesma família de vírus (HUANG et al., 2011).

Figura 5: Distribuição mundial de FV3.

Fonte: DUFFUS, A. L. J. et al. Distribution and host range of ranaviruses. In: GRAY, M. J.; CHNCHAR, V. G. (Eds.).

Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. New York: Springer International Publishing, 2015. p. 9 – 57.

O FV3 foi uma das primeiras espécies de ranavírus a ser identificada, e não apresentava cepas tão virulentas a ponto de serem letais tanto para as larvas como para anfíbios adultos, ocasionando somente algumas infecções assintomáticas e com certa persistência nos animais (CLARK *et al.*, 1969; PRICE *et al.*, 2017). Contudo, essa espécie tem atingido diversas espécies de anuros – podendo ser animais direcionados para o comércio ou de vida livre, principalmente os girinos – e até outros animais como peixes e répteis, causando altos índices de mortalidade no planeta (GREEN *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2011; DUFFUS *et al.*, 2015).

A América do Norte foi o primeiro continente a detectar a presença do FV3, sendo o patógeno que mais provocou mortalidade em diferentes espécies de anuros nos países do subcontinente, principalmente Estados Unidos e Canadá. Ocorreu um crescimento de mais de noventa por cento de casos após o ano de 2010, tendo-se espécimes de mais de 105 espécies de anfíbios infectadas em um total de 25 países diferentes, estando assim presente em diferentes continentes (GRAY; CHINCHAR, 2015).

2.3.2 Morfologia e biologia

Quanto à morfologia, ranavírus apresentam capsídeo icosaédrico de 120 a 200 nm de diâmetro com genoma de DNA dupla fita linear (aproximadamente de 140 a 200 Kb), contendo variadas proteínas de membranas, e um capsídeo icosaédrico que contém a proteína de capsídeo maior (MCP), tendo um peso aproximado de 48 kilo Dalton (kDa), e podendo apresentar um capsídeo viral ou não (Figura 6) (CHINCHAR *et al.*, 2009). Quanto ao mecanismo de infecção, ranavírus pode ser transmitido em água ou em sedimento, entretanto, o vírus, principalmente o FV3, tem uma maior taxa de sobrevivência em estações frias (outono e inverno), uma vez que seu título começa a cair em temperaturas superiores a 30°C, principalmente nos sedimentos, no qual a taxa de sobrevivência é significativamente menor do que na água (MUNRO *et al.*, 2016). Estão associados à doença sistêmica, com fatalidade em grande parte dos casos, em que a doença manifesta-se clinicamente como uma severa hemorragia sistêmica (MILLER *et al.*, 2007; EARL *et al.*, 2016) e síndrome ulcerativa crônica com posterior necrose e apoptose, em geral, 3 dias após a exposição do patógeno na água (HOVERMAN *et al.*, 2011; EARL *et al.*, 2016). Em girinos infectados, notam-se vários focos hemorrágicos que irão afetar o tecido subcutâneo nas regiões plantar das patas, inguinal

e ventral, além do edema. Dadas as características apresentadas, são considerados de notificação obrigatória pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2017).

Figura 6 - Apresentação do vírion de *Ranavirus*.

Legenda: Apresentação de vírion sem e com envelope, apresentando também as estruturas do vírus.

Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <viralzone.expasy.org/585?outline=all_by_species>, acesso em: 08 de outubro de 2017.

2.3.3. Importância epidemiológica

Existem várias ocasiões nas quais o vírus pode contribuir para o declínio das espécies, entre elas: infectar espécies hospedeiras com maior susceptibilidade, permanecer por mais tempo viável no ambiente externo e, dada a proximidade natural entre espécies diferentes, a possibilidade de transmissão interespecie torna-se maior (HOVERMAN *et al.*, 2011; NAZIR; SPENGLER; MARSCHANG, 2012; BRENES *et al.*, 2014; JOHNSON; BRUNNER, 2014; EARL *et al.*, 2016).

Por outro lado, o declínio populacional dos anfíbios está associado também à virulência do vírus e sua interação com o sistema imune do hospedeiro. A propósito, o conhecimento sobre a imunidade dos animais ectotérmicos ainda permanece mais restrito quando comparado ao de mamíferos; contudo, anfíbios exibem respostas imunes adaptativas pouco eficazes, com uma baixa produção de linfócitos T, menos isoformas de anticorpos e, conseqüentemente, uma memória imunológica menos intensa quando comparada a dos mamíferos (ROBERT; OHTA, 2009).

No Brasil, os registros de casos identificados da doença, em sua maioria, são de ranários comerciais, sendo os primeiros estudos com a espécie FV3 de *Ranavirus* realizado

por Galli e colaboradores (2006), ao detectarem no sudoeste de Brasília e em Montevideu - Uruguai, girinos positivos para FV3. Contudo, o primeiro caso de ranavirose registrado no país ocorreu em Goiás, no qual aproximadamente 500 girinos da espécie rã touro americana (*Lithobates catesbeianus*) foram encontrados mortos em três diferentes ranários comerciais, com a presença dos sinais clínicos previamente descritos, tendo a confirmação da infecção dada e caracterizada por técnicas moleculares, histopatológicas e microscopia eletrônica (MAZZONI *et al.*, 2009). No mesmo estado, exemplares de tilápia (*Oreochromis niloticus*) já foram confirmados com presença de *Ranavirus* em local próximo a ranários comerciais também em Goiânia-GO, sendo positivos para PCR quantitativo, necessitando, portanto monitoramento quanto à disseminação do vírus para outras espécies animais (MESQUITA, 2014).

Em São Paulo, recentemente, a presença do FV3 foi registrada em três diferentes regiões do estado: municípios de Jquitiba (sul), Matão (norte) e Tapiratiba (leste) (OLIVEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2017), possuindo uma alta mortalidade de rã-touro nas regiões analisadas, assim como também no nordeste do Estado, tendo a presença e confirmação da doença em ranários (ALENCAR, 2016).

Para um diagnóstico laboratorial da doença, preconizam-se técnicas moleculares e isolamento em cultivo celular, sendo este o padrão ouro recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Para a realização do isolamento, são necessários testes sorológicos (ex.: ELISA) ou testes de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando a amplificação de fragmento do gene MCP como indicador de ranavirose (OIE, 2017). Quanto à prevenção e controle da doença, há ainda sérias limitações, e em geral, estão baseadas em medidas adequadas de quarentena, manejo higiênico do local da infecção e eutanásia de animais infectados, sendo que não há vacinas comerciais disponíveis no mercado até o presente momento (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010b).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de ranavirose em anfíbios anuros silvestres, pertencentes às espécies *Scinax fuscomarginatus* (perereca-chorona) e *Leptodactylus fuscus* (rã-assovio), oriundos dos municípios de Porto Ferreira e Pirassununga, região centro-leste do estado de São Paulo, Brasil.

Objetivos específicos

1. Realizar a avaliação macroscópica nos espécimes capturados, quanto à presença ou ausência de sinais clínicos e alterações morfológicas de órgãos internos sugestivos de ranavirose;
2. Realizar o diagnóstico molecular para *Frog Virus 3* (FV3), através de PCR e tendo-se o gene MCP (*major capsid protein*) viral como alvo, a partir de fragmentos teciduais dos espécimes capturados;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Autorização do Sisbio / CEUA

Por se tratar de espécies da fauna brasileira, este projeto foi autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Preservação (ICMBio), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) com o código de autenticação SISBIO nº: 72166447, bem como foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, sob o protocolo nº 3503101116.

4.1.1. Coleta das amostras

Foram realizadas 6 sessões de coleta a campo na tentativa de se capturar exemplares das espécies *Leptodactylus fuscus* (rã assovio) e *Scinax fuscomarginatus* (perereca chorona) em rios, poças temporárias e lagos das seguintes localidades: Campus Fernando Costa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), localizado em Pirassununga, SP, coordenadas: 21° 57'40''S, 47° 28'01''W, e no município de Porto Ferreira, coordenadas: 21° 57'05'' S, 47° 25'07''W, municípios localizados na região Centro-Leste do Estado de São Paulo (Figura 7). As capturas dos animais foram realizadas com puçá e/ou coleta manual, no período entre 18 de novembro de 2016 e 06 de dezembro de 2016. Todas as coletas foram realizadas no período noturno e chuvosos, com formação de poças temporárias.

Figura 7 - Locais de coleta das amostras.

Legenda: Em (A) município de Pirassununga, em (B), município de Porto Ferreira. Fonte: Própria autoria, 2017.

Após a captura e eutanásia, os anuros foram identificados e examinados para sinais clínicos da doença, como pontos hemorrágicos, ou alterações morfológicas, como hepatoesplenomegalia, durante o procedimento de necropsia (Figura 9). Em consonância com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (BRASÍLIA, 2013), fez-se a utilização de barbitúrico (benzocaína) como anestésico para a eutanásia dos animais, utilizando hidrocloreto de benzocaína, com concentração de 250 mg/ L. Após constatação do óbito, os animais foram posicionados sobre base de isopor, com suas extremidades presas por alfinete. A fim de se evitar qualquer tipo de contaminação, optou-se pela esterilização de todo o material utilizado para a evisceração e coleta dos órgãos de interesse (fígado, baço e rins), autoclavando-se os microtubos coletores, as pinças, o cabo e a lâmina do bisturi. Na sequência, em ambiente estéril e com o auxílio de um bico de Bunsen, realizou-se a extração dos órgãos dos espécimes coletados, para realização do diagnóstico molecular.

Figura 8 – Captura da espécie *Leptodactylus fuscus*, análise macroscópica e extração dos órgãos alvos.

Legenda: Em A, espécie *Leptodactylus fuscus* foi anestesiada para a extração dos órgãos alvos (fígado, baço e rins), seguindo o protocolo descrito acima. Em B, evisceração e análise macroscópica dos órgãos alvos. Fonte: Própria autoria, 2017.

4.2. Extração de DNA dos tecidos

Aproximadamente 20 mg de tecidos (*pool* de fígado, baço e rins) foram fragmentados e submetidos à extração de DNA. Com utilização do Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante o DNA foi eluído em 60 µL de água livre de nucleases e armazenado em freezer, na temperatura de – 20°C até a realização da PCR. A pureza e concentração do DNA foram mensuradas por análise espectrofotométrica (DS-11, DeNovix, EUA) (Figura 10), utilizando-se a razão de absorbância A_{260}/A_{280} para evitar concentrações maiores que 250 ng/µL, seguindo as recomendações do kit utilizado.

Figura 9 - Análise espectrofotométrica das extrações de DNA.

Fonte: Própria autoria, 2017.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os pares de *primers* MCP1 e MCP2 e protocolos de termociclagem foram realizados de acordo com as recomendações MARSH et al. (2002) e MAZZONI et al. (2009), objetivando-se amplificação de fragmentos do gene MCP de *Ranavirus* (tabela 1). Amostras de isolado brasileiro de FV3, mantido em cultivo celular de BF-2 (*bluegill fry* ATCC CCL 91) e pertencente ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP (ALENCAR, 2016), foram utilizadas como controle positivo, enquanto alíquotas de água livre de nucleases foram utilizadas como controle interno negativo. Para o preparo do mix da PCR, foram utilizados: 200ng de DNA da amostra extraído, 9,5 µL de água Nuclease Free, 10 µL de primer senso específico (MCP-R), 10 µL de primer antissenso específico (MCP-F) e 12,5 µL

GoTaq® Colorless Mastermix 2X (PROMEGA, EUA), totalizando um volume final de 25 µL (Figura 12).

O protocolo de termociclagem (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), utilizado para a reação de amplificação, consistiu em: incubação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme as recomendações da OIE, 2017.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR para investigação de *Ranavirus* em amostras teciduais.

Nome	Orientação	Sequência (5'-3')	Gene	Produto (pb)
M151	Senso	AACCCGGCCTTTCGGGCAGCA	<i>MCP-1</i>	321 ^a
M152	Antissenso	CGGGGCGGGGTTGATGAGAT		
M153	Senso	ATGACCGTCGCCCTCATCAC	<i>MCP-2</i>	625 ^b
M154	Antissenso	CCATCGAGCCGTTTCATGATG		

Legenda: a e b – MARSH *et al.* (2002)

4.4. Eletroforese das amostras

Alíquotas dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE - 1X). Foram pipetados 8µL das reações para os controles positivo e negativo, bem como de cada uma das amostras teciduais processadas, com mais 2µL do marcador azul de bromofenol, totalizando um volume final de 10 µL, adicionando-se à cada corrida eletroforética 10µL de marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (100bp; DNA Ladder, PROMEGA, EUA). Para cada corrida, as seguintes condições foram utilizadas: 90 volts, 0,03 ampéres e tempo de corrida de 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, o gel foi submetido à coloração em solução SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, EUA) e observado à luz ultravioleta (UV), utilizando-se o sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-PixImage (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Figura 10 - Fotografias dos géis de agarose a 1,5% utilizando a coloração SYBR[®] Gold, com o uso de luz UV.

Legenda: MPB- Marcador de 100 pares de base (pb). C+ - Controle positivo (FV3). C - com água livre de nuclease como controle negativo. Ilustram-se os resultados negativos em comparação ao controle positivo do FV3. Fonte: Própria autoria, 2017.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Animais amostrados

Um total de 40 animais foi capturado nos municípios de Porto Ferreira e Pirassununga, São Paulo. Todos os animais capturados eram pertencentes à espécie *Leptodactylus fuscus*, popularmente conhecida como rã-assovio. Exemplares da espécie *Scinax fuscomarginatus* (perereca chorona) não foram encontrados nos ambientes analisados, podendo essa ausência estar associada a fatores biológicos e/ou ecológicos. Espécimes de rã-assovio capturadas nos mesmos municípios amostrados foram positivas ao diagnóstico molecular para ranavírus, em estudo prévio conduzido no Laboratório de Higiene Zootécnica - FZEA/USP, entre 2013-2014, porém sem confirmação por sequenciamento nucleotídico, sendo essa a motivação principal para a realização desta investigação com novas capturas e diagnóstico por PCR para possível confirmação dos resultados obtidos anteriormente.

5.2. Análise macroscópica dos animais

Na análise macroscópica dos exemplares capturados, foi constatado que apenas um espécime dentre os coletados, quando comparados uns com os outros, apresentou alterações de tamanho e forma no fígado, baço e rins, sendo estes sinais sugestivos quando da presença de infecção por ranavírus. Também foi observada uma hipopigmentação do coração (Figura 11). Estes resultados apresentam similaridade com os resultados obtidos por Gray *et al.* (2009) quando foram identificadas alterações nas células dos órgãos citados, além dos animais com ranavirose apresentarem hemorragia, problemas de letargia e flutuabilidade (principalmente em girinos) e, em alguns casos, anorexia. No espécime analisado, não havia presença de hemorragia e, pelas condições climáticas e período da coleta (noturno), não foi possível analisar alterações de letargia ou flutuabilidade.

Figura 11 - Análise macroscópica dos órgãos do *Leptodactylus fuscus*.

Legenda: A e B:, Observa-se o aspecto normal dos órgãos do animal; C: Os rins e o baço apresentam um tamanho maior, assim como apresentado no fígado em D quando comparado com a imagem B. Na figura D, nota-se hepatoesplenomegalia e hipopigmentação do coração. Fonte: Própria autoria, 2017.

5.3. Análise de PCR e verificação de presença de *Ranavirus*

Após a extração dos órgãos dos espécimes, foi realizada análise molecular por PCR utilizando os pares de primers MCP 1 e MCP 2 descritos no item 4.3.1, porém o par MCP 1 gerou amostras degradadas na PCR, sendo adotada a amplificação com o MCP2 para fins de diagnóstico. As amostras foram analisadas separadamente, devido à necessidade de diluição para realização de PCRs. A análise dos resultados mostrou que para nenhuma das 40 amostras, quando comparadas com o controle positivo, houve amplificação de fragmento do gene MCP, obtendo-se, portanto, resultados negativos.

Um dos motivos para a obtenção de resultados negativos pode ser em relação ao ciclo de vida das espécies e quanto a sua resposta imunológica, uma vez que espécies de vida selvagem apresentam uma maior variação na susceptibilidade da doença quanto à adaptação genética e resposta imune do hospedeiro frente a determinadas cepas virais, assim como observado por Hoverman e colaboradores (2011) e Smith (2016). Green et al. (2002) demonstraram que as formas mais afetadas dos animais são, principalmente, os girinos, em consonância com pesquisas recentes realizadas por Jacques et al. (2017) uma vez que esses não apresentam uma resposta imunológica eficiente ao FV3, e por conter um sistema imune imaturo quando comparado à espécie adulta, conforme pesquisas realizadas por Bayley et al. (2013), colocando-se em evidência os achados de Wheelwright et al. (2014), onde mais de 200 mil girinos morreram após 24 horas de observação. No caso dos anfíbios adultos, estes tendem a demonstrar uma resposta imunológica mais efetiva frente ao vírus FV3, como já descrito por Hausmann et al. (2015), onde anuros adultos podem sobreviver a uma primeira infecção e tornarem-se resistentes a ela em exposições subsequentes, podendo inclusive produzir duas proteínas capazes de neutralizar a replicação viral, Esculetina-2P (E2P) e Ranatauerina-2P (R2P), as quais encontram-se presentes na resposta imune frente aos agentes infecciosos patogênicos, assim como demonstrado em investigações realizadas por ROLLINS-SMITH (2009). No presente estudo, apenas anfíbios anuros adultos foram capturados. Assim, é plausível que os animais adultos capturados possam ter tido uma resposta imunológica mais efetiva frente à eventual exposição ao FV3, seja numa prima infecção ou exposição subsequente.

Outro ponto que se levanta quanto aos resultados apresentados é o habitat onde os espécimes foram encontrados, constituído preponderantemente de poças temporárias, as quais se formaram pós-períodos chuvosos e com temperaturas amenas (21 a 23°C, em média). Por ser um ambiente aberto e amplo, é possível que não houvesse ranavírus no local onde foram realizadas as coletas, muito embora possam permanecer infecciosos por longo tempo em sedimento ou em água contaminada (MUNRO *et al.*, 2016). Diferentemente, os resultados

obtidos por Gray, Miller, Hoverman (2009), expuseram que em cativeiro (ou ranários comerciais), as rãs alojadas em espaços menores, podem disseminar a doença mais facilmente, dada a facilidade de contato ou presença de múltiplas vias de transmissão, através de solo e água contaminados, ingestão de tecido contaminado durante a predação, por canibalismo ou necrofagia, e, também, em decorrência de ação antrópica durante o processo de produção. É possível então que locais onde os espécimes foram capturados para esse estudo não apresentavam circulação de ranavírus ou ainda cepas com virulência que não pudesse ultrapassar a imunidade inata ou adquirida dos animais. Echaubard et al. (2014), ao realizarem infecções experimentais de *Lithobates pipiens* e *Lithobates sylvaticus* com FV3, ressaltam que o resultado da interação entre FV3 e anuros é significativamente dependente da interação entre susceptibilidade do hospedeiro, infectividade da cepa viral e fatores ambientais (temperatura), pontuando que eventos de mortalidades estão estritamente associados aos perfis genéticos do hospedeiro e vírus, em conjunto com o ambiente.

Diante do exposto, tornam-se pertinentes investigações futuras de ocorrência de ranavirose em anfíbios anuros silvestres circundantes de criatórios comerciais, nos quais surtos da doença por FV3 tenham sido registrados, para melhor conhecimento da epidemiologia e dinâmica de transmissão da ranavirose entre rãs silvestres

É importante ressaltar, também, o enfoque preservacionista da presente investigação, uma vez que traz subsídios para a melhor compreensão da manutenção das populações de anfíbios anuros silvestres, dentro do escopo de se conhecer eventuais fatores que possam contribuir para a redução e/ou extinção das mesmas, constituindo um importante material para posteriores pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Embora de apenas um espécime de *Leptodactylus fuscus* apresentasse alterações macroscópicas sugestivas de infecção por ranavírus, nenhum espécime capturado nos municípios de Porto Ferreira e Pirassununga, SP, localizadas no interior do Estado de São Paulo, foi positivo ao diagnóstico molecular por PCR para FV3, sendo o presente estudo a primeira prospecção molecular para ranavírus realizada especificamente com exemplares da espécie *L. fuscus*, na região centro-leste do estado de São Paulo.

A presente investigação colabora para a iniciativa futura de novas abordagens dentro da busca de maior conhecimento sobre a epidemiologia da ranavirose em ambientes naturais,

seja ampliando-se as áreas naturais amostradas ou aumentando-se o número de espécies coletadas. Adicionalmente, é relevante a pesquisa da dinâmica de circulação de ranavírus no entorno de ranários comerciais onde surtos de ranavirose já tenham sido registrados, no intuito de se conhecer melhor a distribuição e infectividade das cepas virais circulantes entre diferentes espécies de anuros, particularmente as selvagens.

Pesquisas relacionadas à temática aqui apresentada são de grande relevância, uma vez que o *Ranavirus* é um patógeno emergente, afetando tanto o setor produtivo, bem como questões inerentes à conservação da biodiversidade da fauna anura com implicações diretas sobre outras classes de animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULALI, H. On the export of frog legs from India. *Journal of the Bombay Natural History Society*, v. 82, n. 2, p. 347-375, 1985.

ALENCAR, A. L. F. Isolamento e caracterização de estirpe de Frog Virus 3 – símile detectada em rãs-touro gigante (*Lithobates catesbianus*) no Estado de São Paulo. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo. 2016.

ALFORD, R. A. Ecology: Bleak future for amphibians. *Nature*, n. 480, v. 7378, p. 461-2, 2011.

ALFORD, R. A., RICHARDS, S. J., MCDONALD, K. R. Enciclopedia da Biodiversidade. ed. Levin, S.A. p. 1-12, 2007.

BADIO, B.; DALY, J. W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Molecular Pharmacology*, v. 45, n. 4, p. 563-9, 1994.

BAYLEY, A. E.; HILL, B. J.; FEIST, S. W. Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 103, p. 171-183, 2013.

BERNARDE, P. S. Reprodução de anfíbios anuros. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html>>. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

BERNARDE, P. S. Rã – pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*). Disponível em: <herpetofauna.com.br/anfibios.htm>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

BLAUSTEIN, A. R. Chicken Little or Nero Fiddle - a Perspective on Declining Amphibian Populations. *Herpetologica*, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.

BRENES, R. et al. Susceptibility of fish and turtles to three ranaviruses isolated from different ectothermic vertebrate classes. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 26, n. 2, p. 118-26, 2014.

BRASÍLIA. Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais – conceitos e procedimentos recomendados. Brasília: Josemar Aragão/ASCOM/CFMV, 2013. 59 p.

CHINCHAR, V. G. et al. Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. **Current Topics Microbiology Immunology**, v. 328, p. 123-70, 2009.

CHINCAR, V. G. et al. ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 5, p. 890 – 891, 2017.

CLARK, H. F. et al. Comparative studies of amphibian cytoplasmic virus strain isolated from the leopard frog, bullfrog and newt. *Biology of amphibian tumors, recent results in cancer research*. Berlin – Springer. 1969. p. 310 – 326.

COUTINHO, C. D. M. Teor de lipídeos e composição em ácidos graxos da gordura da rã-touro (*Rana catesbiana*, SHAW, 1802). 2002. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2002.

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

DE CASTRO, F.; BOLKER, B. Mechanisms of disease-induced extinction. **Ecology Letters**, v. 8, n. 1, p. 117-126, 2005.

DRURY, S. E. N.; GOUGH, R. E.; CALVERT, I. Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 150, n. 14, p. 451-452, 2002.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (*Amphibia: Anura: Arboranae*). **Zootaxa**, v. 4104, n. 1, p. 1-109, 2016.

DUFFUS, A. L. J. et al. Distribution and host range of ranaviruses. In: GRAY, M. J.; CHNCHAR, V. G. (Eds.). **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer International Publishing, 2015. p. 9 – 57. 2015.

ECHAUBARD, P. et al. Enviromental dependecy of amphibian-ranavirus genotypic interactions: evolutionary perspectives on infectious diseases. **Evolutionary Applications**, n. 7, p. 723-733, 2014.

EARL, J. E. et al. Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. **Oecologia**, v. 182, n. 2, p. 611-23, 2016.

FEI, L. et al. Amphibia vol. 1: general accounts of Amphibia Gymnophiona and Urodela. **Fauna Sinica, Amphibia**, v. 1, p. 1-7, 2006.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA NETO, J. S. Introdução à ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto do Pesca**, São Paulo, n. 33, p. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of world fisheries and aquaculture.** Disponível em: <www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbiana/en#tcNA00A0>. Acesso em: 20 de Julho de 2017.

FREITAS, H. L. C. et al. Cultivo de organismos aquáticos: uma proposta de desenvolvimento rural na Ilha de João Pilatos, Ananindeua – Pará- Brasil. **Pubvet**, v. 11, n. 5, p. 424-537, 2017.

FORZAN, M. J. et al. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in three species of wild frogs on Prince Edward Island, Canada. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 2, p. 91-96, 2010.

FROST, D. R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 297, p. 257 – 291, 2006.

FROST, D. R. American Museum of Life – Amphibian Species of the World 6.0, an OnlineReference. Disponível em: <research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em: 13 de Setembro de 2017.

GALLI, L. et al. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. **Aquaculture**, v. 257, p. 78 – 82, 2006.

GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranaviruses** – Letal Pathogens of Ectothermic Vertebrates. New York: Springer International Publishing, 2015. p. 9 – 57.

GRAY, M. J., MILLER, D. L., HOVERMAN, J. T. First Report of Ranavirus Infecting Lungless Salamanders. **Herpetological Review**, v. 40, p. 316- 319, 2009.

GREEN, D. E., CONVERSE, K. A., SCHRADER, A. K. Epizootiology of Sixty-four Amphibian Morbidity and Mortality Events in the USA. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 969, p. 323 – 339, 2002.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. **Bioscience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HAUSMANN, J. C. et al. Experimental challenge study of fv3-like ranavirus infection in previously fv3-like ranavirus infected eastern box turtles (*TERRAPENE carolina CAROLINA*) to assess infection and survival. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 46, n. 4, p. 732 – 746, 2015.

HAYASAKA, E., NISHIDA, S. M. Reprodução de anfíbios. Disponível em: http://ww2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Origami/Documentos/Anfibios.htm. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

HEYER, W. R. *Hyla Benitezii* (Amphibia, Anura, Hylidae) - First Record for Brazil and Its Biogeographical Significance. **Journal of Herpetology**, v. 28, n. 4, p. 497-499, 1994.

HIPOLITO, M. et al. Detection of white spot syndrome virus in Brazil using negative staining, immunoelectron microscopy and immunocytochemistry techniques. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 2, p. 761-768, 2012.

HOF, C. et al. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. **Nature**, v. 480, p. 516 – 519, 2011.

HOVERMAN, J. T. et al. Phylogeny, Life History, and Ecology Contribute to Differences in Amphibian Susceptibility to Ranaviruses. **Ecohealth**, v. 8, n. 3, p. 301-319, 2011.

HOWE, C. D. North American bullfrog (*Rana catesbeiana*). Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Rã-touro-americana>>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

HUANG, S. M. et al. Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009. **Archives of Virology**, v. 156, n. 9, p. 1505-15, 2011.

JACQUES, R. et al. Xenopus – FV3 host-pathogen interactions and immune evasion. **Journal of Virology**, 2017.

JOHNSON, A. F.; BRUNNER, J. L. Persistence of an amphibian ranavirus in aquatic communities. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 111, n. 2, p. 129-38, 2014.

JULIAN, J. T. et al. Seasonal infection rates of *Batrachochytrium dendrobatidis* in populations of northern green frog *Lithobates clamitans melanota* tadpoles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 121, n. 2, p. 97-104, 2016.

KÜKENTHAL, W.; MATTHES, E.; RENNER, M. Guia dos trabalhos práticos de zoologia. 15. ed. Coimbra: Atlântica Edit. S. A. R. L., 1969. 472 p.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. **Capacidade de adaptação dos sistemas de manufatura em função do mercado consumidor**. Chapecó (SC): INOTEC, 1992.

LUCAS, E. M. et al. The reproductive ecology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae): new data from natural temporary ponds in the Brazilian Cerrado and a review throughout its distribution. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 35-36, p. 2306, 2010.

MARSH, I. B. et al. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 2, p. 137-151, 2002.

MAZZONI, R. et al. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.

MESQUITA, A. Q. **Síndrome vestibular em *Lithobates catesbeianus* associada à *Ranavirus***. 2014. 80 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

MILLER, D. L. et al. Frog Virus 3 infection, cultured American bullfrogs. **Emerging Infectious Diseases journal**, n. 13, p. 342 – 343, 2007.

MILLER, D., GRAY, M., STORFER, A. Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians. **Viruses**, v. 3, n.11, p. 2351 – 2373, 2011.

MITTERMEIER, R. A. et al. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 601-607, 2005.

MUNRO, J. et al. Survival of Frog Virus 3 in freshwater and sediment from an English lake. **Journal of Wildlife Disease**, v. 52, n. 1, p. 138 – 42, 2016.

NAZIR, J.; SPENGLER, M.; MARSCHANG, R. E. Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, n. 3, p. 177-84, 2012.

OIE, OFFICIAL INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Infection with Ranavirus. In “Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals” Office International des Epizooties, Paris, France, p. 1- 21, 2017.

OLIVEIRA, C. R. et al. Rastreamento de Ranavírus a partir de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) provenientes de ranários comerciais de São Paulo. Disponível em: <pesca.ps.gov.br/12recip/Resumos_PDFs/RASTREAMENTO_RANAVIRUS_RAS-TOURO_RANARIOS_COMERCIAIS_SAO_PAULO.pdf>. Acesso em: 05 de Novembro de 2017.

PRICE, S. J. et al. From fish to frogs and beyond: impact and host range of emergent ranaviruses. **Virology**, p. 272 – 279, 2017.

PUKALA, T. L. et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 3, p. 368-93, 2006.

RODRIGUES, C. A. G. et al. **Áreas potenciais para criação de rã-touro gigante *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) na região Sudeste do Brasil**. Campinas: Embrapa Monitoramento por satélite, 2010, 37 p. (Embrapa Monitoramento por Satélite . Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 12).

ROLLINS-SMITH, L. A. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1788, p. 1593-1599, 2009.

ROLLINS-SMITH, L. A. Amphibian immunity-stress, disease, and climate change. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 66, p. 111-119, 2016.

ROBERT, J.; OHTA, Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1249-70, 2009.

ROSSA-FERES, D. C. et al. Amphibians of Sao Paulo State, Brazil: state-of-art and perspectives. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1A, p. 47-66, 2011.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA – SNA. Brasil é segundo na produção mundial de rãs. Disponível em: <<http://sna.agr.br/brasil-e-segundo-na-producao-mundial-de-ras/>>. Acesso em: 12 de Julho de 2017.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A natural history of amphibians**. New Jersey, Princeton: Princeton University Press, 1995. 253 p.

STORE, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C. Zoologia Geral. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991. 816 p.

STUART, S. et al. **Threatened Amphibians of the World**. Barcelona: Lynx Edicions, 2008. 2 – 3 p.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS - SIB. *Ranavirus*. Disponível em: <viralzone.expasy.org/585?outline=all_by_species>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11466-11473, 2008.

WHELLWRIGHT, N. T. et al. Sudden mass die-off of a large population of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles in Maine, USA, likely due to ranavirus. **Herpetological Review**, v. 45, p. 240 – 242, 2014.

WHITTINGTON, R. J.; BECKER, J. A.; DENNIS, M. M. Iridovirus infections in finfish - critical review with emphasis on ranaviruses. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 2, p. 95-122, 2010a.

_____. Iridovirus infections in finfish - critical review with emphasis on ranaviruses. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 2, p. 95-122, 2010b.