



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI



SÍLVIA REGINA CARNEIRO DE PINHO

**HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL**

Belém,  
2018

SÍLVIA REGINA CARNEIRO DE PINHO



## HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, do convênio da Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Área de concentração: Biodiversidade e Conservação.  
Linha de Pesquisa: Ecologia Animal.

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina dos Santos-Costa.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Rodriguez Málaga.**

Belém,  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C289h Carneiro de Pinho, Sílvia Regina  
HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL / Sílvia Regina Carneiro de  
Pinho. — 2018  
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Zoologia (PPGZOO), Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos-Costa  
Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Rodriguez Málaga.

1. Neotropical. 2. parasitos. 3. parasitismo. 4. plantação de dendezeiro. I. dos Santos-Costa, Maria  
Cristina, *orient.* II. Título

---



## FOLHA DE APROVAÇÃO

SÍLVIA REGINA CARNEIRO DE PINHO

### **HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, do convênio da Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zoologia, sendo a COMISSÃO JULGADORA composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr<sup>a</sup>. MARIA CRISTINA DOS SANTOS COSTA  
Universidade Federal do Pará (Presidente)

Prof. Dr. GLEOMAR FABIANO MASCHIO  
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr<sup>a</sup>. EDILENE OLIVEIRA DA SILVA  
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS  
Universidade Federal do Amapá

Aprovada em: 20 de 04 de 2018.  
Local de defesa: ICB-UFPA.



**Aos meus pais Luzimar e Sérgio  
de Pinho pelo amor, apoio e  
compreensão sempre!**

**Os amo muito!**



Primeiramente “FORA TEMER!!!”

”Um dos maiores erros cometidos é provocar um entusiasmo forçado, não se escolhem suas paixões, as paixões escolhem uma“

(Jeff Bezos)

## AGRADECIMENTOS



- Aos meus pais principalmente, por estarem sempre comigo mesmo distantes.
- A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Cristina dos Santos Costa pela confiança, ensinamentos, exemplo, incentivos, paciência e orientação.
- Ao Prof<sup>º</sup>. Dr Sérgio Rodriguez Málaga pela confiança, conhecimento, ensinamentos e orientação.
- Ao Dr Fabrício Correa pelas contribuições e incentivos sempre.
- Aos meus amigos da Herpetologia: Aliceane, Cassia, Claudia, Elísia, Fabrício, Iago, Lenise, Matheus, Mayra, Rodrigo, Rodriguito e Soraia, pela ajuda nas coletas, amizade, companhia, momentos de descontração, tornando a vida científica agradavelmente leve e divertida.
- A Camilla Galvão por me acompanhar nesse momento importante e ajudar na minha saúde mental.
- Aos meus amigos de fora da vida acadêmica, Clarise, Daniel, Glauciane, Lorena e Tiane, pelo amor, carinho, que me acompanham e apoiam sempre.
- Aos amigos que a Biologia me proporcionou, Ananda, Laís Barbosa, Laís Lobato, Larissa, Layse, Lorrane, Marco, Manuela, Milla, Tere e Victória também por estarem comigo durante esse tempo e compartilhar bons momentos comigo.
- A CAPES, pela concessão da bolsa.
- Ao Prof<sup>º</sup>. Dr Júlio Pieczarka, a mestrande Ananda Petty, aos doutorandos Marlyson Rodrigues e Talita Fernanda Ribas pela ajuda com o microscópio para que pudéssemos tirar as fotos das amostras.
- A Banca avaliadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições a este trabalho.
- Ao Grupo AGROPALMA pelo apoio logístico, CI, PIRE pelo apoio financeiro.
- A Universidade Federal do Pará.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia UFPA/MPEG.

- Aos meus companheiros de laboratório no laboratório de Ecologia e Zoologia de Vertebrados e laboratório de Parasitologia pela ajuda, apoio, companheirismo e amizade.
- Aos anuros coletados, por serem um grupo incrível e porque sem eles o estudo não seria possível.



## SUMÁRIO



<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
Área de Estudo.....	12
Análise de Dados.....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	16
<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>APÊNDICES</b> .....	39
<b>ANEXOS</b> .....	45
<b>Anexo 1</b> - Normas da revista Animal Biology, a qual será submetido artigo para publicação.....	45

# Capítulo Único

## HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL

**Esta Dissertação foi elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Animal Biology*, as quais se encontram em anexo (Anexo 1)**

O artigo será submetido para a revista *Animal Biology*, dentro das normas de submissão da revista, exceto numeração das linhas, apresentação das figuras e tabelas, o idioma será traduzido posteriormente.



## HEMOPARASITOS EM ANUROS NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL

Sílvia R. C. Pinho<sup>1,2\*</sup>, Maria C. Santos-Costa<sup>1,2</sup> e Sérgio R. Málaga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Ecologia e Zoologia de Vertebrados, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Augusto Correia 1, 66075-110 Belém, Pará, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Augusto Correia 1, 66075-110 Belém, Pará, Brasil

### Resumo

As interações biológicas têm um papel importante na regulação e manutenção das populações naturais. Assim como a maioria destas interações, o parasitismo pode ser influenciado pelo ambiente, com as mudanças causadas pelas atividades antrópicas podem afetar profundamente o equilíbrio das assembleias dos organismos hospedeiros. Diante disto, nosso trabalho procurou descrever, a composição e riqueza dos hemoparasitos de anuros presentes em dois ambientes, inseridos no Bioma Amazônico, no leste do Pará, Brasil. Caracterizamos os grupos de hemoparasitos mais frequentes, e se o tipo de infecção hemoparasitária está relacionada com hábitat do anuro (arborícola ou terrestre). Coletamos 128 anuros nos dois ambientes, em duas expedições realizadas nos períodos de abril de 2016 e 2017, que correspondem a estação de chuva na região. No laboratório foram realizados esfregaços sanguíneos e *imprint* do fígado para identificação do parasito. No total foram registrados sete táxons distintos de hemoparasitos em 55 anuros (43%). Nas áreas de plantação haviam mais espécimes infectados e com infecções mistas que em áreas de floresta. Parasitos do gênero *Trypanosoma* foram os mais frequentes, ocorrendo em 67% dos anuros infectados nos dois ambientes, com a identificação de seis grupos morfológicos distintos, encontrados principalmente em anuros terrestres. Foram identificados dois grupos distintos de Hemogregarinas em seis espécimes de anuros mais parasitados, encontradas principalmente nos de hábito terrestre. Registramos a presença de um parasito do Filo Apicomplexa não identificado em espécimes de *Trachycephalus typhoni*, que provavelmente se trata de um táxon novo e será estudado *a posteriori*.

### Palavras chave

Anfibios; Neotropical; parasitos; parasitismo; plantação de dendezeiro.

### ***Abstract***

Biological interactions play an important role by maintaining and regulating natural populations. As most interactions, parasitism may be influenced by the environment, with anthropogenic changes caused by humans strongly affecting the equilibrium in biological assemblages of their hosts. Herein, we described and analyzed the hemoparasites richness and composition in anurans from oil palm crops and surrounding forest fragments in the eastern Amazon, Brazil. In addition, we analyzed which hemoparasites are most frequent and whether the type of infection is related with anurans habits (terrestrial or arboreal). We collected 128 anurans in both environments (forest and oil palm plantations) during rainy season, in April 2016 and 2017. In the laboratory, we collected blood samples from each individual, and carried out smear and *imprint* methods of their livers to identify the parasites. We found seven hemoparasites groups in 55 individuals (43%) in both habitats. In oil palm plantations, there were more infected specimens and more mixed infections than in forests. Parasites of the genus *Trypanosoma* were the most frequent, found in 67% of infected anurans in both environments. Besides, we identified six distinct morphological groups, mainly in terrestrial anurans. We found two distinct Haemogregarines groups in six anurans, most terrestrial. In addition, we found an Apicomplexa parasite in specimens of *Trachycephalus typhonius*, which is probably a new taxon and will be studied *a posteriori*.

### **Key words**

Amphibians; Neotropical; parasites; parasitism; palm oil plantation.

## Introdução

As interações ecológicas têm como papel principal a regulação das populações nos ambientes naturais. Assim como a maioria destas interações, o parasitismo pode ser influenciado pelo ambiente (Ferreira, 1973; Von Zuben, 1997), afetando o desenvolvimento das infecções e o provável surgimento de doenças (Ferreira et al., 2012), causadas por uma ampla diversidade de patógenos, p.e., bactérias, fungos, helmintos e protozoários (Blaustein & Kiesecker, 2002; Luz & Faccini, 2013), os quais podem ser transmitidos de forma direta entre os hospedeiros ou através de vetores biológicos (Telford Jr, 2016).

Existe uma forte relação entre os parasitos, seus hospedeiros e o ambiente externo, constituindo o sistema parasitário (Ferreira, 1973; Ferreira et al., 2012). As alterações do habitat podem levar a uma elevação na carga parasitária (Hudson et al., 2006; Froeschke et al., 2013; Cable et al., 2017) que debilitam, de alguma forma, seus hospedeiros. Esta associação de fatores pode levar a uma diminuição de recursos importantes para o hospedeiro, afetando a sua capacidade de predação e reprodução (Von Zuben, 1997; Moretti, 2011). Por isso, os parasitos desempenham um importante papel nos ecossistemas (Hudson et al., 2006), influenciando a vida de seus hospedeiros, tanto a nível de indivíduo quanto de populações, e atuando na seleção natural (Marcogliese et al., 2009; Thompson et al., 2010; Goater et al., 2013).

Os anuros são um dos grupos de vertebrados mais diversos no mundo, com cerca de 6.930 espécies conhecidas até o momento (Frost, 2018), dentre as quais 1.039 ocorrem no Brasil (SBH, 2016). Estes animais são considerados bioindicadores de qualidade ambiental por apresentarem especificidades fisiológicas e comportamentais, além de forte ligação com o meio aquático, principalmente no período reprodutivo (Hyne et al., 2009). Estão expostos à diversas pressões ambientais e antropogênicas, que podem levar à declínios populacionais (Eterovick et al., 2005). Algumas doenças podem causar extinções locais de espécies (Silvano & Segalla, 2005), a exemplo do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), patógeno responsável pela quitridiomicose

anfibia, causador do desaparecimento de populações em várias partes do mundo (Valencia-Aguilar et al., 2015). A conversão do hábitat e o estresse causados pelas mudanças ambientais pode aumentar a exposição à patógenos e/ou seus vetores, podendo causar a elevação das parasitemias e a manifestações clínicas do parasitismo nos anuros (Marcogliese et al., 2009).

Por viverem em diversos habitats terrestres e aquáticos, os anuros são mais suscetíveis a vetores hematófagos e, conseqüentemente, à infecções por hemoparasitos (Bardsley & Harmsen, 1973; Barta & Desser, 1984). Diversos trabalhos descrevem uma ampla variedade de protozoários sanguíneos que conseguem infectar os anuros (Desser & Yekutieli, 1986; Leal et al., 2009; Netherlands et al., 2015). Estes patógenos precisam, obrigatoriamente, ser transmitidos por vetores hematófagos (e.g. dípteros, carrapatos, e sanguessugas entre outros) que conseguem interagir com estes animais. Porém, pouco ainda é conhecido sobre o ciclo biológico dessa interação (Borkent, 2008).

Entre os hemoparasitos encontrados com maior frequência em anuros (Wosniak et al., 1994), estão os protozoários do Filo Apicomplexa, principalmente os pertencentes ao grupo das haemogregarinas pertencente a subordem Adeleina (Levine et al., 1980), e os flagelados do gênero *Trypanosoma* (Filo Euglenozoa) (Honigberg, 1963; Leal et al., 2009), os quais podem acometer seus hospedeiros em infecções simples ou mistas (Woo & Bogart, 1984). Os principais vetores invertebrados destes parasitos são mosquitos, flebotomíneos, moscas tse-tse, triatomíneos, piolhos, pulgas e ácaros (Smith, 1996). Membros da família Trypanosomatidae podem ser encontrados parasitando plantas, animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, apresentando assim uma ampla distribuição mundial (Vikerman, 1976; Moreira et al., 2004).

Perturbações como o desmatamento para plantação em larga escala, são exemplos de transformações no habitat que afetam drasticamente a populações de anuros amazônicos. Essas alterações no habitat podem afetar diretamente os anuros e sua relação com os parasitos. A monocultura de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é altamente rentável e vem crescendo em várias partes

do mundo, e conseqüentemente modificando o ambiente e afetando a biodiversidade (Bengtsson et al., 2000; Koh & Wilcove, 2008). No Brasil, a plantação de dendezeiro está concentrada na região norte e estudos mostram o quanto esse tipo de cultivo vem afetando os diversos grupos da fauna (Correa et al., 2015; Cunha et al., 2015; Mendes-Oliveira et al., 2017).

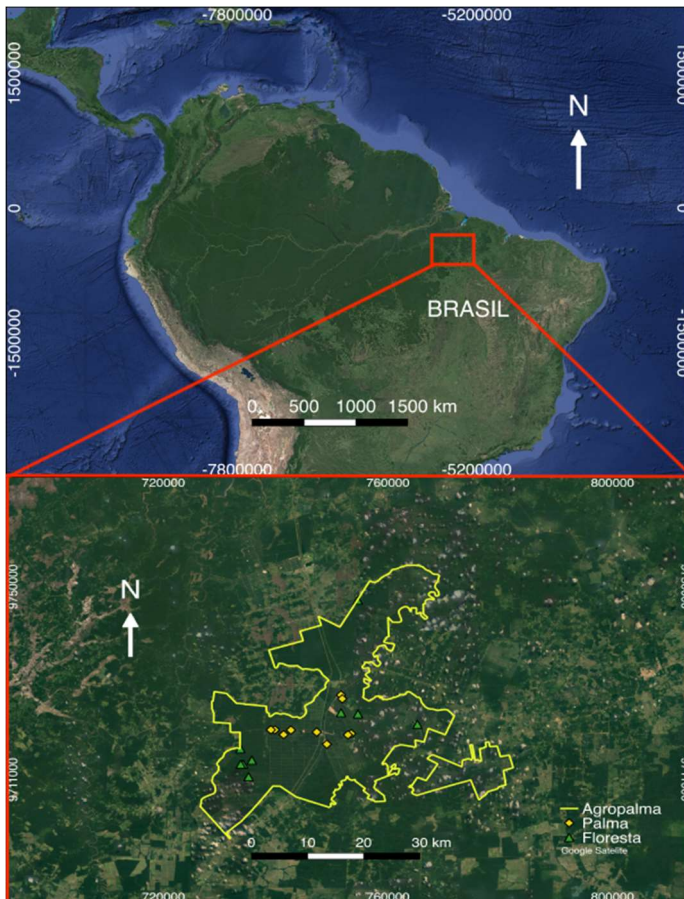
A área onde foi desenvolvido esse trabalho está localizada no município de Tailândia-Pará, que tem como principal atividade a cultura de dendezeiro, e preserva fragmentos de floresta de terra firme em contato com a plantação. Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever a composição de hemoparasitos de anuros presentes na área de monocultura de dendezeiro e nos fragmentos florestais adjacentes. Além disto, procuramos responder as seguintes perguntas: i) Existe diferença na composição e riqueza de hemoparasitos nas assembleias de anuros nos ambientes de floresta e plantação?; ii) Quais os táxons de hemoparasitos que predominam nos diferentes ambientes; iii) Anuros de hábitos arborícola ou terrestre apresentam diferenças na composição de hemoparasitos?

## Material e métodos

### *Área de Estudo*

O estudo foi realizado em fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro (*Elaeis guineensis*), em propriedade particular do Grupo AGROPALMA, localizados no município de Tailândia, Estado do Pará, na região da Amazônia Oriental, norte do Brasil (2°13'00''S à 2°43'00''S e 48°54'00''W à 48°28'00''W) (Fig. 1). A área florestada preservada é composta predominantemente por floresta ombrófila de terra-firme, com árvores de até 30 m de altura e sub-bosque composto por árvores de menor porte e lianas, totalizando aproximadamente 64000 ha. São encontrados corpos d'água permanentes de até 20 m de largura no interior das áreas florestadas, além da formação de poças temporárias no período de chuvas. A área de floresta está em contato com a plantação de dendezeiro (*Elaeis guineensis*), que ocupa 39000 ha de toda a área de estudo.

A precipitação anual média é de 2344 mm, com estação chuvosa ocorrendo entre dezembro e maio, e um período de pluviosidade reduzida entre junho e novembro, alcançando médias máximas de até 427 mm em março, e médias mínimas de até 54 mm em setembro (Albuquerque et al., 2010). A temperatura média anual do ar para a região é de aproximadamente 26°C, e a umidade relativa média anual do ar é em torno de 85% (Oliveira et al., 2000).



**Figura 1:** Mapa da área de estudo (Agropalma), pontos em verde são referentes às áreas de floresta preservada e em amarelo as áreas de plantação de dendezeiro.

### *Coleta de Dados*

Os anuros foram coletados, na vigência da licença do SISBIO de número: 8716-1 (processo: 12420-2), nos dois ambientes durante duas expedições realizadas no mês de abril de 2016 e 2017, que corresponde à estação chuvosa da região. Em cada área foram estabelecidas parcelas de 30 x 70m, 12 em floresta e 10 em plantação, todas cortadas por corpos d'água permanente ou temporário,



e distantes no mínimo 1 km. A coleta de anuros foi por busca ativa e visual, vistoriando-se todos os micro-habitats disponíveis, como serrapilheira, superfície de folhas, troncos, ocos de árvores e corpos d'água. Cada parcela foi vistoriada tanto no período diurno (14h às 17h) quanto noturno (19h às 22h) por três coletores, afim de capturar o maior número de espécies possível

Os anuros foram capturados, levados ao laboratório e eutanasiados através de aplicação de xilocaína na região torácica, seguindo protocolo pré-estabelecido pela portaria do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº1000 de maio de 2012, que trata da eutanásia de animais. Em seguida realizamos uma incisão ventral em cada um dos espécimes coletados para a retirada de amostras de sangue direto do coração, com as quais foram realizados esfregaços sanguíneos. A partir do fígado foram realizados *imprints* em lâminas de vidro os quais foram deixados secar a temperatura ambiente. As amostras foram utilizadas para a confirmação da presença de parasito. Posteriormente, os anuros foram fixados em solução formalina a 10% e após 48 horas preservados em álcool 70%. Todos indivíduos coletados foram depositados na Coleção temporária de Herpetologia da Universidade Federal do Pará. Para cada espécime coletado foi preenchida uma ficha de campo contendo dados como: número de campo, espécie, parcela, micro-habitat, hábito, dentre outras.

As lâminas com os esfregaços e *imprints* foram fixadas utilizando metanol frio por um minuto. Posteriormente, foram coradas por 30 minutos, utilizando Giemsa diluído em água tamponada e analisadas através da observação com objetiva 100X em microscópio Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma Câmera CCD (AxioCam MR monocromática) acoplada a um microscópio Zeiss Axiophot controlado pelo software Axiovision 3.0. A caracterização de hemoparasitos foi realizada através da análise morfológica de cada amostra parasitada. Em seis espécimes de anuros mais parasitados por hemogregarinas, foi calculado a área, comprimento e largura do parasito assim como de seu núcleo, afim de caracterizar possíveis diferentes morfotipos. Para esta análise foram realizadas medições das hemogregarinas nas células coradas utilizando o programa ImageJ ([www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov)). Já para os parasitos do gênero *Trypanosoma* foram avaliadas a morfologia de

cada imagem capturada, por três observadores. A classificação seguiu Diamond (1965), e cinco grupos foram observados: Grupo A: Corpo achatado e em forma de folha (Fig.4: 1,2); Grupo B: Corpo, em visão frontal, achatado, mas não em forma de folha; lateralmente apresenta região anterior larga, a partir do cinetoplasto, que vai se estreitando posteriormente (Fig.4: 3); Grupo C: Corpo robusto; frontalmente comprimido e ovoide; lateralmente robusto, elíptico, cerca de duas vezes mais comprido do que largo (Fig.4: 4); Grupo D: Corpo alongado, extremidades estreitas; D1: Cinetoplasto mais próximo do núcleo do que da extremidade posterior (Fig.4: 5); D2: Cinetoplasto mais próximo da extremidade posterior do que do núcleo (Fig.4: 6); Grupo F: Corpo esférico (Fig.4: 7,8). Os demais hemoparasitos encontrados com menor ocorrência foram caracterizados com ajuda de especialistas e Telford (2016).

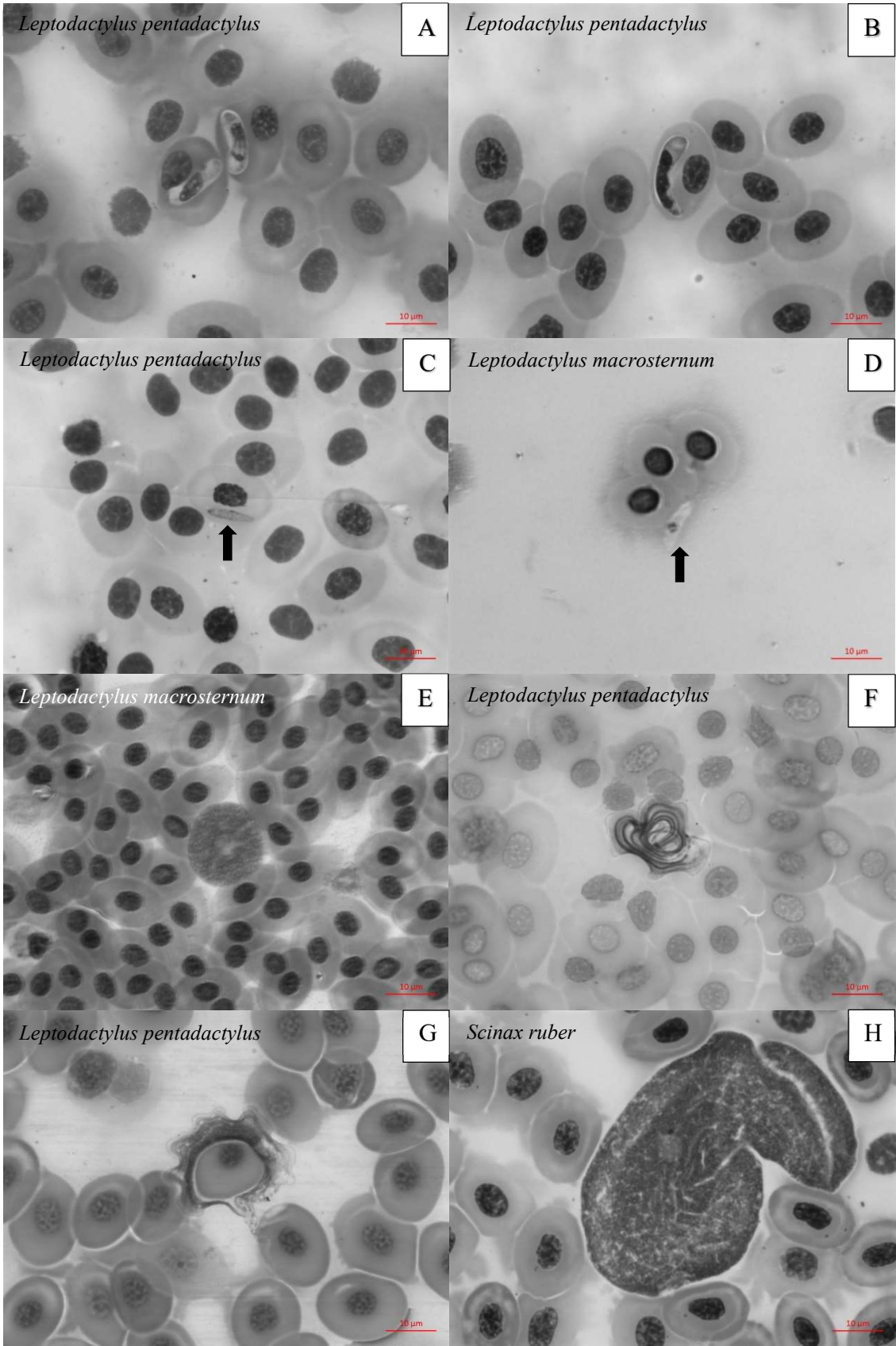
### *Análise de Dados*

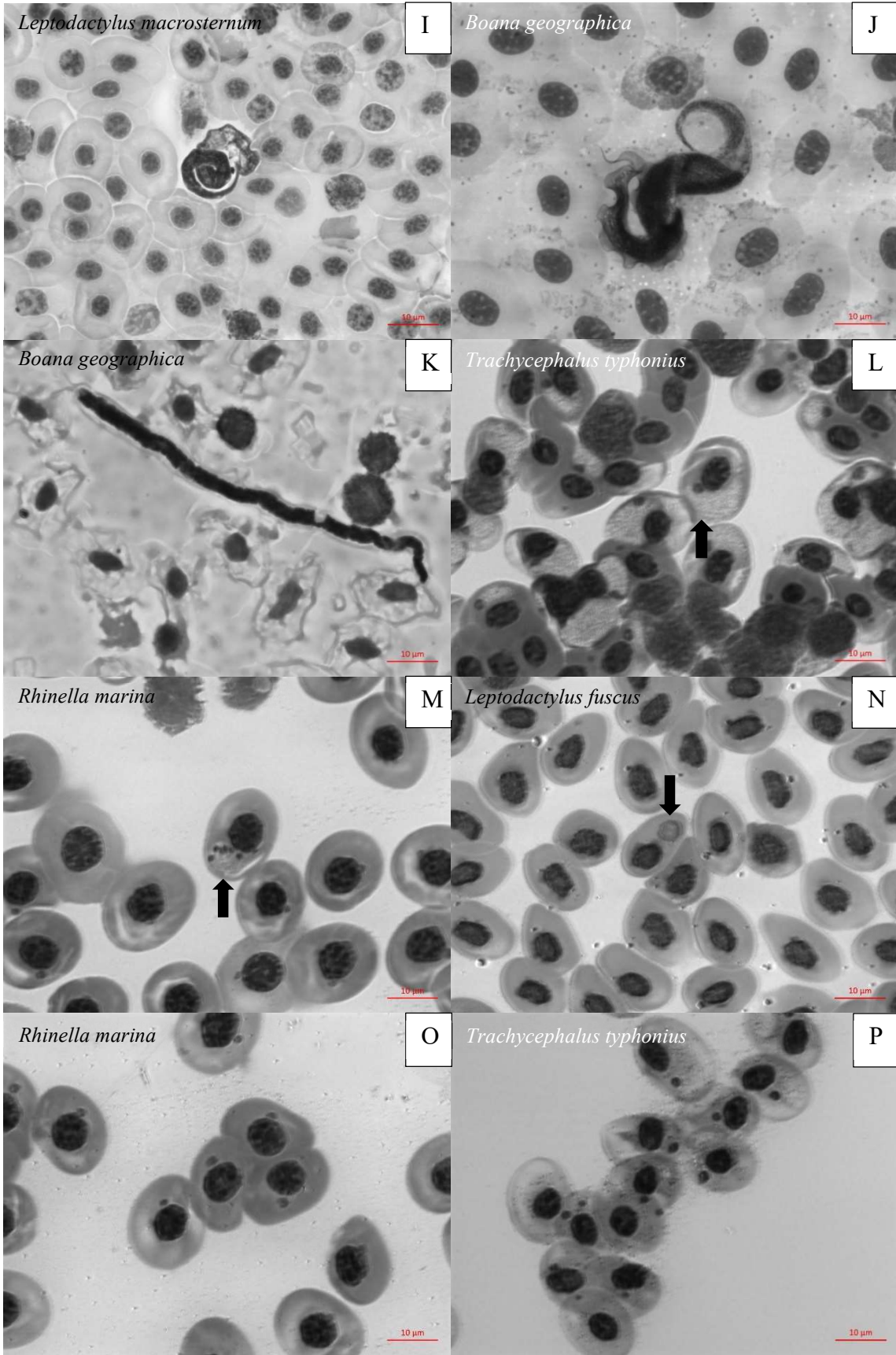
Para verificar se existem diferenças na quantidade de hemoparasitas nas assembleias de anuros em áreas de fragmento de floresta preservada e plantação de dendezeiro, realizamos uma PERMANOVA (Zar, 2010), em que as áreas de floresta e de plantação foram usadas como variáveis categóricas, e como variável numérica a prevalência dos hemoparasitos em cada ambiente. Realizando uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para visualização dos dados no gráfico. Uma ordenação foi realizada com os dados de morfometria das hemogregarinas de seis espécimes de anuros, com dados de área, comprimento e largura dos parasitos e área, comprimento e largura do núcleo dos parasitos, através de uma Análise de Componentes Principais (PCA), para verificar ocorrência de mais de um morfotipo de haemogregarina parasitando os anuros.

## **Resultados**

### **Composição e riqueza de anuros e seus hemoparasitos:**

Foram realizados esfregaços sanguíneos de 128 anuros de 28 espécies, 22 espécies em fragmentos florestais preservados e 14 espécies em plantação de dendezeiro. A abundância de anuros coletados foram semelhantes nos dois ambientes, 65 espécimes de anuros na floresta preservada e 63 espécimes em plantação de dendezeiro. Do total de anuros registrados nos dois ambientes, 55/128 (43%) estavam parasitados, sendo que, na floresta apresentaram 22/65 (17%) indivíduos parasitados e na plantação apresentaram 33/63 (26%) espécimes com hemoparasitos. Foram registrados os seguintes hemoparasitos: tripanossomas 38/55 (69%) (Fig.2: E-J); hemogregarinas 20/55 (36%) (Fig.2: A-D); inclusões bacterianas ou virais 9/55 (16%) (Fig.2: O-P); Dactylosomas 5/55 (1%) (Fig.2: N); Microfilárias 4/55 (0,07%) (Fig.2: K), Plasmódios 2/55 (0,03%) (Fig.2: M) e Apicomplexa não identificado 2/55 (0,03%) (Fig.2: L) (Tabela 1). Observamos infecção mista em 21/55 (38%) espécimes de anuros do total parasitados, 13/55 (24%) anuros na plantação e 8/55 (14%) na floresta (Tabela 1).





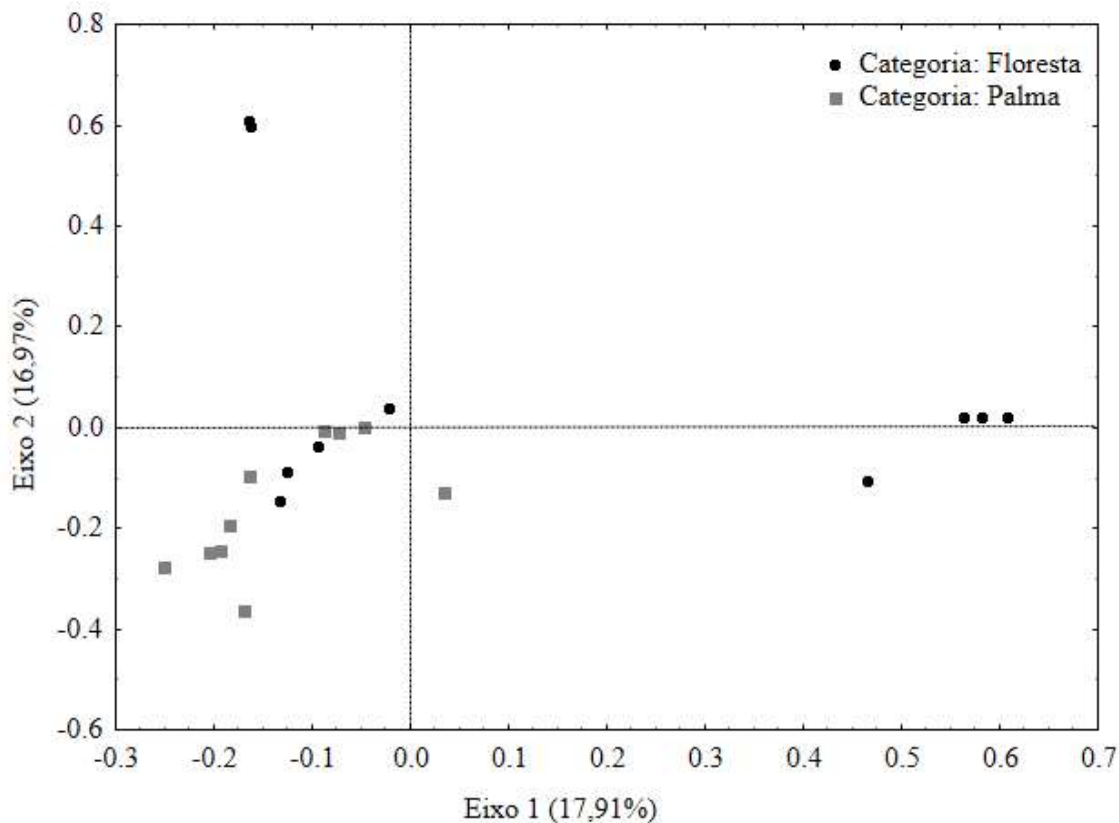
**Figura 2.** Hemoparasitos encontrados nos anuros analisados. (A-D) hemogregarinas; (E-J) tripanossomas; (K) Microfilária; (L) Apicomplexa não identificado; (M) Plasmódio; (N) Dactylosoma; (O-P) Inclusão bacteriana ou viral. Barras de escala = 10 µm.

**Tabela 1:** Anuros infectados por hemoparasitos em fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro, Município de Tailândia, Pará, Brasil. Legenda: **ApiNI** = Apicomplexa não identificado; **Dac** = Dactylosoma; **Hem** = Hemogregarina; **Incl** = Inclusão Bacteriana ou Viral; **Mic** = Microfilária; **Plas** = Plasmódio; **Tryp** = *Trypanosoma*.

Ambiente	Espécie	Arborícola	Terrestre	Hemoparasitas/ anuros
Floresta preservada	<i>Dendropsophus minutus</i>	X		Tryp
	<i>Boana geographica</i>	X		Mic; Tryp
	<i>Boana multifasciata</i>	X		Dac; Incl; Mic; Tryp
	<i>Leptodactylus fuscus</i>		X	Incl; Tryp
	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>		X	Hem; Plas; Tryp
	<i>Osteocephalus oophagus</i>	X		Tryp
	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	X		Tryp
	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	X		Tryp
	<i>Rhinella margaritifera</i>		X	Tryp
	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>		X	Tryp
	<i>Trachycephalus typhonius</i>	X		Incl; Tryp; ApiNI
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	
Plantação de dendezeiro	<i>Boana multifasciata</i>	X		Dac; Hem; Mic; Tryp
	<i>Leptodactylus fuscus</i>		X	Hem; Incl; Tryp
	<i>Leptodactylus macrosternum</i>		X	Dac; Hem; Incl; Tryp
	<i>Leptodactylus mystaceus</i>		X	Hem; Incl; Tryp
	<i>Leptodactylus paraenses</i>		X	Hem; Tryp
	<i>Physalaemus ephippifer</i>		X	Tryp
	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	X		Hem
	<i>Rhinella marina</i>		X	Hem; Incl; Plas
	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>		X	Tryp
	<i>Scinax gr. ruber</i>	X		Hem; Mic; Tryp
	<i>Trachycephalus typhonius</i>	X		Hem; Tryp; ApiNI
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	

A assembleia de anuros de plantação de dendezeiro apresentou mais espécimes infectados que a assembleia de anuros na floresta, uma vez que a probabilidade do acaso explicar a variação observada foi muito baixa (PERMANOVA: Pseudo F= 2.3408; p=0.006). A análise de coordenadas

principais mostrou que os eixos I e II explicaram 34,88% da ordenação dos dados. Podemos observar através do gráfico a separação da composição dos espécimes de anuros parasitados, nos dois ambientes estudados (floresta e palma) (Fig. 3).



**Figura 3.** Análise de coordenadas principais PCoA da anurofauna parasitada em fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro, Município de Tailândia, Pará, Brasil.

### Distribuição dos hemoparasitos por hábitat do hospedeiro

Foram registradas 16 espécies de anuros de hábito arborícola (68 espécimes) e 12 espécies de anuros terrestres (60 espécimes). Foram identificados seis táxons de hemoparasitos em 25 indivíduos de anuros arborícolas, apresentando seis infecções mistas. Os hemoparasitas mais frequentes nos anuros arborícolas foram os tripanossomas em oito espécies a exemplo de *Boana geographica*, *Boana multifasciata*, *Dendropsophus minutus* e *Scinax gr. ruber* em 14/25 (60%) (Tabela 2), seguido de Microfilárias em *Boana geographica*, *Boana multifasciata* e *Scinax gr. ruber*. *Trachycephalus*



*typhonius* apresentou um Apicomplexa não identificado. Já os anuros terrestres apresentaram cinco grupos de hemoparasitos, com 15 espécimes apresentando infecções mistas, metade dos 30 espécimes parasitados. As espécies de anuros terrestres também tiveram maior predomínio de tripanossomas em 24/30 (80%) espécimes, ocorrendo coinfeções dos grupos caracterizados em sete deles, e a ocorrência de Plasmódio nas espécies de *Leptodactylus pentadactylus* e *Rhinella marina*, em infecções mistas (Tabela 1).

### **Caracterização dos hemoparasitos: tripanossomas e hemogregarinas**

Os hemoparasitos do gênero *Trypanosoma* e as hemogregarinas, foram caracterizados pela morfologia e terem sido os mais frequentes encontrados nos anuros dos dois ambientes estudados. Segue:

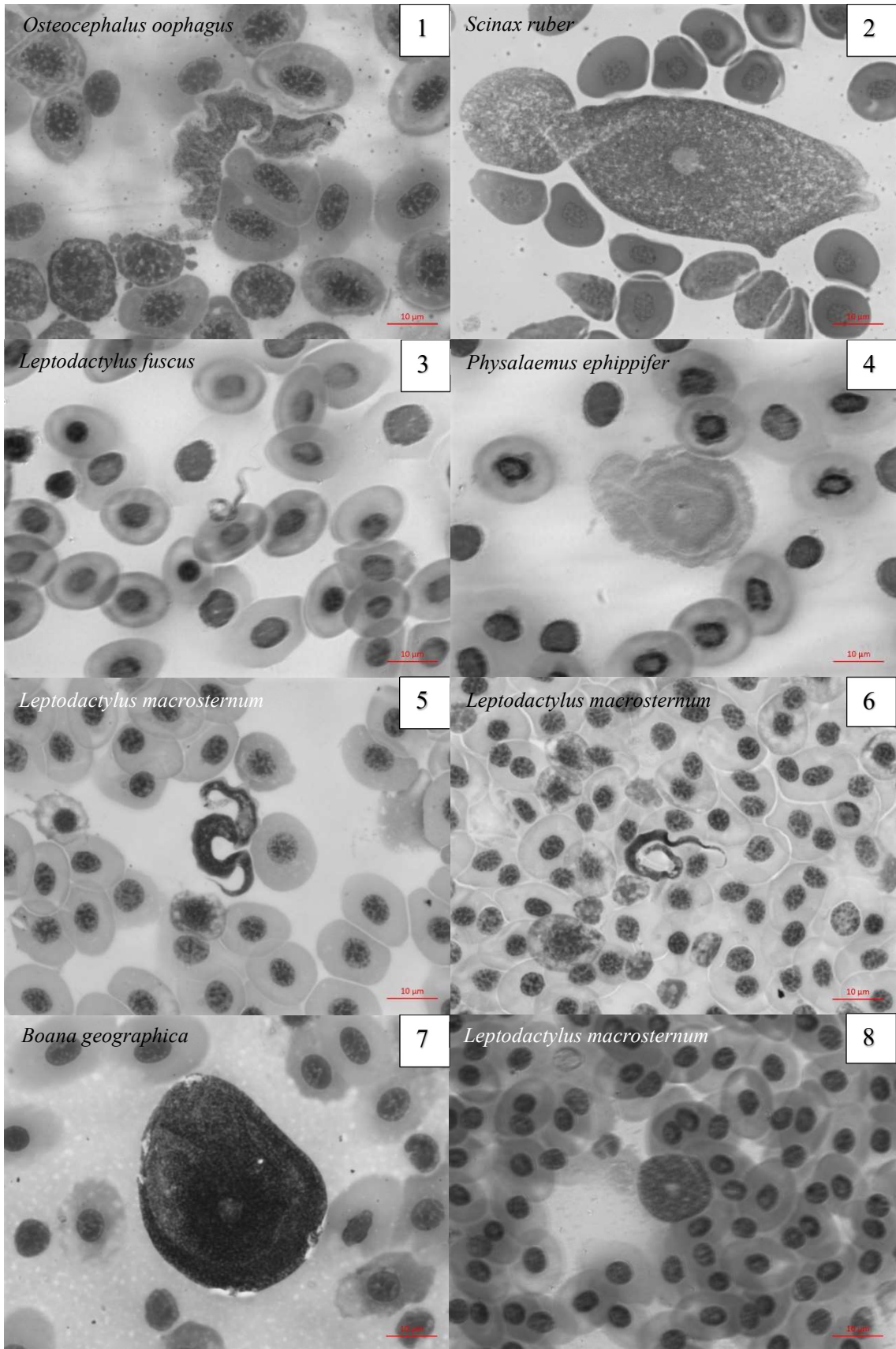
#### **Tripanossomas:**

A caracterização morfológica dos Tripanossomas foi realizada segundo Diamond (1965). Foram identificados seis grupos dos sete propostos pelo autor (Tabela 2), o que sugere uma alta diversidade de espécies do protozoário. A maioria dos flagelados observados 18/38 (47%) puderam ser classificados no Grupo A, os quais apresentam o corpo celular achatado e em forma de folha (Fig.4:1-2), seguido do Grupo D1 13/38 (34%), como parasitos de corpo alongado, com cinetoplasto mais próximo do núcleo que da extremidade posterior (Fig.4:5) (Tabela 2).

Em ambos os ambientes (floresta preservada e plantação de dendezeiro), os espécimes de anuros terrestres, 47% do total (n=128), foram os mais infectados por parasitos do gênero *Trypanosoma* (n=23). Quando consideramos apenas os espécimes parasitados em ambos ambientes (n=55), 69% apresentaram trypanossomatídeos no sangue periférico (38/55) (Tabela 2), dos quais, 32% (12/38) apresentaram infecções mistas por mais de um morfotipo. O número de infecções mistas por Tripanossomas na plantação de dendezeiro (n=8) duplicou em relação às encontradas na área de



floresta preservada (n=4). Quando analisamos os ambientes de forma separada, na área de floresta preservada, 17 espécimes de anuros apresentaram tripanosomas em sangue periférico, a maioria dos indivíduos parasitados (n=10) correspondiam a espécies de habito arborícola (*Dendropsophus minutus*, *Boana geographica*, *B. multifasciata*, *Osteocephalus oophagus*, *Phyllomedusa bicolor*, *Pithecopus hypochondrialis* e *Trachycephalus typhonius*) (Tabela 2). Já na área de plantação, dos 21 espécimes de anuros parasitados por tripanosomas, a maioria (n=16) correspondia a anuros de habito terrestre (*Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus macrosternum*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus paraensis*, *Physalaemus ephippifer* e *Rhinella mirandaribeiroi*) (Tabela 2).



**Figura 4.** Caracterização dos parasitos do gênero *Trypanosoma* encontrados em anuros dos fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro, Município de Tailandia, Pará, Brasil. Segue: 1-2: Grupo A; 3) Grupo B; 4: Grupo C; 5: Grupo D1; 6: Grupo D2; 7-8: Grupo F. Barras de escala = 10 µm.

**Tabela 2:** Anuros infectados por parasitos do gênero *Trypanosoma* em fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro, Município de Tailandia, Pará, Brasil.

<b>Espécimes/Ambiente</b>	<b>Hábito</b>	<b>Grupos de tripanossomas</b>
<b>Floresta preservada</b>		
<i>Dendropsophus minutus</i>	Arborícola	D2
<i>Boana multifasciata</i>	Arborícola	A
<i>Boana geographica</i>	Arborícola	A; F
<i>Boana geographica</i>	Arborícola	A; D1
<i>Boana geographica</i>	Arborícola	D1
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Terrestre	D2
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Terrestre	D1
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Terrestre	A; D1; D2; F
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Terrestre	D1
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Terrestre	D1
<i>Osteocephalus oophagus</i>	Arborícola	A
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Arborícola	A; C
<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	Arborícola	A
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Terrestre	F
<i>Rhinella margaritifera</i>	Terrestre	F
<i>Trachycephalus typhonius</i>	Arborícola	A
<i>Trachycephalus typhonius</i>	Arborícola	A
<b>Plantação de dendezeiro</b>		
<i>Boana multifasciata</i>	Arborícola	D2
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Terrestre	B; D1; D2
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Terrestre	A; D1; D2

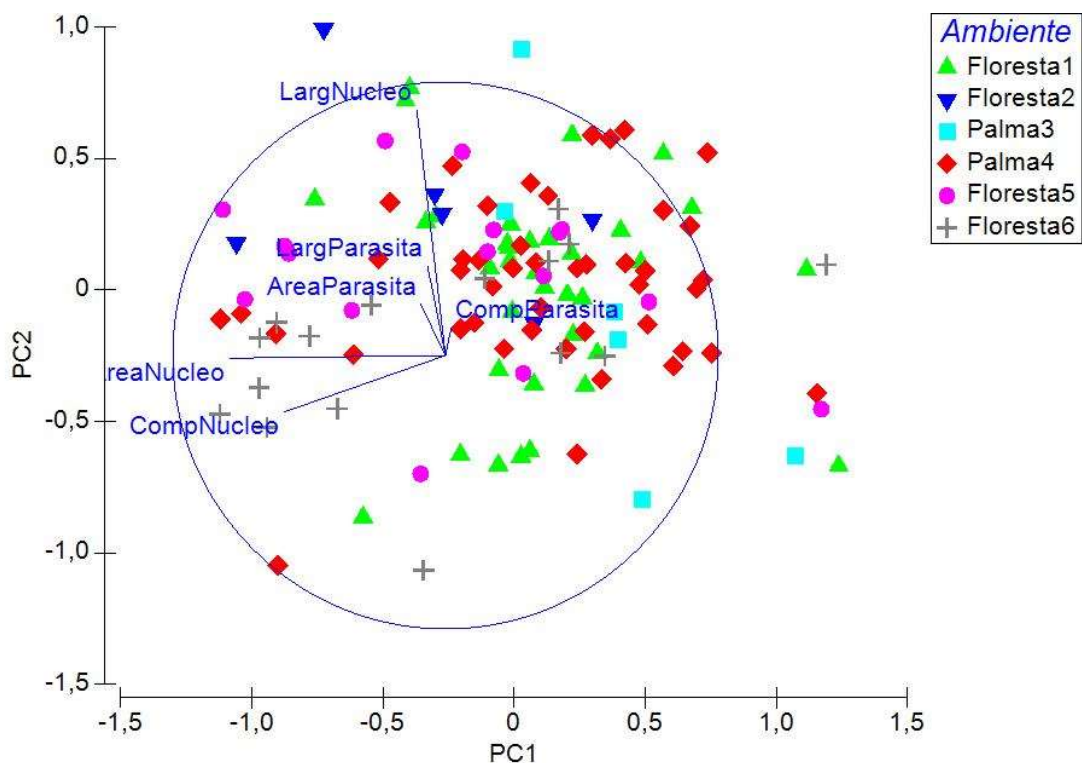
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Terrestre	A; F
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	A; D1; D2
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	A
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	D2
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	D1; F
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	F
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	A
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	D1; D2
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Terrestre	A
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Terrestre	A
<i>Leptodactylus paraenses</i>	Terrestre	F
<i>Physalaemus ephippifer</i>	Terrestre	C
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Terrestre	D2
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Terrestre	D2
<i>Scinax gr. ruber</i>	Arborícola	A; D1
<i>Scinax gr. ruber</i>	Arborícola	A; D1
<i>Trachycephalus typhonius</i>	Arborícola	D2
<b>Total = 38</b>		

---

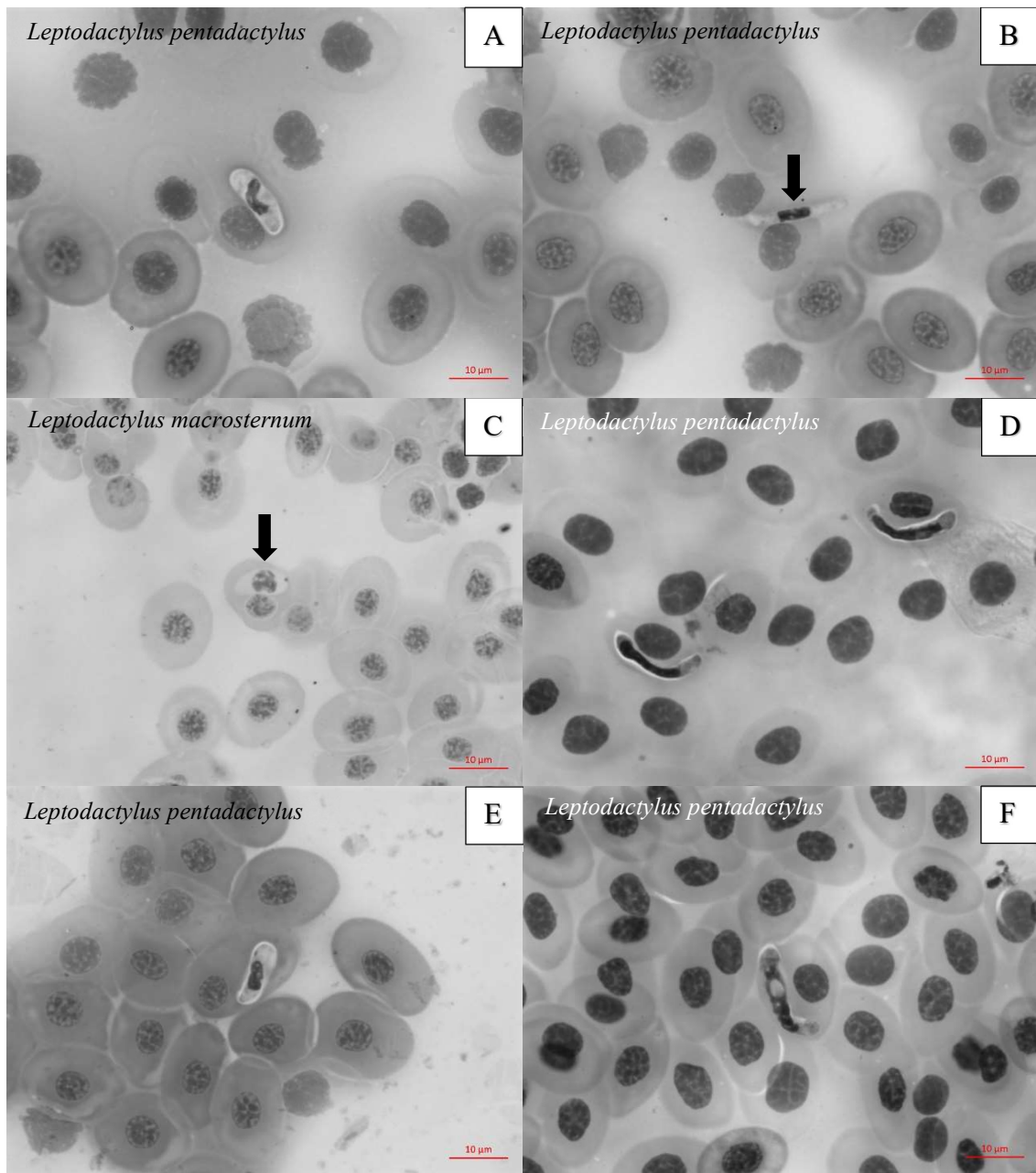
### Hemogregarinas:

O grupo das hemogregarinas foi o segundo mais frequente (Fig.6), em 20/55 (36%) dos espécimes parasitados, também principalmente em anuros de hábito terrestre. De seis espécimes analisados que estavam muito parasitados, quatro foram encontrados na floresta (*L. pentadactylus*) e dois espécimes (*L. macrosternum* e *L. paraensis*, respectivamente) nas áreas de plantação de dendezeiro. O resultado da análise de componente principal (PCA), onde em seus dois primeiros eixos explicaram 51.4% da variação dos dados métricos, no primeiro eixo foi explicado uma variação de 34,4% dos dados. No eixo 1 a variável que mais contribuiu positivamente foi o comprimento do

parasita. O eixo 2 explicou 17% da variação dos dados e a variável que mais contribuiu para a formação do eixo foi Largura do Núcleo. Foram observados dois agrupamentos, onde o agrupamento com menos indivíduos no gráfico tem influência direta das variáveis (Área e Comprimento do Núcleo) com medidas menores, enquanto que o outro grupo possui valores inversamente proporcionais, com medidas maiores dessas variáveis. Isso indica que existem duas possíveis morfometrias distintas de hemogregarinas, com a diferença que um espécime localizado em ambiente de plantação de dendezeiro (Palma3) correspondendo ao *L. macrosternum* só apresentou um tipo de morfometria, com medidas maiores, principalmente quanto a área e comprimento do núcleo das hemogregarinas (Fig. 5). Além desse resultado, observamos que existem várias morfologias diferentes, e análises moleculares devem ser realizadas *a posteriori* para a identificação mais acurada.



**Figura 5.** Análise de Componentes Principais (PCA) para a ordenação de seis amostras de espécimes de anuros parasitados por hemogregarinas. Legenda: Floresta1: *L. pentadactylus*; Floresta2: *L. pentadactylus*; Palma3: *L. macrosternum*; Palma4: *L. paraensis*; Floresta5: *L. pentadactylus*; Floresta6: *L. pentadactylus*.



**Figura 6.** Imagens de hemogregarinas encontradas em sangue periférico de anuros dos fragmentos florestais preservados e plantação de dendezeiro, Município de Tailandia, Pará, Brasil: A; B; C; D; E; F. Barras de escala = 10 µm.

## Discussão

A região Neotropical apresenta a maior diversidade de anuros do mundo (Duellman, 1988, 1999; Buckley & Jetz, 2007). Associados a esses animais, estão inúmeras espécies e formas de microrganismos ainda pouco explorados cientificamente. No presente trabalho, verificamos a ocorrência de hemoparasitos de anuros presentes em áreas de monocultura de dendezeiro e áreas de floresta preservada.

Verificamos que apesar dos ambientes serem estruturalmente diferentes, os sete grupos taxonômicos de hemoparasitos observados foram encontrados tanto na área de floresta, quanto na plantação de dendezeiro. Uma possível explicação, pode ser a proximidade dos fragmentos florestais com a matriz de dendezeiro, o que pode auxiliar na circulação dos hospedeiros anuros e seus vetores infectados entre as áreas. Em um estudo realizado na África do Sul, a diversidade de hemoparasitos era maior em áreas preservadas, diminuindo nas regiões mais antropizadas (Netherlands et al., 2015). No entanto, no mencionado estudo, as áreas de coleta de anuros infectados apresentavam uma distância significativa, estando localizadas em regiões geográficas diferentes.

Quando consideramos as assembleias de anuros de ambos os ambientes, constatamos que metade dos anuros coletados estavam infectados por algum tipo de hemoparasito, em infecções simples ou mistas intracelulares ou extracelulares. Esta alta prevalência de parasitos difere do encontrado por Leal et al. (2009) em áreas de São Paulo e Mato Grosso do Sul onde, dos 40 espécimes de anuros coletados, 20% estavam infectados por algum tipo de hemoparasito. Da mesma forma, Netherlands et al. (2015) descreveu uma taxa de infecção de 20% em 436 anuros coletados na região norte da África do Sul. Porém em ambos trabalhos, os fragmentos encontravam-se distantes e com níveis de antropização distintos.

Comparamos os habitats específicos em cada um dos ambientes estudados, e observamos que, dos anuros de habitat terrestre em ambiente de plantação, 64% (n=22/34) apresentam pelo menos um parasito em sangue periférico, quando comparado aos anuros terrestres em ambiente de floresta

(30,7%, n=8/26). Da mesma forma, o número de infecções mistas, foi maior na área de dendezeiro. Por outro lado, a quantidade de anuros infectados de habitat arborícola foi similar entre os dois ambientes (dendezeiro=37,9%; floresta=35,8%). O número elevado de anuros infectados em áreas de plantação contrastam com os resultados obtidos em um estudo realizado na África do Sul, onde a diversidade de parasitos em anuros infectados diminuía em áreas com maior grau de antropização (Netherlands et al., 2015).

Com relação aos hemoparasitos encontrados nos anuros, o grupo dos tripanossomatídeos foi o que apresentou maior prevalência em ambas as áreas estudadas. Estes protozoários são comumente encontrados no sangue de anuros em diferentes partes do mundo (Bardsley & Harmsen, 1973), tendo uma ampla diversidade de vetores hematófagos (Smith, 1996). Do total de 17 espécies de anuros parasitadas nos dois ambientes (floresta preservada e plantação de dendezeiro), esse grupo de parasitos esteve presente em 16 delas, exceto em *Rhinella marina*. No entanto, Attias et al. (2016) demonstraram que essa espécie também é suscetível a infecção.

Parasitos do gênero *Trypanosoma* apresentaram uma ampla diversidade morfológica em infecções de anuros. Ainda, uma única espécie de tripanossoma pode apresentar um alto polimorfismo quando infecta diferentes espécies de anuros (Scorza & Boyer, 1958). Estas mudanças morfológicas podem ser atribuídas à expressão diferencial de um mesmo genoma ou a infecção por várias linhagens do mesmo parasito (Ferreira, 2007). No entanto, apesar das limitações metodológicas observamos alta diversidade morfológica, que baseado em Diamond (1965), nos permitiu identificar sete diferentes morfotipos de tripanossomatídeos, assim como outros estudos se basearam (Desser, 2001; Zickus, 2002). Os nossos resultados mostraram que a maioria das infecções por tripanossomas correspondiam à parasitos do morfotipo A e D1, o que pode indicar uma ampla distribuição das espécies destes protozoários em ambas as áreas estudadas. Zickus e colaboradores (2002) conseguiram identificar quatro morfotipos de um parasito que foi atribuído a *Trypanosoma*



*rotatorium*, onde todos os tipos morfológicos observados em sangue periférico de anuros da Lituânia apresentavam a mesma prevalência (Zickus, 2002).

Quando comparamos as infecções por esse grupo em ambiente de floresta com as de ambiente de plantação, podemos observar que a maioria das infecções mistas (com mais de um morfotipo de tripanossoma por anuro), são principalmente encontradas em áreas de plantação. Este achado pode indicar que os anuros de área modificada podem estar mais suscetíveis a interação com os vetores hematófagos destes parasitos (Borkent, 2008; Bernal & Pinto, 2016). Um efeito similar pode ser observado na transmissão de patógenos na população humana, onde a mudança de fatores climáticos e um elevado nível de antropização pode alterar a transmissão de doenças vinculadas por vetores (Cable et al., 2017). Por esse motivo, tanto a transmissão, quanto a ocorrência de parasitos podem ter uma elevação ou diminuição devido as inúmeras atividades humanas. Assim King et al. (2010) sugeriram que parasitos de anfíbios são indicadores de saúde do ecossistema e biodiversidade animal, agindo como indicador para conservação, já que como observado por Marcogliese (2005) a composição e diversidade da comunidade dos parasitos podem variar e indicar o estresse geral do ambiente.

Da mesma forma, as infecções por hemogregarinas, segundo grupo de protozoários mais frequente, que caracterizamos em dois morfotipos a partir da análise morfométrica realizada de seis espécimes de anuros mais parasitados. Estes hemoparasitos foram principalmente encontrados na área de dendezeiro, onde 15 indivíduos (45%) estavam infectados. Na área de floresta encontramos apenas cinco espécimes (23%) referentes a espécie *L. pentadactylus* infectados com hemogregarinas. Estes achados diferem de estudos no continente africano, onde as hemogregarinas são o grupo de parasitos mais prevalente em anuros quando comparado com os demais protozoários sanguíneos (Readel & Goldberg, 2010; Netherlands et al., 2015).

Ambientes mais simples e homogêneos tem uma perda significativa da biodiversidade original. A plantação de dendezeiro pode abrigar uma diversidade muito menor de anuros quando

comparado com um ambiente preservado (Correa et al., 2015). Baseado nisso, o presente estudo conseguiu comprovar que, além da diminuição da diversidade de hospedeiros anuros, a assembleia na área de plantação mostra uma prevalência maior de animais infectados por hemoparasitos, indicando que estes indivíduos estariam mais expostos à estresses pela mudança do ambiente (McMahon et al., 2017) e a vetores que podem transmitir estes patógenos (Ferguson & Smith, 2012).

Um parasito intracelular não identificado foi encontrado na espécie de *Trachycephalus typhoni*, espécie arborícola, que apesar de não ter sido analisado a parasitemia, foi possível perceber altas taxas de infecção nos dois espécimes parasitados, muito similar com o parasito também não caracterizado por Desser (2001). O achado de um novo parasito do Filo Apicomplexa, não identificado até o momento, assim como a presença de microfilárias em sangue periférico de anuros motiva o desenvolvimento de novas pesquisas destinadas ao entendimento da importância destes parasitos em áreas de floresta preservada e regiões mais antropizadas.

## **Conclusão**

Áreas de floresta preservada conseguem manter uma maior diversidade de micro-habitats, assim como a fauna presente neles. Por outro lado, a utilização de solo para monocultura comprovadamente consegue modificar este panorama, diminuindo a diversidade de organismos. Este fato pode levar a um desequilíbrio na transmissão de patógenos, alterando de forma significativa a sobrevivência de hospedeiros suscetíveis. A partir dos nossos resultados constatamos que os anuros encontrados em um ambiente de plantação de dendezeiro estão mais expostos a infecções parasitárias, quando comparados com anuros de área de floresta preservada, principalmente as espécies de hábito terrestre. Nos dois ambientes o parasitismo por protozoários do gênero *Trypanosoma* foi o predominante, seguido da infecção por hemogregarinas. A observação morfológica nos permitiu deduzir que existe uma alta diversidade dentro dos hemoparasitos encontrados em ambos os ambientes estudados. Estudos futuros utilizando técnicas moleculares e genéticas, assim como a

caracterização dos seus possíveis vetores permitirão definir o grau de alteração na transmissão de patógenos nos anuros de ambientes alterados.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão da bolsa; Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia UFPA/MPEG; A Partnerships for International Research and Education (PIRE-USA); Conservation International (CI) e ao Grupo AGROPALMA; Ao Projeto SISBIOTA. Ao IBAMA pela permissão de coleta de espécimes de anuros, número: 8716-1 (processo: 12420-2).

### **Referências**

- Albuquerque, M.F.; Souza, E.B.; Oliveira, M.C.F.; Souza-Jr, J.A. (2010) Precipitação nas mesorregiões do Estado do Pará: Climatologia, variabilidade e tendências nas últimas décadas (1978-2008). *Revista Brasileira de Climatologia*, 6: 151-168.
- Attias, M., Sato, L.H., Ferreira, R.C., Takata, C.S., Campaner, M., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. & Souza, W. (2016) Developmental and Ultrastructural Characterization and Phylogenetic Analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp. of Brazilian Leptodactilydae Frogs. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(5), 610-622.
- Bardsley, J.E. & Harmsen, R. (1973) The trypanosomes of anura. In *Advances in Parasitology* (Vol. 11, pp. 1-73). Academic Press.
- Barta, J.R. & Desser, S.S. (1984) Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*, 20(3), 180-189.

- Bengtsson, J., Nilsson, S.G., Franc, A. & Menozzi, P. (2000) Biodiversity, disturbances, ecosystem function and management of European forests. *Forest ecology and management*, 132(1), 39-50.
- Bernal, X. E. & Pinto, C. M. (2016) Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting túngara frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 40-47.
- Blaustein, A.R. & Kiesecker, J.M. (2002) Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, 5(4), 597-608.
- Borkent, A. (2008) The frog-biting midges of the world (Corethrellidae: Diptera). Purrujas de las ranas del Mundo (Corethrellidae: Diptera). *Zootaxa*, 1804, 1-456.
- Buckley, L.B. & Jetz, W. (2007) Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1614), 1167-1173.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A. R., Morgan, E. R., Murray, K., Pascoe, E.L., Sait, S.M., Wilson, A.J. & Booth, M. (2017) Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372(1719), 20160088.
- Correa, F.S., Juen, L., Rodrigues, L.C., Silva-Filho, H.F. & Santos-Costa, M.C. (2015). Effects of oil palm plantations on anuran diversity in the eastern Amazon. *Animal Biology*, 65(3-4), 321-335.
- Cunha, E. J., de Assis Montag, L. F. & Juen, L. (2015) Oil palm crops effects on environmental integrity of Amazonian streams and Heteropteran (Hemiptera) species diversity. *Ecological Indicators*, 52, 422-429.

- Desser, S.S. & Yekutieli, D. (1986) Blood parasites of amphibians and reptiles in Israel. *Israel Journal of Zoology*, 34(1-2), 77-90.
- Desser, S.S. (2001) The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *J. Parasitol.*, v.87, n.1, p.152-160.
- Diamond, L.S. (1965). A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. *Wildlife disease*, 44, 1.
- Duellman, W.E. (1988) Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79-104.
- Duellman, W.E. (1999) *Global distribution of amphibians: patterns, conservation, and future challenges* (pp. 1-30). Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Eterovick, P.C., de Queiroz Carnaval, A.C.O., Borges-Nojosa, D.M., Silvano, D.L., Segalla, M.V. & Sazima, I. (2005) Amphibian Declines in Brazil: An Overview1. *Biotropica*, 37(2), 166-179.
- Ferguson, L.V. & Smith, T.G. (2012) Reciprocal trophic interactions and transmission of blood parasites between mosquitoes and frogs. *Insects*, 3(2), 410-423.
- Ferreira, L.F. (1973) O fenômeno parasitismo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 7(4), 261-277.
- Ferreira, R.C. (2007) Diversidade e filogenia de Tripanossomas de anuros (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 127pp.
- Ferreira, R.C., Campaner, M., Viola, L.B., Takata, C.S.A., Takeda, G.F. & Teixeira, M.M.G. (2007) Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran

trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*, 134(11), 1623-1638.

Ferreira, L.F., Chieffi, P.P. & Araujo, A. (2012) Parasitismo não é doença parasitária. *Norte Ciência*, 3 (1), 200-221.

Froeschke, G., Van der Mescht, L., McGeoch, M. & Matthee, S. (2013) Life history strategy influences parasite responses to habitat fragmentation. *International Journal for Parasitology* 43, 1109-1118.

Frost, Darrel R. 2018. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>, acces on 28 May 2018.

Goater, T.M., Goater, C.P. & Esch, G.W. (2013) *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press. 459-473.

Hyne, R.V., Wilson, S. & Byrne, M. (2009) Frogs as bioindicators of chemical usage and farm practices in an irrigated agricultural area. *Final Report to Land & Water Australia*. 33pp.

Honigberg, B.M. (1963) Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 10(1), 20-63.

Hudson, P.J., Dobson, A.P. & Lafferty, K.D. (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(7), 381-385.

King, K.C., Mclaughlin, J.D., Boily, M. & Marcogliese, D.J. (2010) Effects of agricultural landscape and pesticides on parasitism in native bullfrogs. *Biological Conservation*, 143(2), 302-310.

Koh, L.P. & Wilcove, D.S. (2008) Is oil palm agriculture really destroying tropical biodiversity?. *Conservation letters*, 1(2), 60-64.

- Leal, D.D., O'dwyer, L.H., Ribeiro, V.C., Silva, R.J., Ferreira, V.L. & Rodrigues, R.B. (2009) Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2), 199-206.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljandky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. (1980) A newly-revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, v. 27, p. 37-58.
- Luz, H.R. & Faccini, J.L.H. (2013) Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil. Revisão. *Veterinária e Zootecnia*, 20, 100-111.
- Marcogliese, D.J. (2005) Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health?. *International journal for parasitology*, 35(7), 705-716.
- Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D. & Boily, M. (2009) Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 126-134.
- Mendes-Oliveira, A.C., Peres, C. A., Maués, P.C.R.D.A., Oliveira, G.L., Mineiro, I.G., de Maria, S.L.S. & Lima, R.C. (2017) Oil palm monoculture induces drastic erosion of an Amazonian forest mammal fauna. *PloS one*, 12(11).
- McMahon, T.A., Rohr, J.R. & Bernal, X.E. (2017) Light and noise pollution interact to disrupt interspecific interactions. *Ecology*, 98(5), 1290-1299.
- Moreira, D., López-García, P. & Vickerman K. (2004) Na updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54:1861-1875.

- Moretti, E.H. (2011) Correlações comportamentais, fisiológicas e morfológicas da carga parasitária em *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae). Dissertação de Mestrado, 78p.
- Netherlands, E.C., Cook, C.A., Kruger, D.J., du Preez, L.H. & Smit, N.J. (2015) Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 135-141.
- Oliveira, L.L., Fontinhas, R.L., Lima, A.M.M. & Lima, R.J.S. (2000) Mapas dos parâmetros climatológicos do Estado do Pará: Umidade, temperatura e insolação, médias anuais. XIII Congresso Brasileiro de Meteorologia. 29/08 a 03/09/2000. Fortaleza – Ceará. Núcleo de Hidrometeorologia – SECTAM.
- Readel, A.M. & Goldberg, T.L. (2010) Blood parasites of frogs from an equatorial African montane forest in western Uganda. *Journal of Parasitology*, 96(2), 448-450.
- Scorza, J.V., & Dagert, C.M. (1958) Sobre la sinonímia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. *Boletín Venezolano de Laboratorio Clínico*, 3, 29-36.
- Silvano, D.L. & Segalla, M.V. (2005) Conservation of Brazilian amphibians. *Conservation Biology*, 19(3), 653-658.
- Smith, T.G. (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.*, v. 82, n.4, p. 565-585.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: [http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/Lista\\_Anfibios2016.pdf](http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/Lista_Anfibios2016.pdf), acesso em 20 de Novembro de 2016.
- Telford Jr, S.R. (2016) *Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text*. CRC Press.



- Thompson, R.C., Lymbery, A.J. & Smith, A. (2010) Parasites, emerging disease and wildlife conservation. *International Journal for Parasitology* 40, 1163-1170.
- Valencia-Aguilar, A., Ruano-Fajardo, G., Lambertini, C., Leite, D.S., Toledo, L.F. & Mott, T. (2015) Chytrid fungus acts as a generalist pathogen infecting species-rich amphibian families in Brazilian rainforests. *Dis Aquat Org* 114: 61–67.
- Vickerman, K.W.H.R. (1976) The diversity of the kinetoplastid flagellates. *Biology of the Kinetoplastida*, 1-34.
- Von Zuben, C.J. (1997) Implicações da agregação espacial de parasitas para a dinâmica populacional na interação hospedeiro-parasita. *Revista de Saúde Pública*, 31(5), 523-530.
- Woo, P.T., & Bogart, J.P. (1984) Trypanosoma spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distributions and prevalences. *Canadian journal of zoology*, 62(5), 820-824.
- Wosniak, E.J., McLaughlin, G.L. & Telford, S.R. (1994) Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert Sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). *J. Zoo.Wild. Med.*, v. 25, n. 1, p. 103-110.
- Zar, J.H. (2010) *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Žičkus, T. (2002) The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 12(2), 197-202.

## APÊNDICES

**Apêndice 1:** Com todas informações dos anuros encontrados, parasitados e não parasitados. Siglas: Apicomplexa não identificado= ApiNI; Dactylosoma= Dac; Hemogregarina= Hem; Inclusão Bacteriana ou Viral= Incl; Microfilária= Mic; Trypanosoma= Try.

<i>Espécies</i>	<i>Prevalência</i>															
	<i>Floresta</i>								<i>Palma</i>							
<i>Arborícolas</i>	<i>N</i>	<i>ApiNI</i>	<i>Dac</i>	<i>Hem</i>	<i>Incl</i>	<i>Mic</i>	<i>Plas</i>	<i>Try</i>	<i>ApiNI</i>	<i>Dac</i>	<i>Hem</i>	<i>Incl</i>	<i>Mic</i>	<i>Plas</i>	<i>Try</i>	
<i>Dendropsophus leucophylatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Dendropsophus minutus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Boana cinerascens</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Boana geographica</i>	7	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Boana multifasciata</i>	16	0	1	0	3	1	0	1	0	1	3	0	1	0	1	
<i>Osteocephalus leprieurii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Osteocephalus oophagus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

<i>Phyllomedusa bicolor</i>	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Scinax boesemani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scinax x-signatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scinax nebulosus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scinax gr. ruber</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
<i>Sphaenorhynchus lacteus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trachycephalus typhoni</i>	7	1	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1
<i>Vitreorana oyapiensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>Terrestres</b>															
<i>Leptodactylus fuscus</i>	5	0	0	1	2	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	2	0	0	8

<i>Leptodactylus mystaceus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
<i>Leptodactylus paraensis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	7	0	0	5	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptodactylus petersii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptodactylus sp.</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Physalaemus ephippifer</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Rhaebo guttatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhinella margaritifera</i>	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhinella marina</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	

**Apêndice 2:** Informações dos espécimes com infecções simples e mistas nas áreas de floresta e plantação de palma.

Nº Tombo	Especimes parasitados	Hemoparasitas	Floresta	Palma	Habitat
AGRO023	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	hemogregarina e tripanosomatideo		X	Terrestre

AGRO017	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	hemogregarina e tripanosomatideo	X		Terrestre
AGRO053	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	hemogregarina e tripanosomatideo	X		Terrestre
AGRO018	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	hemogregarina, plasmódio e tripanosomatideo	X		Terrestre
AGRO040	<i>Leptodactylus paraenses</i>	hemogregarina		X	Terrestre
AGRO078	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	hemogregarina e tripanosomatideo	X		Terrestre
AGRO020	<i>Scinax gr. ruber</i>	tripanosomatideo e microfilária		X	Arborícola
AGRO036	<i>Scinax gr. ruber</i>	tripanosomatideo		X	Arborícola
AGRO060	<i>Boana multifasciata</i>	tripanosomatideo		X	Arborícola
AGRO065	<i>Boana geographica</i>	tripanosomatideo	X		Arborícola
AGRO066	<i>Boana geographica</i>	tripanosomatideo	X		Arborícola
AGRO084	<i>Boana geographica</i>	microfilária	X		Arborícola
AGRO085	<i>Osteocephalus oophagus</i>	tripanosomatideo	X		Arborícola
AGRO126	<i>Physalaemus ephippifer</i>	tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO121	<i>Leptodactylus fuscus</i>	inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO202	<i>Leptodactylus fuscus</i>	inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatideo	X		Terrestre
AGRO123	<i>Leptodactylus fuscus</i>	tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO152	<i>Leptodactylus fuscus</i>	tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO230	<i>Leptodactylus fuscus</i>	hemogregarina		X	Terrestre
AGRO151	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO160	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	tripanosomatideo		X	Terrestre
AGRO213	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	hemogregarina		X	Terrestre
AGRO214	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	hemogregarina, Dactylosoma e tripanosomatideo		X	Terrestre

AGRO215	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	hemogregarina e Dactylosoma		X	Terrestre
AGRO216	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO220	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Dactylosoma, inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO221	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO229	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	hemogregarina e tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO200	<i>Rhinella margaritifera</i>	tripanosomatídeo	X		Terrestre
AGRO177	<i>Rhinella marina</i>	hemogregarina, inclusão bacteriana ou viral e plasmódio		X	Terrestre
AGRO149	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO161	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO185	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	tripanosomatídeo	X		Terrestre
AGRO128	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO218	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	hemogregarina e tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO148	<i>Leptodactylus paraensis</i>	tripanosomatídeo		X	Terrestre
AGRO203	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	hemogregarina	X		Terrestre
AGRO167	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO157	<i>Boana geographica</i>	tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO226	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	hemogregarina		X	Arborícola
AGRO237	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO204	<i>Dendropsophus minutus</i>	tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO217	<i>Scinax gr. ruber</i>	hemogregarina		X	Arborícola
AGRO136	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Apicomplexa não reconhecido e tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO138	<i>Trachycephalus typhonius</i>	inclusão bacteriana ou viral e tripanosomatídeo	X		Arborícola
AGRO162	<i>Trachycephalus typhonius</i>	tripanosomatídeo		X	Arborícola

AGRO224	<i>Trachycephalus typhoni</i>	Apicomplexa não reconhecido		X	Arborícola
AGRO238	<i>Trachycephalus typhoni</i>	Hemogregarina		X	Arborícola
AGRO178	<i>Boana multifasciata</i>	inclusão bacteriana ou viral	X		Arborícola
AGRO181	<i>Boana multifasciata</i>	Dactylosoma e microfilária	X		Arborícola
AGRO212	<i>Boana multifasciata</i>	inclusão bacteriana ou viral	X		Arborícola
AGRO222	<i>Boana multifasciata</i>	hemogregarina e Dactylosoma		X	Arborícola
AGRO223	<i>Boana multifasciata</i>	Hemogregarina		X	Arborícola
AGRO231	<i>Boana multifasciata</i>	hemogregarina e microfilária		X	Arborícola
AGRO236	<i>Boana multifasciata</i>	tripanosomatídeo	X		Arborícola
<b>Total</b>			<b>22</b>	<b>33</b>	
<b>Infecções mistas</b>			<b>21</b>	<b>8</b>	<b>13</b>

## ANEXOS

### Anexo 1 –

#### Animal Biology

brill.com/ab



BRILL

#### *Instructions for Authors*

### Scope

*Animal Biology* (AB) publishes high quality papers and focuses on integration of the various disciplines within the broad field of zoology. These disciplines include behaviour, developmental biology, ecology, endocrinology, evolutionary biology, genomics, morphology, neurobiology, physiology, systematics and theoretical biology.

Purely descriptive papers will not be considered for publication. *Animal Biology* is the official journal of the Royal Dutch Zoological Society since its foundation in 1872. The journal was initially called *Archives*

*Néerlandaises de Zoologie*, which was changed in 1952 to the *Netherlands Journal of Zoology*, the current name was established in 2003.

### Ethical and Legal Conditions

Please note that submission of an article for publication in any of BRILL's journals implies that you have read and agreed to Brill's Ethical and Legal Conditions. The Ethical and Legal Conditions can be found here:

[brill.com/downloads/conditions.pdf](http://brill.com/downloads/conditions.pdf).



25

## 26 *Animal Ethics*

27 Submission of a manuscript implies that any experimental research that is reported has been performed with the  
28 approval of the ethics committee of the institution where the work was carried out. Research carried out on  
29 humans must be in compliance with the [Helsinki Declaration](#), and any experimental research on animals  
30 must follow national legislation and internationally recognized guidelines. A statement to this effect must  
31 appear in the Methods section of the manuscript, including the name of the body which gave approval, with a  
32 reference number where appropriate. Manuscripts will be returned to the author without review if the  
33 editorial office considers that the research has not been carried out within an ethical framework.

34

## 35 **Online Submission**

36

37 Authors should submit their manuscript online via the Editorial Manager (EM) online submission system at:  
38 [editorialmanager.com/ab](http://editorialmanager.com/ab).

39 First-time users of EM need to register first. Go to the website and click on the "Register Now" link in the login  
40 menu. Enter the information requested.

41 When you register, select e-mail as your preferred method of contact. Upon successful registration, you will  
42 receive an e-mail message containing your Username and Password. If you should forget your Username and  
43 Password, click on the "Send Username/Password" link in the login section, and enter your first name, last name  
44 and email address exactly as you had entered it when you registered. Your access codes will then be e-mailed  
45 to you.

Prior to submission, authors are strongly encouraged to read the 'Instructions for Authors'. When submitting via the website, you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. A revised document is uploaded the same way as the initial submission. The system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing purposes. All correspondence, including the editor's request for revision and final decision, is sent by e-mail.

The general process of online submission is explained in the "Author's Manual", which is available online. In brief, during the online submission you should be prepared to enter the following information:

- Article Type (Original article/Review)
- Title
- Authors (First names, initials of middle names and last names - in that order - of all authors)
- Abstract (max. 250 words) Keywords (Alphabetically ordered, max. 6)
- Additional Information:
  - Confirm that the manuscript was checked by a qualified native English speaker
  - Confirm that the article conforms to the journal's style guide and instructions
  - Indicate whether your manuscript includes colour figures
  - Indicate whether you have an image available for consideration as journal cover
- Comments (this can also be uploaded as a cover letter file). Here you can also indicate whether you want to share the link of your manuscript's evaluations in Peerage of Science ([peerageofscience.org](http://peerageofscience.org)).
- Suggest Reviewers (min. 2)
- Oppose Reviewers (optional)

- Attach Files (Manuscript, Cover letter, Table, Figure, Supplementary material, Suggested cover image)

### *Contact Address*

Editorial inquiries, proposals and suggested special issue topics should be sent to the Editor-in-Chief, Dr. Joris M. Koene, Department of Ecology, Faculty of Earth and Life Sciences, VU University, Amsterdam, the Netherlands, [editor@animal-biology.com](mailto:editor@animal-biology.com). For questions about the Editorial Manager system, authors can also contact the Brill EM Support Department at: [em@brill.com](mailto:em@brill.com).

### **Submission Requirements**

#### *Language*

Contributions to *Animal Biology* should be written in English. Spelling (British or American) should be consistent throughout. The journal office does not offer extensive English-language editing services. If authors are unsure of correct English usage, they are responsible for getting their manuscript proofread -

prior to submission - by a person proficient in English. Manuscripts in which English grammar and/or style are difficult to understand will be returned to the author for revision before scientific review.

### *Length*

Contributions should, as a rule, not exceed 12 printed pages (ca. 20 double-spaced manuscript pages with standard typeface), including figures and tables. Longer papers are sometimes allowed but only if extra space is offered by the Editor-in-Chief.

## **Manuscript Requirements**

### *General*

Manuscripts submitted for publication should be typewritten, using a standard Roman font, with double spacing and broad margins. The pages *and* lines must be numbered continuous, starting on the title page. The title page should contain: full title, name(s) of author(s) (first name fully written, only using capitals for the first letter), name(s) and address(es) of the institute(s) where the study was carried out. Author names should be separated by commas and between the last two names by '&' (ampersand symbol); references to the authors' institutes and addresses (if more than one) should be indicated with superscripted numbers next to the authors as well as preceding the institute's name in ascending order. The institutes where the work has been done should be indicated under the authors, first letters of major words in capitals. Please make sure that the full contact details of the corresponding authors (name, postal address and e-mail address) to whom decisions, proofs and a PDF file of the papers should be directed are included, and mark the corresponding author with an asterisk (\*). E.g., John Smith<sup>1,\*</sup> and John R. Doe;<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Centre for Zoological Science, <sup>2</sup>Institute for Integrative Biology.

Authors are strongly encouraged to consult a recent issue of *Animal Biology* to familiarize themselves with style and lay-out of the journal. A summary of style requirements follows below.

### *Title*

Only use a capital letter for the first letter of the title and any words, such as genus and family names, that require a capital.

### *Abstract and Keywords*

Manuscripts should be preceded by an abstract containing a summary of the aims, the results in words (please avoid using numbers and values) and the conclusions of the study. The abstract should not exceed 250 words, and should be followed by a list of keywords (alphabetically ordered, max. 6), separated by semicolons.

## Headings

Main section headings should be in **bold** (Abstract, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References or other variants, if appropriate). Use capitals only for the first letter of the heading and first letters of proper names, separated by white lines from text.

Subheadings are in *italic* type, aligned left, with capitals only for the first letter of the subheading and first letters of proper names, followed by an empty line.

Sub-subheadings should be indented and in *italic* type, with capitals only for first letter of the sub-subheading and first letters of proper names, followed by a period and the text on the same line. Headings should not be numbered in any way.

## Statistics

Means should be reported with their standard errors/standard deviations (and medians and interquartile ranges/confidence limits) and their associated sample sizes. Give full details of statistical analysis either in the text or in tables or figure legends. This information should include the type of test, the data to which it was applied, the value of the relevant statistic, the sample size and/or degrees of freedom, and the probability level (use italics for *F*, *P*, *N* and other variables). For example:

ANOVA:  $F_{2,22} = 8.79, P = 0.012$  (note the two degrees of freedom in the subscript to *F*)

Paired *t* test:  $t_{12} = 1.89, P = 0.06$  (note the degrees of freedom are here in the subscript) Chi-

square test:  $\chi^2 = 0.20, N = 12, P = 0.92$

Spearman rank correlation:  $r_s = 0.97, N = 25, P < 0.001$

Mann-Whitney U test:  $U = 95, N = 27, P < 0.05$

Post hoc significance should preferably be indicated with small letters a, b, c, etc.

### *Italics*

The use of italics other than in scientific names, (sub) headings, and variables, as well as spacing of text and phrases, should be avoided.

### *Figures and Tables*

Do not represent results both in a figure and a table. Instead, choose the most effective way for displaying your data. The words “figure, fig., figs., table, tables” should be put in the text in lower case, except at the beginning of a sentence and at the beginning of a legend or heading. They should be numbered in the order as they appear in the text.

### *Tables*

Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. They should carry a heading line *above* the table and a legend text *below* the table briefly stating the nature of the facts assembled. Abbreviations and/or symbols included in the table need to be listed below the table in alphabetical order, separated

by semi-colons (e.g., “Abbreviations and symbols: Ap, appendix; No, number; arrow, lumen; \*,  $P < 0.05$ ”). Each table must be on a separate manuscript page.

### *Figures*

Authors are responsible for taking care of reproduction fees, if any, see point 6 of the legal conditions listed above.

Full-colour figures are accepted and can be included in the digital version of the final paper. There is no charge for full colour images or figures in either the print or electronic edition. Upon acceptance of the paper, authors are encouraged to submit a high quality photograph of the animal(s) on which the work was conducted, for consideration as a cover image for the issue.

Figures should be uploaded as separate source files as .jpeg, or .tif (not .pdf). Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals in the order as they appear in the text. When a figure has several parts or panels, these should be labelled with capital letters A, B, C, etc. (small letters a, b, c, etc. are reserved for indicating significant differences, see above).

Figures must be in final form for printing. Small figures should be apt for reproduction at 6 cm width. Figures needing a large size should not exceed a width of 12.5 cm, or a length of 18 cm; enough space should be left below each figure for the caption. Lines, lettering and symbols should be suitable for the required reduction. Lettering and labels should be in Arial font. The quality of the figure must be suitable for printing - the resolution should be a minimum of 300 dpi and minimally 600 dpi for line art. The image itself must be sharp, and any text in the figure should be legible (at least font size 8 or larger when printed in its final size, see dimensions above).

Figure captions should be added on a separate sheet at the end of the main text. Abbreviations and/or symbols included in the figure need to be listed alphabetically, separated by semi-colons (e.g., “Abbreviations and symbols: Ap, appendix; No, number; arrow, lumen; \*,  $P < 0.05$ ”).



### *Footnotes*

Footnotes and abbreviations should be avoided as much as possible.

### *Supplementary Material /Data Files*

To support and enhance your manuscript, Animal Biology accepts electronic supplementary material, including supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound or video clips, large appendices, data tables and other items that cannot be included in the article PDF itself. Authors should submit the material in electronic format together with the other manuscript files and supply a concise and descriptive caption for each file. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of the broadly accepted file formats for video, audio, etc. and limit the file size (e.g., for video: max. 3 GB). Supplementary files supplied will be published online at FigShare ([www.figshare.com](http://www.figshare.com)), to which reference is made in the published article on Brill Online Books and Journals, and vice versa.

For these text files, text should be preceded by a centred title header including the following on separate lines:

- Animal Biology (Times New Roman, italics, 9 pt)
- Article title (Times New Roman, bold, 14 pt)
- Firstname+initial+familynameofeachauthor, with several authors separated by commas and the last one preceded by “and” (Times New Roman, bold, 10 pt) The heading "Supplementary material" (right-aligned, Times New Roman, bold, 12 pt) should then be followed by the supplementary text, tables and figures. Main text should be single spaced, concise, justified-aligned, in font type Times New Roman at size 12 pt. The supplementary file should be submitted in DOC(X) format and will be published online in PDF format.

### *Text Citations*

References in the text should be cited in chronological order and in the following form: White & Kinney (1974) or (Kinney, 1974; White & Kinney, 1974). Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by et al. (not in italics): Doe et al. (2011) or (Doe et al., 2011). A comma must be inserted between author and year, or between et al. and year, unless the year is between parenthesis; references should be separated by semicolons. Both the introduction and discussion must include an adequate number of citations for effective arguments to be established.

### *References*

In the list, references should be listed in alphabetical, and then chronological order, under the first author's name and should only include publications cited in the text. Journal names must be abbreviated according to their official abbreviation and should be in italics. No space must be inserted between the initials of the first names. No empty lines must be inserted between references. The year of publication should be between parentheses. Volume

numbers are not written in bold (and issue numbers of a volume should not be included). The two last authors or editors in a citation are separated by “&”.

Abstracts of conferences should not be listed in the reference list, but cited in the text as unpublished data, personal observation or personal communication. See below for examples of how references should be cited:

### *Journal Article*

References must be typed in the following order and form, respectively: Anderson, 2002

Anderson, 2003

Anderson & Bateman, 2002

Anderson, Bateman & Jones, 2001

Ketterson, E.D., Nolan, V., Wolf, L. & Ziegenfus, C. (1992) Testosterone and avian life histories - Effects of experimentally elevated testosterone on behavior and correlates of fitness in the dark-eyed Junco (*Junco hyemalis*). *Am. Nat.*, 140, 980-999.

### *Book*

Hill, R. W., Wyse, G.A. & Anderson, M. (2008) *Animal Physiology. Second Edition*. Sinauer Associates, Sunderland.

### *Chapter in a Book*

Brown, J.H. (1975) Geographical Ecology of Desert Rodents. In: M.L. Cody & J.M. Diamond (Eds) *Ecology and Evolution of Communities*, pp. 315-341. Belknap Press, Cambridge, MA.

### *Web References*

If unavoidable, references to websites can be used. In that case, the full URL as well as the date when last accessed should be given. If available, further information should also be given (e.g., DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.). Web references can be listed within the reference list.

### *Data Repositories*

When it is not possible to publish a data set as a supplementary file, *Animal Biology* encourages authors to deposit the data set on which the results are based in a publicly-accessible data repository (examples are: DRYAD, GenBank, UniProt; and model organism databases such as FlyBase, Wormbase, etc.). This section is only when a data

set is available in a repository and the text should then include: 1. the name of the repository; 2. the permanent identifier, accession number and/or persistent hyperlink for the data set. The following phrasing is recommended:

"The data set supporting the results of this article can be found in the [name of the repository] repository under permanent identifier [permanent identifier, accession number and/or persistent hyperlink for the data set]."

## **Publication**

### *Proofs*

Upon acceptance, a PDF of the article proofs will be sent to authors by e-mail to check carefully for factual and typographic errors. Authors are responsible for checking these proofs and are strongly urged to make use of the Comment & Markup toolbar in a PDF editor to note their corrections directly on the proofs. At this stage in the production process only minor corrections are allowed. Alterations to the original manuscript at this stage will result in considerable delay in publication and, therefore, are not accepted unless charged to the author. Proofs must be corrected without delay and returned to the Editor-in-Chief, Dr. J.M. Koene.

### *Page Charges*

The Journal has no page charges.

### *E-Offprints*

A PDF file of the article will be supplied free of charge by the publisher to authors for personal use. Brill is a RoMEO yellow publisher. The Author retains the right to self-archive the submitted (pre-peer- review) version of the article at any time. The submitted version of an article is the author's version that has not been peer-reviewed, nor had any value added to it by Brill (such as formatting or copy editing). The Author retains the right to self-archive the accepted (peer-reviewed) version after an embargo period of 24 months. The accepted version means the version which has been accepted for publication and contains all revisions made after peer reviewing and copy editing, but has not yet been typeset in the publisher's lay-out. The publisher's lay-out must not be used in any repository or on any website ([brill.com/resources/authors/publishing-books-brill/self-archiving-rights](http://brill.com/resources/authors/publishing-books-brill/self-archiving-rights)).

### **Consent to Publish**

#### *Transfer of Copyright*

By submitting a manuscript, the author agrees that the copyright for the article is transferred to the publisher if and when the article is accepted for publication. For that purpose the author needs to sign the **Consent to Publish** which will be sent with the first proofs of the manuscript. The signed form should be sent to the journal manager.

### *Open Access*

Should the author wish to publish the article in Open Access he/she can choose the Brill Open option. This allows for non-exclusive Open Access publication under a Creative Commons license in exchange for an Article Publication Charge (APC), upon signing a special Brill Open Consent to Publish Form.

More information on Brill Open, Brill's Open Access Model and the Brill Open Consent to Publish Form can be found on [brill.com/brillopen](http://brill.com/brillopen).