

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Utilização da rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) como modelo experimental para infecção por ranavírus

Sthefany Rosa Alfaia

Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Março – 2018

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Utilização da rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) como modelo experimental para infecção por ranavírus

Sthefany Rosa Alfaia

Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Março – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

A385u

Alfaia, Sthefany Rosa

Utilização da rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) como modelo experimental para infecção por ranavírus / Sthefany Rosa Alfaia. -- São Paulo, 2018.

viii. 47f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. *Rana catesbeiana*. 2. FV3. 3. Iridovirus. 4. Doenças emergentes. 5. Anuros. 6. Frog vírus 3. I. Cláudia Maris Ferreira Mostério. II. Título.

CDD 598.7

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

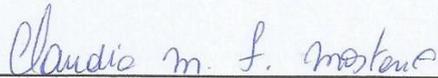
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“UTILIZAÇÃO DA RÃ-TOURO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*) COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA INFECÇÃO POR RANAVÍRUS”

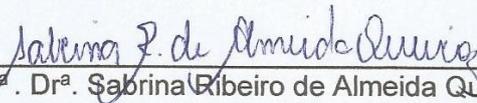
AUTORA: Sthefany Rosa Alfaia

ORIENTADOR: Profa. Dra. Claudia Maris Ferreira Mostério

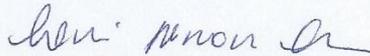
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profª. Drª. Claudia Maris Ferreira Mostério

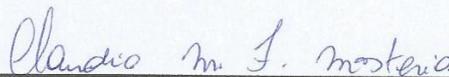


Profª. Drª. Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz



Profª. Drª. Liria Hiromi Okuda

Data da realização: 20 de março de 2018



Presidente da Comissão Examinadora
Profa. Dra. Claudia Maris Ferreira Mostério

AGRADECIMENTOS

A Dra. Claudia Maris Ferreira e Dr. Ricardo Moro pela orientação, o saber e os conselhos, além das contribuições para minha formação ética-científica e pessoal.

Ao MSc. Rainer Knoop por ter cedido todos os animais usados nesta pesquisa.

Ao Instituto de Pesca APTA/SAA-SP pela estrutura fornecida e todo apoio técnico-científico. Assim como o Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca.

As instituições de fomento: CAPES pela bolsa de mestrado concedida ao longo do meu mestrado e FAPESP pelo auxílio financeiro para compra de material e execução do projeto.

Ao Instituto Biológico por toda a parceria e por ter cedido sua infraestrutura de laboratórios e biotério para a execução do projeto.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Sanidade Animal (LISA), em nome de Dra. Ana Maria Cristina Martins, Dr. Márcio Hipolito e MSc. Luara Cassiano pelo acolhimento, ensinamentos na área histológica e a amizade.

Ao Laboratório de Virose de Bovídeos, em nome da Dra. Líria Okuda, por toda a ajuda e disposição nos momentos de necessidade.

Ao Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, em nome do Dr. Ricardo Harakava, pelas análises e paciência com os prazos apertados.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Higiene Zootécnica (USP-FZEA) e toda sua equipe pelos ensinamentos na área molecular, o apoio e os momentos de descontração entre um PCR e outro. Assim como ao Laboratório de

Parasitologia e Imunologia de Parasitas (USP-FZEA) em nome do Dr. Mateus Maldonado Carreiro.

Aos meus companheiros de laboratório que estiveram presentes não só no dia a dia, mas também em coletas, feriados e finais de semana. Diego Sales, Fernanda Menezes, Patrícia Coelho, Karen Haddad, Iara Bufarra, Fernanda Ikari e Cinthia Oliveira. Um agradecimento especial para esse último trio que estiveram mais do que presentes em todas as desventuras dos últimos dois anos.

As amigas que estiveram presentes nos momentos de comemoração e lamúrias, mas que em ambos os casos demonstraram grande suporte. Em especial Sheila, Denise, Danielle e Ana Paula. Sem o apoio de vocês o caminho teria sido ainda mais complicado.

Aos meus pais, Sirlei Aparecida Rosa Alfaia e Roberto Aparecido Alfaia, pelo apoio, paciência e compreensão durante esta jornada. Assim como toda minha família pelo incentivo.

E meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada e que tornaram este projeto possível

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO 1	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

RESUMO

Os anfíbios figuram entre um dos grupos mais diversos e de importância ecológica para o meio em que habitam porém, a redução da diversidade em nível global e a ameaça de extinção de diversas espécies os trouxe a mais uma preocupante posição de destaque. Nas últimas décadas, diversos fatores foram listados como os possíveis agentes para o declínio, em especial as causas de origem antrópica, porém as doenças emergentes, como a quitridiomicose e a ranavirose, se mostraram fortes pressões negativas a esta comunidade. A ranavirose é o termo dado a doença provocada pelos vírus do gênero ranavírus, em especial a espécie Frog virus 3 (FV3) que é a mais estudada. Sua pluralidade de hospedeiros ectotérmicos (peixes, répteis e anfíbios), distribuição geográfica abrangente e altas taxas de infectividade e letalidade tornaram a doença de notificação obrigatória por órgãos reguladores nacionais e internacionais. No país ainda existe uma incipiência de estudos a qual dificulta estimar qual a real situação de disseminação viral. Apesar de reportes de casos no país desde 2003 a única espécie atualmente afetada é a *Lithobates catesbeianus*, popularmente conhecida como rã-touro Americana. Em nosso estudo a utilizamos como um modelo experimental para avaliar o processo de infecção que acomete os animais e tentar compreender sua evolução clínica. Para isso utilizamos um controle negativo, sem a presença viral, e três tratamentos com diferentes concentrações virais (T1: $1,9 \times 10^1$ p.f.u./0,05mL; T2: $1,9 \times 10^3$ p.f.u./0,05mL e T3: $3,1 \times 10^5$ p.f.u./0,05mL). Durante 21 dias os animais foram observados buscando manifestação de sinais clínicos. Análises moleculares de PCR convencional e Tempo-Real foram utilizadas para confirmar e quantificar a presença viral nos animais infectados, assim como análises histológicas buscaram correlacionar e avaliar as lesões observadas. Neste estudo demonstramos a suscetibilidade da rã-touro pode como um modelo apropriado para esta patologia, em especial quando relacionada a aquicultura.

Palavras-chave: *Rana catesbeiana*; FV3; Iridovírus; doenças emergentes, anuros, Frog virus 3

ABSTRACT

Amphibians are among one of the most diverse and ecologically important groups in the environment they inhabit, but the reduction of diversity on a global level and the threat of extinction of several species has brought them to another worrying position. In recent decades, several factors were listed as potential agents for the decline, especially the causes of anthropogenic origin, but emerging diseases such as chytridmicosis and ranavirose, have shown strong negative contributions to this community. Ranavirose is the term given to the disease caused by viruses of the genus ranavirus, especially the Frog virus 3 (FV3) species that is the most studied. His plurality of ectothermic hosts (fish, reptiles and amphibians), wide geographic distribution and high rates of infectivity and lethality made a notifiable disease required by national and international regulatory bodies. In the country there is still incipient studies which makes it difficult to estimate what the actual viral spread situation. Although case reports in the country since 2003 the only species currently affected is *Lithobates catesbeianus*, popularly known as the American bullfrog. In our study we used it as an experimental model to evaluate the infection process that affects the animals and try to understand their clinical evolution. For this we used a negative control, without viral presence, and three treatments with different viral concentrations (T1: $1,9 \times 10^1$ p.f.u./0,05mL; T2: $1,9 \times 10^3$ p.f.u./0,05mL e T3: $3,1 \times 10^5$ p.f.u./0,05mL). For 21 days the animals were observed seeking manifestation of clinical signs. Molecular analyzes of conventional and real-time PCR were used to confirm and quantify viral presence on infected animals, as well as correlate the histological tissue damage were observed. In this study we show whether bullfrog can be used as an appropriate model for this pathology, especially when related to aquaculture

Keywords: *Rana catesbeiana*; FV3; Iridovirus; emergence disease, anurans, Frog virus 3

INTRODUÇÃO GERAL

A importância dos anfíbios em relação aos biomas é um fato já constatado por diversos autores visto suas contribuições ao meio, em especial como espécies bioindicadoras (FERREIRA *et al.*, 2004; TOLEDO, 2009). Essa característica bioindicadora traz um reflexo do estado biótico ou abiótico do meio em que vivem, além dos impactos e pressões à que estão submetidos. Sabe-se que os anuros são um dos grupos mais diversos presentes atualmente em nossa biota global, com mais de 7 mil espécies descritas (Figura 1), porém também são o grupo com o maior risco de extinção e sob pressões negativas. Estudos demonstram que das espécies globais, 32% se encontram sob ameaça de extinção, 43% em processo de declínio e 22% possuem uma ausência de dados (STUART *et al.*, 2004; LIPS *et al.*, 2006; IUCN, 2014). No Brasil a ausência de estudos de monitoramentos populacional e levantamento de dados dificulta estimar números reais de declínio e espécies ameaçadas. Presume-se que as espécies nativas se encontram afetadas, porém taxas de queda e expansão populacional fazem parte de um exercício especulativo (ETEROVICK *et al.*, 2005; HADDAD, 2008).

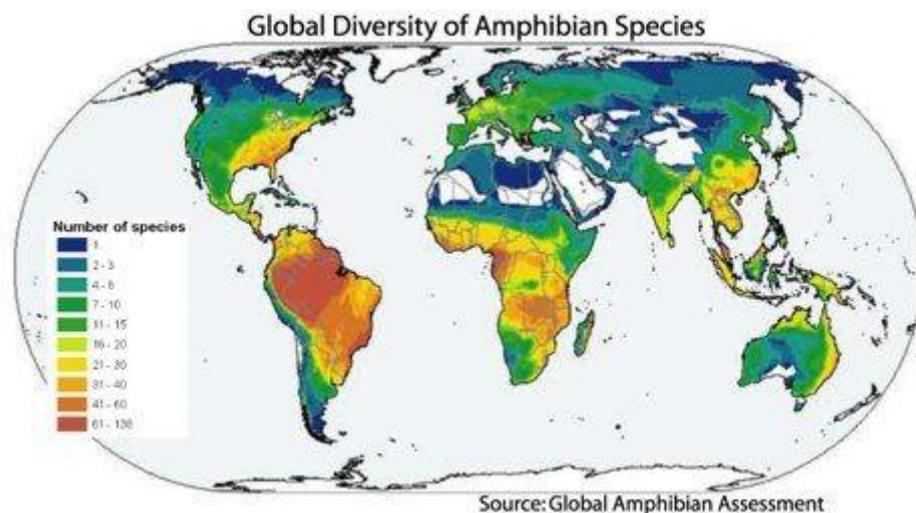


Figura 1: Mapa representando a diversidade global das espécies de anfíbios atualmente descritas. Fonte: Global Amphibian Assessment (2004) – Adaptado.

De forma majoritária, os reportes do declínio da diversidade de anfíbios datam a partir da década de 90. Estudos passaram a levantar hipóteses para

tal fato com escala global, inclusive sendo chamada da “Sexta Extinção em massa” por alguns autores (MCCALLUM, 2007; WAKE e VREDENBURG, 2008; COLLINS, 2010). Entre os processos atuantes, os de origem antrópica figuram em destaque como a poluição dos biomas, aumento do uso de pesticidas e agrotóxicos, perda e fragmentação de habitats naturais, urbanização e o avanço de grandes centros urbanos, mudanças climáticas, aumento dos raios UV-B, inserção de predadores e competidores exóticos dentro de um nicho e o aparecimento de doenças emergentes (SCHLOEGEL *et al.*, 2010; VERDADE *et al.*, 2010; ALFORD, 2011). A definição de doença emergente se dá quando uma patologia recente (aproximadamente nas duas últimas décadas) passa a se tornar uma questão problemática, havendo expansão de sua incidência, geografia e da gama de hospedeiros (DASZAK *et al.*, 2000; EDF, 2017). Para anfíbios duas doenças emergentes figuram em destaque pelo número de reportes e sua letalidade. A primeira sendo o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e a segunda os vírus do gênero *ranavirus* (GRAYFER *et al.*, 2012).

Ranavirose é o nome à doença causada dado ao grupo de vírus associados ao gênero *Ranavirus*, pertencente à família Iridoviridae. Esta família se caracteriza por vírus grandes (120-200 nm de diâmetro), icosaédricos, de genoma linear com DNA de fita dupla e podendo ou não ter a presença do envelope, sendo a presença do envelope associada a uma infectividade mais específica. Existem cinco gêneros dentro da família Iridoviridae, sendo eles: *Chloriridovirus* e *Iridovirus* (associados à insetos), *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* (associados à algumas espécies de peixes) e o gênero *Ranavirus* (Figura 2). A espécie FV3 (Frog virus 3) é a mais estudada e utilizada como modelo para os estudos dentro do gênero (CHINCHAR *et al.*, 2002; JANCOVICH *et al.*, 2010; HOVERMAN *et al.*, 2011; BRUNNER *et al.*, 2015; CLAYTOR *et al.*, 2017; CHINCHAR *et al.*, 2017).

A ranavirose afeta mais de 170 espécies, divididas entre três grupos taxonômicos diferentes: Peixes, anfíbios e répteis. As espécies reportadas figuram entre cativas e de vida livres, havendo surtos associados a produção aquícola. Sua distribuição é global (Figura 3) e sua letalidade pode chegar a 90% quando se instaura em um grupo (MILLER *et al.*, 2011; CHINCHAR e WALTZEK, 2014; DUFFUS *et al.*, 2015; OIE, 2017). Sua transmissão pode ser

indireta, oriunda do meio (água; solo; resquícios de pele), ou direta (contato direto ou ingestão), sendo considerada a transmissão direta por ingestão a mais efetiva para uma rápida replicação viral e início de surtos com mortalidade (CUNNINGHAM *et al.*, 2007; BRUNNER *et al.*, 2005).

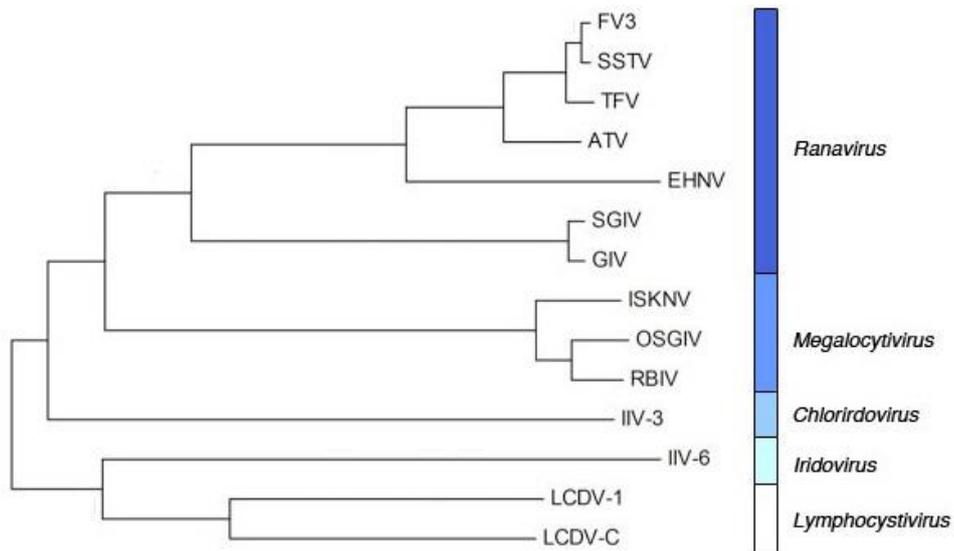


Figura 2: Cladograma da família Iridoviridae com a divisão de seus cinco gêneros (*Ranavirus*, *Megalocyctivirus*, *Chloriridovirus*, *Iridovirus* e *Lymphocystivirus*), assim como as espécies presentes dentro de cada gênero. Fonte: Eaton *et al.* 2010.

Seu ciclo de replicação é complexo e bem detalhado em revisões. Descrevo aqui uma breve síntese do processo apenas para um nível de entendimento básico. Sua entrada na célula animal diverge conforme sua conformação viral. Quando o vírion é envelopado se dá por meio de receptores mediados por processos de endocitose, associado a dependência com o pH e um revestimento de uma proteína fibrinosa denominada clatrina. Para vírions sem o envelope o processo de entrada ocorre por fusão da membrana plasmática associada com processos de acidificação, resultando na entrada de nucleoproteínas do core. Após a entrada do genoma viral no núcleo (ou membranas nucleares) o processo de transcrição do gene viral se inicia, trazendo uma ressalva de que as proteínas associadas ao virion são necessárias para tal transcrição. Dois processos ocorrem, o primeiro denominado “Precoce imediato”, onde há a transcrição utilizando de molde o

DNA do próprio virion, seguido pelo “Precoce tardio” que finaliza o processo de transcrição utilizando a RNA polimerase II do hospedeiro. O segundo estágio da replicação do DNA viral ocorre no citoplasma, onde há a metilação do DNA e a formação completa do virion e a síntese de proteínas virais. Após a montagem completa, a partícula viral é liberada da célula (CHINCHAR *et al.*, 2002; YUTIN *et al.*, 2009; CHINCHAR *et al.*, 2011).

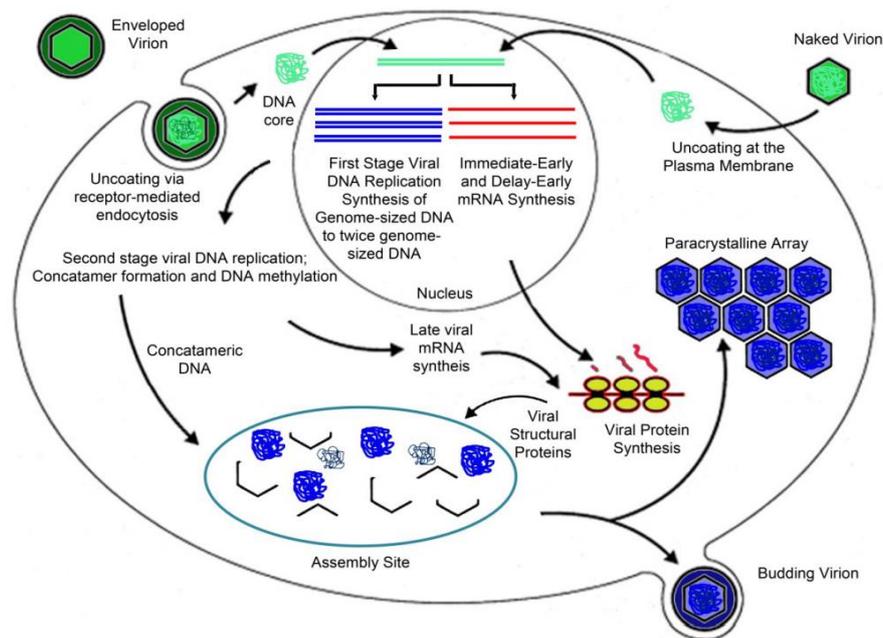


Figura 3: Síntese do processo replicativo da ranavirose. A entrada dos vírions ocorre por endocitose ou fusão com a membrana. Os núcleos virais são transportados para o núcleo celular onde sintetizam moléculas de DNA. A síntese de RNA “precoce imediato” (Immediate early) e “precoce tardio” (Delay early) ocorre no núcleo catalisado pela RNA polimerase II do hospedeiro. As proteínas virais são sintetizadas no citoplasma e a molécula de DNA com os elementos de montagem morfologicamente identificados são embalados em capsídeos. Os vírions recém-sintetizados se acumulam dentro do citoplasma antes da evasão. Fonte: Chinchar (2002) – Adaptado.

Atualmente sinais clínicos como síndrome ulcerativa crônica, síndrome hemorrágica aguda, dermatite ulcerativa, enterite, caquexia, perda de postura, perda da capacidade natatória e necrose em tecidos hepáticos, renais, linfoides e hematopoiéticos são correlacionados a ranavirose (WILLIAMS *et al.*, 2005; TEACHER *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2011; PRICE *et al.*, 2014) e mais recentemente prolapso de bexiga (OLIVEIRA, 2017). Para a confirmação do caso clínico uma análise molecular de reação da polimerase (PCR) é

necessária. Para tais análises utiliza-se um *pool* de amostras dos órgãos considerados como “alvo”: fígado, baço e rim (ROBERT e CHINCHAR, 2012; OIE, 2017). Infelizmente técnicas letais ainda são necessárias para melhor confiabilidade dos resultados. GREER e COLLINS (2007) e GRAY *et al.* (2012) sugeriram alternativas não letais de diagnóstico, a base de amostras de sangue, fezes, falanges e áreas caudais, porém a porcentagem de falsos resultados não torna esse tipo de amostragem o mais indicado. Outros tipos de metodologias de diagnóstico são microscopia eletrônica (M.E), imunohistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (HIN) (OIE, 2017).

O Frog Virus 3 (FV3) foi descoberta em 1962, em células primárias de rim da espécie *Lithobates [Rana] pipiens* (GRANOFF *et al.*, 1966), porém durante muito tempo acreditou-se que a doença possuía baixo impacto para os grupos ectotérmicos. Esta visão se alterou a partir da década de 90, quando a mesma passou a ser correlacionada a epidemias e surtos de mortalidade. Associado ao seu potencial infectivo, o aumento de distribuição geográfica e estudos sugerindo que epidemias de ranavírus poderiam gerar efeitos em dinâmicas populacionais fizeram o gênero ganhar destaque na área científica (CHINCHAR, 2002; BRUNNER *et al.*, 2015).

Estudos sugerem que a patologia possui maior infectividade em formas larvais e juvenis, além de se mostrar mais atuante nos meses de primavera e verão (WHEELWRIGHT *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2011; DUFFUS *et al.*, 2015). Estimasse que 43-57% dos surtos de mortalidade em anfíbios ocorridos na América do Norte estejam relacionados a infecções por Ranavírus (GREEN *et al.*, 2002), na Europa o Reino Unido se destaca com o declínio da população de *Rana temporaria* igualmente correlacionado a doença (TEACHER *et al.*, 2010). No Brasil o primeiro reporte observado ocorreu em 2003 (HIPOLITO *et al.*, 2003), com a primeira confirmação molecular ocorrendo nos anos seguintes (MAZZONI *et al.*, 2009). Após dez anos das primeiras descobertas da doença no país, outros autores reportaram a presença do vírus circulando especialmente pela região Centro-Oeste e Sudeste do país (MESQUITA, 2014; ALENCAR, 2016; NEVES *et al.*, 2016;) todas correlacionadas a espécie *Lithobates castebeianus* e sua atividade aquícola. Até o presente momento não há relatos de espécies nativas ou de vida-livre infectadas pela vírus.

A aquicultura é a atividade comercial cujo cunho se dá pela produção de organismos aquáticos. Atualmente se ramifica em diversos grupos como piscicultura (criação de peixes), maricultura (cultivo de animais marinhos ou estuarinos), algicultura (cultivo de macro ou microalgas), carcinicultura (cultivo de camarões) e ranicultura (cultivo de rãs) (MILLES *et al.*, 2004). Seu crescimento exponencial e sua capacidade de auxiliar a suprir a demanda mundial por proteína animal a tornou um setor de importância significativa global. No Brasil, as características geográficas associadas ao perfil agroeconômico do país faz com que a aquicultura seja uma atividade de futuro promissor (Figura 4) (OSTRENSKY, 2008; OLIVEIRA, 2009).

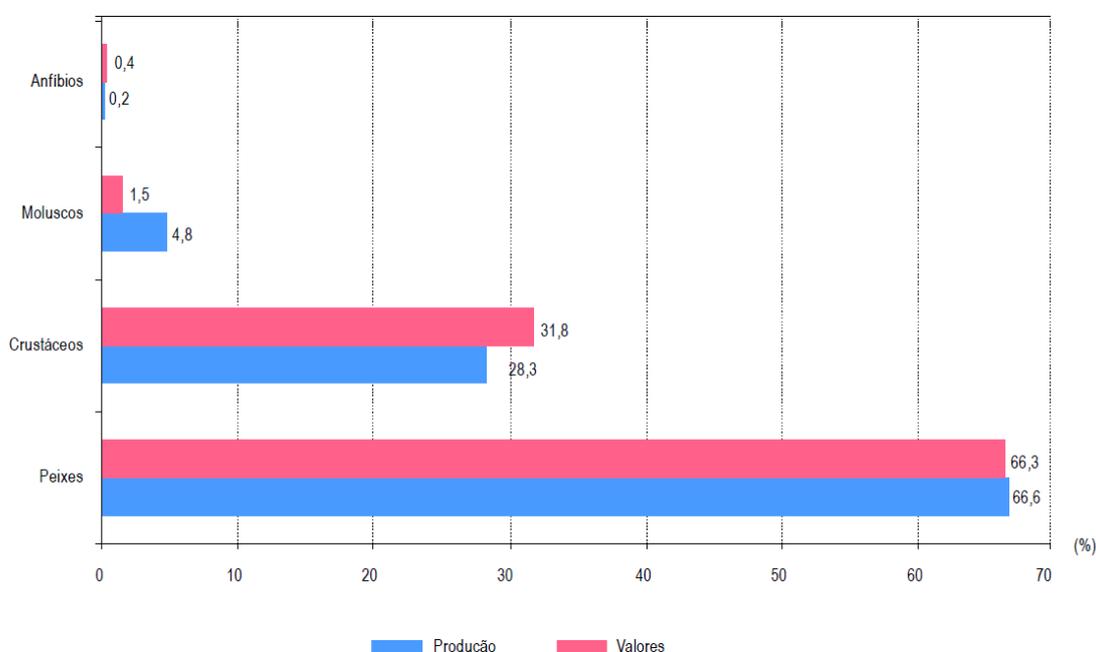


Figura 4: Produção e valores gerados pela produção aquícola brasileira em 2006 com dados obtidos pela FAO. Fonte: Ostrensky, A (2008).

No âmbito mundial são poucos os países que produzem anfíbios para fins comerciais, incluindo alguns países asiáticos (China, Taiwan), Estados Unidos e Brasil. A ranicultura data em nosso país desde a década de 30, com a importação de 300 casais de *Lithobates [Rana] catesbeianus* oriundos da América do Norte, porém somente a partir da década de 70 que a atividade se tornou mais popular e economicamente relevante devido aos incentivos governamentais. O Brasil foi o primeiro país a criar uma metodologia de criação em confinamento intensivo, sendo hoje um dos principais nomes da produção

(FAO, 2014). Atualmente no país a única espécie cultivada é a *L. catesbeianus*, popularmente conhecida como rã-touro. Sua escolha se deu por conta de sua boa adaptação às condições climáticas do país e de seus bons índices zootécnicos correlacionados a precocidade, prolificidade, alta taxa de reprodução e seu tamanho. Sua carne possui alto valor nutricional devido ao teor reduzido de gordura (3%) e o grande número de aminoácidos mesmo quando produzida em cativeiro (DIAS *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2013).

O adensamento de indivíduos na criação comercial é uma prática altamente usada visando aumentar o lucro e aproveitar ao máximo a correlação de espaço criatório x nº de indivíduos. Porém, tal prática facilita a dispersão de patógenos, criando-se assim um ambiente favorável para surtos patológicos devido ao aumento da densidade e a possibilidade de maior estresse que tende a suprimir o sistema imune (BRUNNER *et al.*, 2005; GREER *et al.*, 2008). Sendo a rã-touro um animal presente neste tipo de adensamento e a ranavirose uma doença altamente correlacionada a anfíbios e cuja transmissão é facilitada pelas condições criatórias, entender o risco de uma disseminação perante a espécie é fundamental. O objetivo desse trabalho foi compreender a susceptibilidade da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) frente à esta patologia, levando em conta taxas de infecção e sobrevivência em sua forma larval e adulta, assim como a evolução de um possível caso clínico e o aparecimento de sinais, através de infecção experimental.

O artigo “**Avaliação da sobrevivência de formas larvais e adultas de rã-touro Americana frente à infecção experimental por Frog Virus 3**” presente nesta dissertação na forma de “Capítulo I” pretende ser submetido a revista *Disease of Aquatic Organism*, conceito A2 pela CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, A.L.F. 2016 *Isolamento e caracterização de estirpe de Frog virus 3-símile detectada em rãs-touro gigante (Lithobates catesbeianus) no Estado de São Paulo*. São Paulo. 27f. (Dissertação de Mestrado. Pirassununga. Universidade de São Paulo). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde-15082016-141111/es>>. Acesso em: 4 de setembro 2017.
- ALFORD, R.A. 2011 Bleak future for amphibians. *Nature*, 480: 461-462.
- BRUNNER, J. L.; RICHARDS, K.; COLLINS, J. P. 2005 Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia*, 144: 399-406.
- BRUNNER, J.L.; STORFER, A.; GRAY, M.J.; HOVERMAN J.T. 2015 Ranavirus Ecology and evolution: from epidemiology to extinction. IN: GRAY, M.J.; CHINCHAR, V. G. *Ranaviruses*. Springer International Publishing. p. 71-104.
- CHINCHAR, V. G. 2002 Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology*, 147: 447-470.
- CHINCHAR, V.G.; KWANG, H.Y.; JANCOVICH, J.K. 2011 The molecular biology of Frog virus 3 and other Iridoviruses Infecting Cold-Blooded Vertebrates. *Viruses*, 3(10): 1959-1985.
- CHINCHAR, V.G.; WALTZEK, T.B. 2014 Ranavirus: Not Just for Frog. *PLOS Pathogens*, 10: 1-3.
- CHINCHAR, V.G.; WALTZEK, T.B.; SUBRAMANIAM, K. 2017 Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae: Their place in the virosphere. *Virology*, 511: 1–13.
- CLAYTOR, S.C.; SUBRAMANIAM, K.; LANDRAU-GIOVANNETTI, N.; CHINCHAR, V.G.; GRAY, M.J.; MILLER, D.L.; MAVIAN, C.; SALEMI, M.; WISELY, S.; WALTZEK, T.B. 2017 Ranavirus phylogenomics: Signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates. *Virology*, 511: 330–343.
- COLLINS, J.P. 2010 Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of the Aquatic Organisms*, 92: 93-99.
- CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D.; RUSSELL, P.; BENNETT, P.M. 2007 Experimental transmission of a ranavirus disease of common toads (*Bufo bufo*) to common frogs (*Rana temporaria*). *Epidemiology Infection*, 135: 1213–1216.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science*, 287: 443-449.
- DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 41: 1064–1071.
- DUFFUS, A.L.J.; WALTZEK, T.B.; STÖHR, A.C.; ALLENDER, M.C.; GOTESMAN, M.; WHITTINGTON, R.J.; HICK, P.; HINES, M.K.; MARSCHANG, R.E. 2015 Distribution and host range of ranaviruses. In: GRAY, M.J.; CHINCHAR, V.G. *Ranaviruses: Lethal pathogens of ectothermic vertebrates*. Springer. p 9-44.

- EATON, H.E.; RING, B.A.; BRUNETTI, C.R. 2010 The Genomic Diversity and Phylogenetic Relationship in the Family *Iridoviridae*. *Viruses*, 2(7): 1458-1475.
- EDF – Emergent Disease Foundation. Emergent disease. Disponível em <<http://emergentdisease.org/emergent-disease>> Acesso em Dezembro de 2017.
- ETEROVICK, P.C.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; BORGES-NOJOSA, D.M.; SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V.; SAZIMA, I. 2005 Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica*, 37(2): 166-179.
- FAO, 2014 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme (2014). Disponível em<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/e> Acesso em dezembro 2017.
- FERREIRA, C.M.; LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, J.G.; BUENO-GUIMARAES, H.M.; SOARES, S.R.C.; SALDIVA, P.H.N. 2004 Effects of Copper Oxchloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(3): 465-470.
- GRANOFF, A.; CAME, P.E.; BREEZE, D.C. 1966 Viruses and Renal Carcinoma of *Rana pipiens* I. The Isolation and Properties of Virus from Normal and Tumor Tissue. *Virology*, 29: 133-148.
- GRAY, M.J.; MILLER, D.L.; HOVERMAN, J.T. 2012 Reliability of non-lethal surveillance methods for detecting ranavirus infection. *Disease of Aquatic Organism*, 99:1–6.
- GRAYFER, L.; ANDINO, F.D.J.; CHEN, G.; CHINCHAR. G, V.; ROBERT. J. 2012 Immune evasion strategies of ranaviruses and innate immune responses to these emerging pathogens. *Viruses*, 4: 1075–1092.
- GREEN, D.E.; CONVERSE, K.A.; SCHRADER, A.K. 2002 Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. *Annals of the New York Academics of Sciences*, 969: 323–339.
- GREER, A.L.; COLLINS, J.P. 2007 Sensitivity of a diagnostic test for amphibian ranavirus varies with sampling protocol. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 525–532.
- GREER, A.L.; BRIGGS, C.J.; COLLINS, J.P. 2008 Testing a key assumption of host pathogen theory: Density and disease transmission. *Oikos*, 117: 1667–1673.
- HADDAD, C.F.B. 2008 Anfíbios: uma análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF. p. 287-320.
- HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; CURI, N.A.; FERREIRA, C.M.F.; & BACH, E.E. 2003 Detecção ao microscópio eletrônico de transmissão de partículas virais semelhantes ao grupo iridovírus em rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) criadas comercialmente. Primeira observação no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70: CD-R.
- HOVERMAN, J. T.; GRAY, M.J.; HAISLIP, N. A.; MILLER, D. L. 2011 Phylogeny, Life History, and Ecology Contribute to Differences in Amphibian Susceptibility to Ranaviruses. *EcoHealth*, 8(3): 301-319.

- IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza. IUCN Red List. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/search>> Acesso em Outubro de 2017.
- JANCOVICH, J.K.; BREMONT, M.; TOUCHMAN, J.W.; JACOBS, B.L. 2010. Evidence for multiple recent host species shifts among the ranaviruses (Family Iridoviridae). *Journal of Virology*, 84: 2636-2647.
- LIPS, K.R.; BREM, R.; REEVE, J.D.; ALFORD, R.A.; VOYLES, J.; CAREY, C.; LIVO, L.; PESSIER, A.P.; CLLINS, J. 2006 Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *PNAS*, 103: 3165-3170.
- MAZZONI, R.; MESQUITA, A.J. DE.; FLEURY, L.F.F.; BRITO, W.M.E.D DE.; NUNES, I.A.; ROBERT, J.; MORALES, H.; COELHO, A.S.G.; BARTHASSON, D.L.; GALLI, L.; CATROXO, M.H.B. 2009 Mass mortality associated with a Frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Disease of Aquatic Organism*, 86: 181–191.
- MCCALLUM, M.L. 2007 Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41(3): 483–491.
- MESQUITA, A.Q. 2014 *Síndrome vestibular em Lithobates catesbeianus associada à ranavírus*. Goiânia. 80f. (Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás). Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4012>>. Acessado em 6 de agosto de 2017.
- MILES, J.; WILLIAMS, J.; HAILEY, A. 2004 Frog farming. Investigation of biological and mechanical agents to increase the consumption of pelleted food by adult *Rana temporaria*. *Applied Herpetology*, 1: 271–286.
- MILLER, D.; GRAY, M.; STORFER, A. 2011 Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. *Viruses*, 3(2): 351–2373.
- MOREIRA, C.R.; HENRIQUES, M.B.; FERREIRA, C.M. 2013 Frog farms as proposed in agribusiness aquaculture: economic viability based in feed conversion. *Boletim do Instituto de Pesca*, 39: 389–399.
- NEVES, P.V.; CATROXO, M.H.; HIPOLITO, M.; OLIVEIRA, C.R.DE.; FERREIRA, C.M. 2016 Uso de anticorpos policlonais, microscopia eletrônica e histologia para detecção de partículas semelhantes ao iridovírus em rã-touro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 42: 523–531.
- OIE. The Organization for Animal Health 2017. Infection with Ranavirus. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf> Acesso Setembro de 2017.
- OLIVEIRA, R.C. 2009 O panorama da aquicultura no Brasil: A prática com foco na sustentabilidade. *Revista Intertox de toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 2(1): 71-89.
- OLIVEIRA, C.R. 2017 Rastreamento e Caracterização molecular de ranavírus em rã-touro proveniente da região centro-sul do Brasil. São Paulo. *In press*. (Dissertação de mestrado. Instituto de Pesca)
- PRICE, S.J.; GARNER, T.W.J.; NICHOLS, R.A.; BALLOUX, F.; AYRES, C.; ALBA, A.M.C.; BOSCH, J. 2014 Collapse of Amphibian Communities due to an Introduced *Ranavirus*. *Current Biology*, 24: 2586-2591.
- ROBERT, J.; CHINCHAR, V.G. 2012 Ranaviruses: An emergent threat to ectothermic vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 36: 259-261.

- SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY, M.; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. 2010 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13:53-61.
- STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L.; WALLER, R.W. 2004 Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.
- TEACHER, A.G.F.; CUNNINGHAM, A.A.; GARNER, T.W.J. 2010 Assessing the long-term impact of *Ranavirus* infection in wild common frog populations. *Animal Conservation*, 13: 514-522.
- TOLEDO, L. F. 2009 Anfíbios como Bioindicadores. In: NEUMANN-LEITÃO, S.; EL-DIER, S. (Orgs.) *Bioindicadores da Qualidade Ambiental*. Recife: Instituto Brasileiro Pró- Cidadania. P. 196-208.
- VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. 2010 Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, 24(68): 161-172.
- WAKE, D.B.; VREDENBURG, V.T. 2008 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*, 105(1): 11466-11473.
- WHEELWRIGHT, N.T.; GRAY, M.J.; HILL, R.D.; MILLER, D.L. 2014 Sudden mass die-off of a large population of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles in Maine, USA, likely due to ranavirus. *Herpetology Review*, 45: 240–242.
- WILLIAMS, T.; BARBOSA-SOLOMIEU, V.; CHINCHAR, V. G. 2005 A decade of advances in iridovirus research. *Advances in Virus Research*, 65:173-248.
- YUTIN, N.; WOLF, Y.I.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. 2009 Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virology Journal*, 6: 223–236.

CAPÍTULO 1

Susceptibilidade de formas larvais e adultas de rã-touro americana frente à infecção experimental por Frog virus 3

Resumo: Um alarmante número de notificações globais sobre surtos de mortalidade e declínio de espécies de anfíbios tem sido publicado nas últimas décadas, sendo inúmeros agentes ambientais, antrópicos e biológicos apontados como possíveis causas. As doenças emergentes se destacam entre eles, sendo a ranavirose a segunda relatada como a de maior importância. A ranavirose, em especial a espécie *Frog virus 3* (FV3), possui altas taxas de infectividade, distribuição global e capacidade de afetar outras classes de animais ectotérmicos, como peixes e répteis. Uma problemática desta patologia é a ausência de sinais clínicos antes de gerar um óbito massivo. Com o objetivo de entender melhor a susceptibilidade dos anuros perante essa patologia, o presente estudo analisou as taxas de sobrevivência da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em sua forma larval e adulta, frente a três dosagens virais: T1: $1,9 \times 10^1$ p.f.u./0,05mL; T2: $1,9 \times 10^3$ p.f.u./0,05mL e T3: $3,1 \times 10^5$ p.f.u./0,05mL. Através de PCR constatamos baixa taxa de infecção dos animais tanto em sua forma larval quanto adulta. Para explicar nossos resultados levantamos as seguintes hipóteses: 1) A quantidade de inóculo aplicado nas rãs não foi suficiente para provocar infecção; 2) Para a manifestação dos sinais clínicos da ranavirose nesta espécie existe a necessidade de um co-fator; 3) Os animais foram infectados com FV3, mas se recuperaram ao longo do período experimental e, 4) O inóculo utilizado tem baixa virulência. Discutimos também, a susceptibilidade da espécie *L. catesbeianus* quando infectada por FV3 e a presença de sinais clínicos ligado a ranavirose.

Palavra-chave: Ranavírus, Anuros, FV3, susceptibilidade, *Rana catesbeiana*

Evaluation of the survival of larval and adult forms of American bullfrog against the experimental infection by Frog virus 3

Abstract: An alarming number of global reports on mortality outbreaks and declines in amphibian species has been published in the last decades, with innumerable environmental, anthropogenic and biological agents being identified as possible causes. Emerging diseases stand out among them, and ranavirose is reported as the second most important. Ranavirose, especially Frog virus 3 (FV3), has high infectivity, global distribution and ability to affect other classes of ectothermal animals, such as fishes and reptiles. A problem with this pathology is the absence of clinical signs before generating a massive death. In order to better understand the susceptibility of an amphibian group to this pathology, the present study analyzed the development of the disease and survival rates of the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in its larval and adult form, compared to three viral doses: T1: $1,9 \times 10^1$ p.f.u./0,05mL; T2: $1,9 \times 10^3$ p.f.u./0,05mL e T3: $3,1 \times 10^5$ p.f.u./0,05mL. PCR showed a low rate of infection in both larval and adult animals. To explain our results, we hypothesized the following: 1) The amount of inoculum applied in frogs was not enough to cause infection; 2) For the manifestation of clinical signs of ranavirose in this species there is a need for a cofactor; 3) The animals were infected with FV3, but recovered over the experimental period and, 4) The inoculum used has low virulence. We also discuss the susceptibility of *L. catesbeianus* when infected with FV3 and the presence of clinical signs associated with ranavirosis.

Key-words: Ranavirus, Anurans, FV3, susceptibility, *Rana castesbeiana*

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreram alarmantes aumentos de notificações sobre o declínio da diversidade de anfíbios a nível global. As possíveis causas estão ligadas a poluição, perda e fragmentação de habitats naturais, mudanças climáticas, aumento dos raios UV-B, inserção de predadores e competidores exóticos, urbanização e o aparecimento de doenças emergentes (Berger et al. 1999, Hamer & McDonnell 2008, Chinchar et al. 2011, Earl et al. 2016, Chinchar et al. 2017). Dois patógenos foram majoritariamente observados como agentes de surtos emergentes, o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e os vírus do gênero ranavírus. Ambas as doenças caudas por estes agentes possuem uma ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica de grande espectro (Daszak et al. 2000, Miller et al. 2011, Duffus et al. 2015, Soto-Azat et al. 2016).

O ranavírus é atualmente considerado o segundo agente infeccioso mais comum para anfíbios, tanto de vida livre como cativos (Grayfer et al. 2012). O vírus faz parte da família *Iridoviridae*, tendo como características serem vírus grandes (120-300nm), icosaédricos e DNA de fita dupla. Sua taxa de infectividade é alta e costuma acometer tanto juvenis como adultos. A família *Iridoviridae* é composta por cinco gêneros (*Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus* e *Iridovirus*), porém apenas o gênero *Ranavirus*, em especial a espécie *Frog virus 3* (FV3), possui a plasticidade de infectar anfíbios, peixes e répteis (Chinchar et al. 2011, Lesbarrères et al. 2012, Robert & Jancovich 2016, Claytor et al. 2017). Visto o risco de disseminação e a ausência de metodologias de controle e prevenção, a doença se tornou de

notificação obrigatória pelos países membros da Organização Mundial de Saúde Animal desde 2012 (OIE, 2017).

A rã-touro (*Lithobates castebeianus*) classificada anteriormente como *Rana castebeiana* (Frost et al. 2006) é um animal nativo da América do Norte. Por conta de características de interesse econômico como tamanho, crescimento rápido, prolificidade e qualidade nutricional de sua carne o animal passou a ser criado de forma intensiva para consumo humano, sendo o Brasil um país pioneiro neste tipo de criação cujas fazendas são datadas desde a década de 30 (Dias et al. 2010, Schloegel et al. 2010, Moreira et al. 2013). Atualmente, países como Brasil, China, Taiwan e México trabalham com metodologias de criação em confinamento intensivo, o que apesar de ser produtivamente mais rentável acaba por facilitar o afloramento de doenças pelas altas densidades (FAO 2017, Freitas et al. 2017, Oliveira 2017).

Estudos anteriores já demonstraram a presença da cepa de FV3 circulando por ranários de diferentes regiões do Brasil (Mazzoni et al. 2009, Alencar 2016, Neves et al. 2016, Oliveira 2017). Porém, reconhecer infecções por ranavírus por observação visual não é fácil, visto que muitas vezes o mesmo sinal clínico, é característico de vários processos patológicos ou o único sinal observado é a mortalidade dos animais (Haislip et al. 2011, Miller et al. 2011). A sintomatologia clínica, quando aparente, se manifesta na forma de infecções sistêmicas, apresentando petéquias e ulcerações pela pele e membros, ascite, emagrecimento, hemorragias e letargia. As lesões internas são encontradas principalmente no baço, fígado, rim e revestimento gastrointestinal (Hoverman et al. 2010)

Há uma incipiência de estudos não só sobre a presença do vírus na América do Sul, mas também de sua prevalência, possibilidade de variação de

estirpes e efeitos deletérios sob cultivos de organismos aquáticos, em específico em criação de rãs. Com o objetivo de entender melhor a susceptibilidade destes animais a ranavirose, o presente estudo analisou as taxas de sobrevivência da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em sua forma larval e adulta, assim como a evolução de um possível caso clínico e o aparecimento de sinais, através de infecção experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos exemplares

Os animais foram obtidos de uma propriedade comercial localizada no município de Pindamonhangaba (22° 50' 31" S/45° 36' 31" O), no estado de São Paulo/Brasil, sem histórico de doença e previamente testados para garantir sua sanidade. Os girinos foram coletados entre os estágios 31 a 36 de Gosner (1960) com peso médio de 4,7g \pm 1,2g (n^o=144) e rãs adultas com peso médio de 60g \pm 10g (n^o=112). A aclimação ocorreu em laboratório com fotoperíodo controlado (12:12) e com duração de uma semana para ambos os estágios. A alimentação foi realizada uma vez ao dia com 3% do peso vivo do grupo, utilizando a mesma ração usada no ranário (Laguna® 32% Proteína Bruta, 5% Extrato Etéreo, 10% Fibra Bruta, 2,5% Cálcio, 1% Fósforo, 14% Cinzas, 21% Carboidratos, Vitamina C 300mg, Energia Bruta 4180 Kcal/kg), tanto para girinos quanto para as rãs adultas ajustando-se a proporção de biomassa para cada estágio.

Infecção e Rotina Experimental

Para a infecção experimental utilizamos alíquotas de um isolado proveniente de um surto em fazenda comercial ocorrido em 2012 em São

Paulo, região sudeste do Brasil (Alencar 2016). O processo de isolamento viral ocorreu em células BF-2 (bluegillfry ATCC® CCL-91®), mantidas e subcultivadas em MEM (minimum essential medium - Gibco®, LifeTechnologies, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de LGlutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100µg/mL estreptomicina (PenStrep - Gibco®, LifeTechnologies, EUA) sob incubação a 25° C e atmosfera com 5% de CO₂. Para a manutenção viral foram realizadas passagens subsequentes, no presente estudo utilizado-se a sexta passagem de células, possuindo um total de 10^{6,8} p.f.u./mL.

A inoculação ocorreu por via oral, tanto para adultos (n^o=112) como para girinos (n^o=144), ministrando 50µL de meio de manutenção MEM com diluições de vírus diferenciadas. Por ausência de estudos prévios para a espécie trabalhada, o volume ministrado foi baseado em outros experimentos realizados (Majji et al. 2006, Forzán et al. 2015). Os tratamentos se dividiram em Controle (apenas MEM), Tratamento 1 (T1: 1,9 x 10¹ p.f.u./mL), Tratamento 2 (T2: 1,9 x 10³ p.f.u./mL) e Tratamento 3 (T3: 3,1 x 10⁵ p.f.u./mL), havendo quatro réplicas por tratamento. A rotina de experimentação teve a duração de 21 dias.

Todo o protocolo de inoculação, limpeza e análises seguiu a rotina da menor presença viral para a maior, para evitar o risco de uma contaminação cruzada. Os girinos foram mantidos em aquários de 13 litros e os animais adultos em gaiolas modificadas possuindo um poço de 4 litros d'água (parte funda) e uma parte rasa com 45 cm. Duas amostragens foram realizadas visando entender uma possível evolução da doença e seus efeitos, coletando os órgãos internos fígado, baço e rim. A primeira amostragem com 14 dias p.i. (pós-infecção) sacrificando dois animais aleatoriamente de cada réplica

(n^o=32). A segunda amostragem ocorreu no 21^o dia p.i., sacrificando novamente mais dois animais por réplica totalizando 64 amostras coletadas por grupo experimental (Girino ou Adulto).

Para a eutanásia utilizou-se protocolos a base de Eugenol (15mL/L) para girinos e Cloridrato de Benzocaína (4g/L) para rãs, insensibilizadas previamente com gelo. Para averiguar a efetividade da infecção coletamos os órgãos fígado, baço e rim seguindo protocolo sugerido pela OIE (2017). Entre as mudanças de tratamentos todo o material utilizado era esterilizado com álcool 70^o e Virkon®, seguido por uma limpeza nas bancadas e troca de luvas. Todos os procedimentos citados foram previamente submetidos e aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Pesca de São Paulo/Brasil (N^o04/2016).

Análises

Realizou-se inicialmente as análises moleculares. Para a extração de DNA foi realizado um pool dos órgãos coletados seguindo o protocolo sugerido pelo kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Brasil®), modificado por Oliveira (2017). Para as reações utilizou-se o kit GoTaq Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA®) associado a dois pares de primers sugeridos pela OIE (2017). Os fragmentos se baseiam no gene conservado MCP (Major Capsid Protein) e são denominados MCP1 (321 pb) (M151 - 5'-AACCCGGCTTTCGGGCAGCA-3' e M152 - 3'-CGGGGCGGGGTTGATGAGAT-5'), e MCP2 (625pb) (M153 - 5'-ATGACCGTCGCCCTCATCAC-3' e M154 - 3' CCATCGAGCCGTTTCATGATG-5'). As análises por digestão enzimática também seguira as orientações detalhadas pela OIE (2017).

Utilizou-se a técnica de PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR) para determinar a carga viral contida nos animais infectados, comparando as

diferentes dosagens ministradas em cada tratamento. Por meio do sistema TaqMan-MGB (Invitrogen®) e dos primers padronizados por Allender et al. (2013) cujo alvo se dá na proteína do *Major Capsídeo* (5'-AACGCCGACCGAAAAGT-3'), (3'-GCTGCCAAGATGTCGGGTAA-5'), e a sonda (CCGGCTTTCGGGC). Utilizou-se 12,5µL de TaqMan Platinum PCR Supermix-UDG with ROX 2X (Invitrogen®, EUA), 1,25µL TaqMan probe, 2,5µL de diluição de *pool* de tecidos e água para uma concentração final de 25µL. Os parâmetros de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min. As curvas padrões foram geradas utilizando os valores limiares de diluições utilizando o controle positivo do plasmídeo.

As amostras confirmadas como positivas foram sequenciadas para garantir a veracidade do resultado. Utilizou-se os produtos de PCR purificados com PEG 6000 e sequenciados pelo método de Sanger. Os resultados obtidos foram comparados com as sequências do gênero depositadas no GenBank utilizando o programa Bioedit.

A histotécnica utilizada seguiu o protocolo padronizado por Michalany (1990) na qual a fixação em formaldeído foi substituída pelo processo de desidratação em série crescente de etanol. A emblocagem foi feita em parafina seguida de cortes de 5 µm de espessura com o auxílio de micrótomo HRAZ M 55 Zeiss®. Por fim uma coloração de Hematoxilina/Eosina. A observação e registro das imagens foram feitas sob microscópio de luz CARL-ZeissAxioScope. a1® e software de captura de imagem ZEN®.

RESULTADOS

Durante o período de aclimação dos girinos não ocorreu nenhuma mortalidade, sendo o processo de inoculação realizado sem intercorrências. Das três doses testadas para estes animais nenhuma se mostrou letal, havendo baixa mortalidade dos espécimes inoculados. Entretanto, constatamos algumas sintomatologias clínicas que foram divididas em **gerais**, presente em todos os tratamentos exceto no grupo controle, e **específicos**, ligadas a indivíduos únicos. Os sintomas gerais consistiram em baixa movimentação, perda de flutuabilidade, diminuição no apetite e lordose na região caudal. A presença de petéquias, inchaço abdominal, emagrecimento e a descamação epitelial, foi observada de forma específica em apenas três espécimes (Fig. 1). Ao final dos 21 dias de infecção 75% dos animais já haviam entrado no processo de metamorfose, sendo que grande parte já havia absorvido parcialmente ou totalmente a cauda. Não foi possível estimar tempo médio letal da infecção após a inoculação, visto sua alta porcentagem de sobrevivência.

Nas análises de PCR convencional confirmamos a presença do vírus em dois animais do Tratamento 3 (12,5%). O primeiro sendo denominado g1, na coleta do 14^o dia p.i e o segundo denominado g17, na coleta do 21^o dia p.i. As amostras positivas tiveram sua confirmação por meio de PCR em Tempo-Real, havendo concentração de $1,46 \times 10^{-5}$ ng de DNA viral para 15ng de DNA Total (g1) e $8,87 \times 10^{-5}$ ng de DNA viral para 15ng de DNA total (g17).

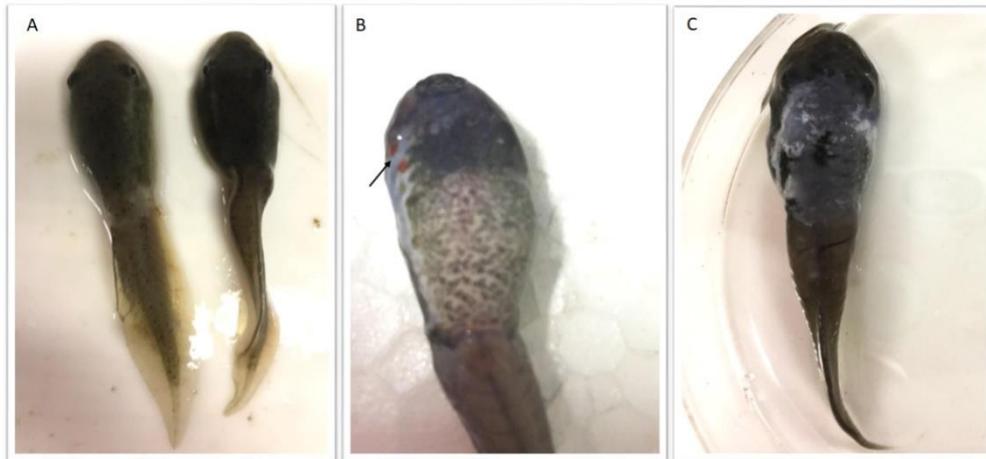


Figura 1: Sinais apresentadas por girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) infectados experimentalmente com ranavírus (FV3). (A) Comparação entre um indivíduo normal e alterado com sinais de lordose caudal ambos presentes no Tratamento 1 ($10^{2,6}$ p.f.u./mL). (B) Petéquias (seta) presente na região lateral, assim como inchaço na região ventral do espécime presente no Tratamento 2 ($10^{4,6}$ p.f.u./mL). (C) Perda da coloração normal da pele tanto na região dorsal quanto ventral, assim como um emagrecimento do espécime do Tratamento 3 ($10^{6,8}$ p.f.u./mL).

Não foram observadas alterações morfológicas nos órgãos coletados (baço, fígado e rim) ou qualquer outro sinal que pudesse ser de interesse. As análises histológicas evidenciaram a presença de melanomacrófagos no fígado constatada em todos os tratamentos, assim como uma rarefação dos hepatócitos em grande escala, incluindo os do grupo controle. Atribuímos isto à deficiência mineral-protéica (Seixas et al. 2017).

Nos girinos positivos à PCR, constatamos que as glândulas renais apresentavam danos em sua organização celular com ocorrência de hipoplasia dos glomérulos, aumento do espaço da Cápsula de Bowman, tubulonefrose, áreas de calcificação distrófica e presença de material hialino dentro dos túbulos. Notamos também a presença significativa de eosinófilos no parênquima renal (Fig.2). Por fim, observamos sinais de hepatite monolinfocitária e eosinofílica e corpúsculos de inclusão na região citoplasmática das células hepáticas (Fig.3).

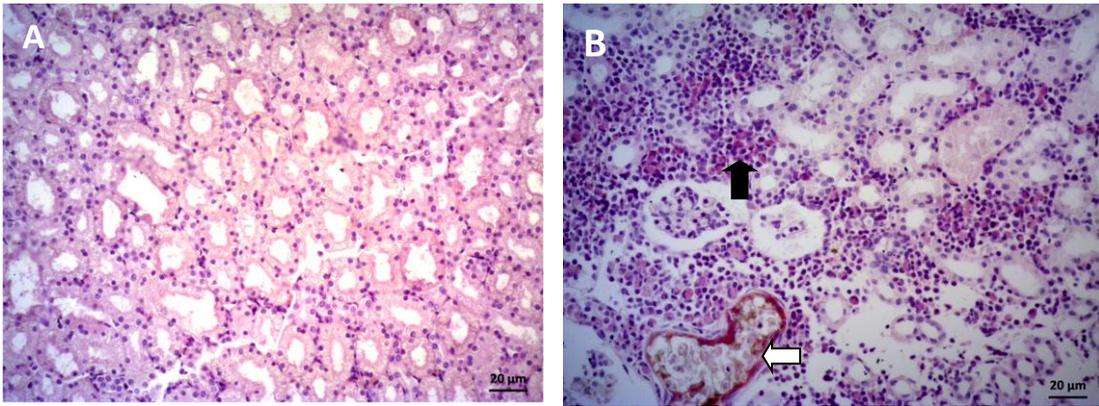


Figura 2: Fotomicrografia comparativa de rins de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). (A) Grupo controle sem a presença viral, aumento 200x. (B) Alteração da arquitetura do rim com aumento do espaço da cápsula de Bowman e hipoplasia glomerular, área de calcificação distrófica e (seta branca) aglomerados de eosinófilos (seta branca). Aumento 200x.

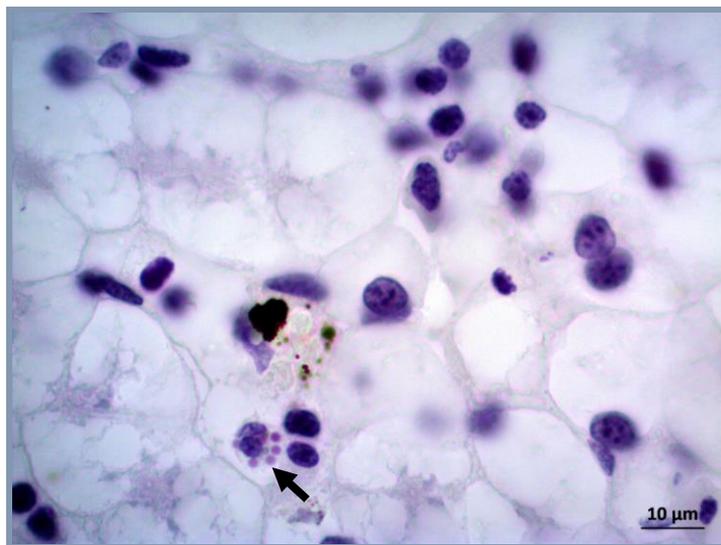


Figura 3: Fotomicrografia de células hepáticas de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) com a presença de corpúsculos de inclusão eosinofílicos na região citoplasmática de hepatócitos (seta preta), Aumento de 1000x. Coloração em H&E.

Na aclimação dos animais adultos ocorreram algumas mortalidades nos primeiros dias, o que nos levou não só testar a presença de FV3 (havendo resultado negativo) mas também de bacterias, a qual reportou apenas a presença de *Streptococcus sp.*, nas amostras analisadas. Quanto à infecção, observamos o

mesmo padrão que ocorreu nos animais em sua forma larval, onde nenhuma dose se mostrou letal, com mortalidade de 6,25% dos animais em experimentação. Diferente dos girinos, não ocorreu sintomas gerais. A Sintomatologia observada foi associada a indivíduos específicos: Apatia, falta de apetite, edema, vermelhidão na parte ventral, perda de postura, perda de capacidade natatória e torção de cabeça (Fig.4). Os sinais foi observado a partir do oitavo dia p.i., sendo a perda de postura e alteração da posição da cabeça tendo avanços rápidos, com nítido agravamento de um dia ao outro. Embora infectados, grande parte dos animais continuou a se alimentar de forma constante e observamos sinais de emagrecimento apenas em indivíduos específicos, normalmente associados à perda de postura, capacidade natatória ou torção de cabeça.



Figura 4: Adultos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) infectados experimentalmente por ranavírus (FV3). (A) Comparação entre indivíduos do mesmo tratamento (T2 – $1,9 \times 10^3$ p.f.u./mL) demonstrando emagrecimento. (B) Demonstra as torções de cabeça observada, assim como a alteração da postura e capacidade natatória dos animais, o que gerava uma natação em círculos e perda da capacidade de salto.

Por outro lado as análises de PCR convencional obtivemos taxa de infectividade de apenas 1,56%, sendo um indivíduo do tratamento 1 (Fig. 5). Nas análises de PCR em tempo real, a amostra se repetiu como positiva, tendo uma concentração de $3,36 \times 10^{-5}$ de DNA viral para 15ng de DNA total.

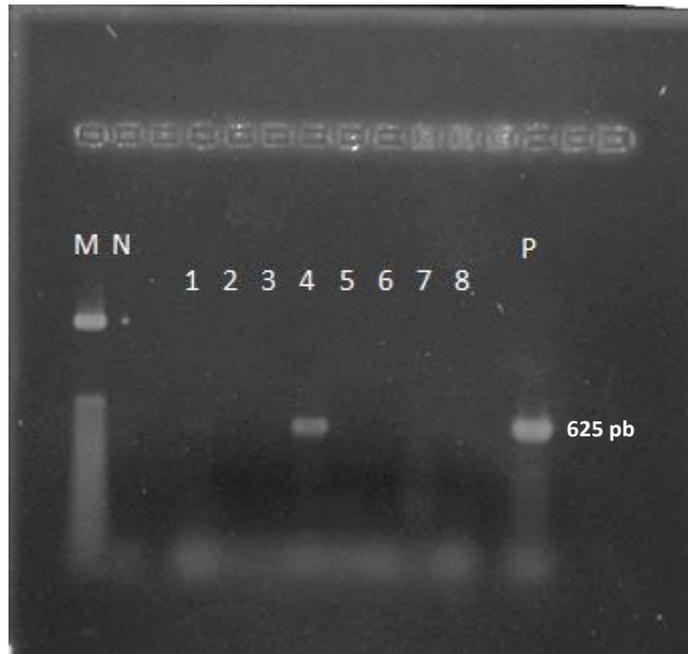


Figura 5: Fotografia de gel de agarose a 1,0% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados da coleta feita ao 14º no tratamento 1 de adultos de *Lithobates catesbeianus* infectadas por FV3. Dos oito espécimes testados, apenas o indivíduo 4 se mostrou positivo. Na fotografia consta o Marcador de Peso Molecular (M), controle negativo (N), amostras testadas (1-8) e o controle positivo (P)

As alterações histológicas observadas foram similares aos dos girinos, havendo uma hepatite monolinfocitária com uma maior presença de melanomacrófagos na região hepática incluindo o controle. Rarefação dos hepatócitos também pode ser observada, possivelmente correlacionado a qualidade nutricional do alimento oferecido aos animais que gerou uma deficiência mineral-proteíca. Quando em vida livre a alimentação da rã-touro se baseia em invertebrados e pequenos vertebrados, no ambiente de produção estes animais são alimentados com rações com altas taxas de proteína bruta (cerca de 40% PB). Estudos sugerem que este tipo de dieta tende a gerar danos teciduais e comprometer a performance animal (Seixas Filho et al. 2017).

No adulto PCR positivo o parênquima renal apresentou presença menor de eosinófilos ao compará-lo com os dos girinos, porém mantendo as alterações nos glomérulos, presença de material hialino dentro dos túbulos, alterações nas paredes da cápsula de Bowman e áreas de tubulonefrose (Fig. 6).

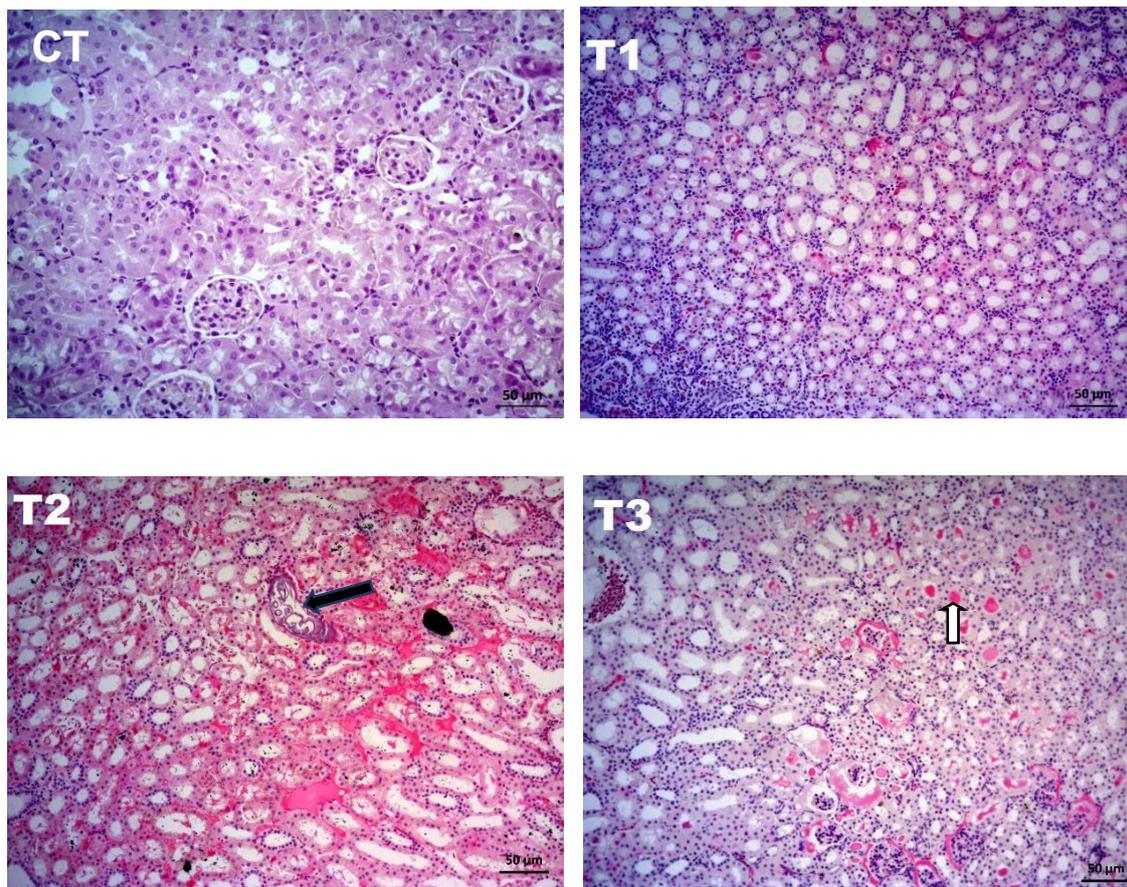


Figura 6: Fotomicrografia comparativa de rim de adultos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) infectadas experimentalmente por ranavírus (FV3) e seu controle (CT). A imagem compara os quatro tratamentos, notando uma alteração da arquitetura celular conforme o aumento da concentração viral. T2 ($1,9 \times 10^3$ p.f.u./mL) apresenta zona de calcificação (seta preta), enquanto T3 ($3,1 \times 10^5$ p.f.u./mL) apresenta uma grande presença de material hialino (seta branca) dentro dos glomérulos. Aumento de 200x. Coloração em H&E.

A tabela 1 comparada todos os resultados obtidos, porém não foi possível criar correlações da concentração viral ministrada x concentração viral detectada em animais infectados, visto o baixo número de positivos. Assim como a concentração necessária para que o surto se instalasse, visto que há a necessidade de se pensar em dosagens que possam estar presentes em cenários reais, seja em vida livre ou ambiente de produção, e não apenas em reproduções laboratoriais. O sequenciamento demonstrou com 99,9% de veracidade que as amostras pertenciam ao gênero ranavírus e a cepa Frog Virus 3.

Tabela 1: Correlação de todos os resultados obtidos no processo de infecção experimental em *L. catebeianus*.

Espécime	Tratamento	Sinais	Histologia	PCR	qPCR (ng DNA viral / 15 ng DNA total)
Girino 1	3	Falta de apetite, morbidade e emagrecimento	Hepatite monolinfocitária no fígado. Glândulas renais com danos em sua organização celular. Hipoplasia dos glomérulos, aumento do espaço da Cápsula de Bowman, tubulonefrose, áreas de calcificação distrófica e presença de material hialino dentro dos túbulos.	Positivo	1,46 x 10 ⁻⁵
Girino 17	3	Presença de petéquias, morbidade, apatia inchaço abdominal, descamação epitelial.	Presença significativa de eosinófilos no parênquima renal. Presença de possíveis corpúsculos de inclusão.	Positivo	8,87 x 10 ⁻⁵
Rã 1	1	Ausência de sinais clínicos	Hepatite monolinfocitário no fígado. Alterações nos glomérulos, presença de material hialino dentro dos túbulos, alterações nas paredes da cápsula de Bowman e áreas de tubulonefrose	Positivo	3,36 x 10 ⁻⁵

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar as taxas de sobrevivência da rã-touro frente à infecção experimental por FV3. Espécies como *Xenopus laevis* e *Rana sylvaticus* são reportadas como modelos experimentais devido sua maior susceptibilidade a ranavirose (Robert et al. 2007, Grayfer et al. 2012, Earl & Gray 2014, Forzán et al. 2017), entretanto, a espécie *Lithobates catesbeianus* merece sua devida atenção visto o perfil diferenciado, onde está inserida em ambientes de produção, espalhada geograficamente em diversas comunidades como animal exótico e sujeita a um constante processo de troca, sejam como matrizes reprodutivas ou como pet. Tanto o ambiente natural como em

ambiente de produção comercial relataram grandes surtos de mortalidade desta espécie (Majji et al. 2006, Miller et al. 2007, Une et al. 2009, Mazzoni et al. 2009, Landsberg et al. 2013, Martel et al. 2013, Oliveira 2017), sendo que se acredita que em cativeiro a virulência pode ser potencializada (Majji et al. 2006, Hoverman et al. 2011, Duffus et al. 2015).

A grande maioria dos relatos de surtos causados pelo FV3 indica maior suscetibilidade das formas larvais e juvenis (*i.e.* girinos e pré-metamorfose) (Galli et al. 2006, Miller et al. 2011, Warne et al. 2011, Forzán & Wood 2013, De Jesús Andino et al. 2016). É plausível propor que tal susceptibilidade possa estar ligada diretamente a dois pontos: o primeiro relacionado ao gasto energético, estresse e alterações hormonais devido a metamorfose, em especial o aumento dos corticosteroides que podem gerar uma supressão do sistema imune (Denver et al. 2002, Gervasi & Foufopoulos 2008). O segundo ligado ao sistema imune dos anfíbios (Rollins-Smith 1998). As formas juvenis possuem menor receptibilidade e mecanismos de reconhecimento em seu sistema imune, além de deficiência na expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) até o processo de metamorfose, tendo como consequência uma resposta de anticorpos menos diversa que os adultos (Pasquier 2001, Morales et al. 2010, Rollins-Smith 2017). Já adultos possuem uma resposta imune mais competente por possuírem o sistema imune inato (macrófagos e neutrófilos) e adaptativo (células CD8 T e anticorpos) (Chinchar et al. 2004, Morales & Robert 2007, Warne et al. 2011).

Em nosso estudo não observamos diferenças entre as taxas de infecção de girinos e adultos de rã-touro, confirmamos poucos casos de animais infectados pelo FV3 e, reportamos alta taxa de sobrevivência ao longo do

experimento de infecção experimental. Consequentemente, não conseguimos avaliar com a amplitude desejada a evolução de um possível caso clínico, mas constatamos a presença de alguns sinais que são associados à ranavirose por vários autores (Cunningham et al. 1996, Mazzoni et al. 2009). Chen & Robert (2011) recomendam a observação atenta dos sinais clínicos da ranavirose, que podem ou não estar presentes durante a infecção, assim como nem sempre levar o animal a óbito, sendo apenas “transitórios”. Alguns autores (Majji et al. 2006, Miller et al. 2009, Forzán et al. 2017) sugerem uma classificação dos sinais clínicos dessa doença dividindo-os em “brandos” (não letais) e “agravantes” (que levam a óbito). No presente trabalho, os sinais clínicos “brandos”, como letargia, diminuição de apetite e alterações na flutuabilidade puderam ser observados em grande parte dos tratamentos do estudo. Sinais “agravantes” como eritemas, hemorragias, petéquias e edemas, foram observados apenas em alguns indivíduos. Entretanto, considerando o baixo número de animais infectados aos 21 dias p.i., podemos afirmar que nenhum destes sinais clínicos pode ser associado exclusivamente a ranavirose, sendo comum a várias patologias de anfíbios como afirma Hipólito (2004).

Para explicar nossos resultados levantamos as seguintes hipóteses:

1) *A quantidade de inóculo de FV3 aplicado nas rãs não foi suficiente para provocar a doença.* Como dito anteriormente, por ausência de estudos prévios de infecção experimental pelo FV3 em *L. catesbeianus*, que pudessem nos orientar sobre a quantidade de inóculo a ser administrado aos animais, a dose ministrada foi baseado em outros experimentos realizados por Majji et al. (2006) e Forzán et al. (2015). Ao iniciarmos o presente estudo partimos da premissa que a quantidade inoculada seria suficiente para provocar a doença.

Mesmo sabendo que as rãs-touro são acometidas por ranavirose como reportado por Galli et al. (2006), Mazzoni et al. (2009), Alencar (2016), Neves et al. (2016) e Oliveira (2017), e que a virulência deste vírus é acentuada em cativeiro (Chinchar & Waltzek 2014, Claytor et al. 2017), a quantidade administrada deve ser espécie-específica. Cabe destacar também que populações de uma mesma espécie, respondem de forma diferente a agentes agressores. O ideal seria termos populações “Health Free” para condução de testes in vivo, mas esta não é uma realidade para *L. catesbeianus* e a maior parte dos anfíbios.

2) *Para a manifestação dos sinais clínicos da ranavirose nesta espécie existe a necessidade de um co-fator.* Há de se lembrar que a cepa viral não é o único ponto para que um processo infectante se inicie. A virulência da ranavirose, assim como outras doenças, está ligada a uma diversidade de fatores que incluem causas ambientais, agentes estressores, dose, temperatura, fatores intrínsecos, histórico do hospedeiro e susceptibilidade da espécie (Brunner et al. 2005, Echaubard et al. 2010, Altizer et al. 2013, Brand et al. 2016, Oliveira 2017). Além de interações entre os estágios fisiológico, imunológico e de desenvolvimento que podem influenciar a sensibilidade dos anfíbios as doenças (Hoverman et al. 2011, Warne et al. 2011, Blaustein et al. 2012, Echaubard et al. 2014, Kirschamn et al. 2018). O presente estudo trabalhou com ambientes controlados, onde se tentou minimizar parte destes fatores externos. As temperaturas da água não apresentaram grandes variações e foram adotadas ações visando minimizar o estresse animal (Teixeira et al. 2015), como ambientes silenciosos, densidade adequada e a manipulação mínima necessária. Echaubard et al. (2014) comenta que em

sistemas que excluem as alterações ambientais o ponto de análise se torna o hospedeiro e seu genótipo viral.

3) *Os animais foram infectados com FV3, mas se recuperaram ao longo do período experimental.* Sabe-se que um animal pode conviver de forma normal com um agente patogênico desde que o mesmo não se replique ao ponto de ultrapassar um limiar, se tornando patogênico por sua alta dosagem (*i.e* quantidade). O perfeito estado do vírus, assim como as barreiras do hospedeiro podem controlar esse limiar determinando o aparecimento de uma doença sintomática ou assintomática (Miller et al. 2009, Lancaster & Pfeiffer 2012, Brunner et al. 2017). A manifestação assintomática e sua persistência silenciosa é uma questão problemática, visto que torna o hospedeiro uma possível fonte disseminadora (Miller et al. 2011, Andino et al. 2016). Ariel et al. (2009) afirma que a expressão máxima da virulência do FV3 acontece aos 8 dias. Assim, de acordo com esta premissa e levando em consideração a baixa sensibilidade da rã-touro ao FV3 e as condições ideais de bem-estar animal em que foram conduzidos os experimentos é possível que a maior parte deles tenham sido infectada, mas tenha conseguido se recuperar impedindo o aparecimento da doença.

4) *O inoculo utilizado tem baixa virulência.* Temos que considerar a dosagem e virulência da linhagem utilizada, sendo este o ponto chave para os surtos. Neste trabalho foi utilizada a sexta passagem em células de um isolado de FV3 proveniente de um ranário da região sudeste do Brasil. A atenuação da virulência por conta de passagens múltiplas em cultivo celular é um fato que foi observado em diversos estudos (Badgett et al. 2002, Day & Proulx 2004, Flint et al. 2004), sendo que as repetições podem desencadear mutações ou

mecanismos que diminuem a virulência, como uma limitação da eficiência de propagação no hospedeiro; reduções da taxa de replicação *in vivo*; alterações nas ligações e propriedades que possibilitam a penetração das membranas do hospedeiro, além de possíveis deleções em genes virais (Lee & Lobigs 2002, Brunner et al. 2005, Majji et al. 2006). Estudos já demonstram que muito da expansão do vírus para novas regiões se deu pela importação e exportação de animais (Schloegel et al. 2009, Kolby et al. 2014). O Brasil possui uma rica diversidade de anfíbios espalhados por seus diversos ecossistemas (Vences & Köhler 2008, Sasso et al. 2017), porém há escassos reportes de surtos de ranavírus pelo país, sendo todos ligados a espécie de cultivo comercial *L. castebeianus* (Galli et al. 2006, Mazzoni et al. 2009, Alencar 2016, Neves et al. 2016, Oliveira 2017) e, sem nenhum registro até o presente momento de espécies nativas ou de vida livre. Tal fato pode se dar pela incipiência de estudos ou por outro motivo, como uma variação genotípica circulante no país, como o que ocorreu com o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Schloegel et al. 2012). Estudos demonstraram a presença de uma diversidade de linhagens que circulam pelo país, Bd-Brazil e Bd-GLP, ocorrendo variação em sua virulência e uma adaptação por parte das espécies nativas para uma destas linhagens (Becker et al. 2017, Carvalho et al. 2017). Nesta linha de raciocínio hipotetizamos que isto pode estar acontecendo com o clado de FV3 que circula no país (Oliveira, 2017), com a circulação de estirpes de distintas virulências.

Por fim, concluímos que existe uma grande gama de fatores que podem influenciar a forma e intensidade na qual a ranavirose se manifesta, sendo a susceptibilidade a nível de espécie apenas uma destas partes. A rã-touro

aparenta ter baixa susceptibilidade ao FV3 necessitando talvez de linhagens mais virulentas, altas cargas virais ou de fatores estressantes que quebrem sua homeostase para que a doença se manifeste.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido ao projeto que deu origem a este estudo: Processo 2015/24590-7.

BIBLIOGRAFIA

- Alencar ALF (2016) Isolamento e caracterização de estirpe de Frog virus 3-símile detectada em rãs-touro gigante (*Lithobates catesbeianus*) no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Pirassununga. Universidade de São Paulo. 27p.
- Altizer S, Ostfeld RS, Johnson PTJ, Kutz S, Harvell CD (2013) Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science* 341:514–519.
- Badgett MR, Auer A, Carmichael LE, Parrish CR, Bull JJ (2002) Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. *Science* 296:10524–10529.
- Becker CG, Greenspan SE, Tracy KE, Dash JA, Lambertini C, Jenkinson TS, Leite DS, Toledo LF, Longcore JE, James TY, Zamudio KR (2017) Variation in phenotype and virulence among enzootic and panzootic amphibian chytrid lineages. *Fungal Ecol* 26:45–50.
- Berger L, Speare R, Hyatt A (1999) Chytrid Fungi and Amphibian Declines: Overview, Implications, and Future Directions. *Declines Disappearances Aust Frogs* 148:23–33.
- Blaustein AR, Gervasi SS, Johnson PTJ, Hoverman JT, Belden LK, Bradley PW, Xie GY (2012) Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines. *Philos Trans R Soc B Biol Science* 367:1688–1707.
- Brand MD, Hill RD, Brenes R, Chaney JC, Wilkes RP, Grayfer L, Miller DL, Gray MJ (2016) Water Temperature Affects Susceptibility to Ranavirus. *Ecohealth* 13:350–359.
- Brunner JL, Richards K, Collins JP (2005) Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia* 144:399–406.
- Carvalho T, Becker CG, Toledo LF (2017) Historical amphibian declines and

- extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proc R Soc B Biol Sci* 284:2016-2025.
- Chen G, Robert J (2011) Antiviral immunity in amphibians. *Viruses* 3:2065–2086.
- Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L (2004) Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323:268–275.
- Chinchar VG, Waltzek TB, Subramaniam K (2017) Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae: Their place in the virosphere. *Virology*:1–13.
- Chinchar G V., Yu KH, Jancovich JK (2011) The molecular biology of Frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates. *Viruses* 3:1959–1985.
- Churchill AE, Chubb RC, Baxendale W (1969) The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J Gen Virol* 4:557–564.
- Clayton SC, Subramaniam K, Landrau-Giovannetti N, Chinchar VG, Gray MJ, Miller DL, Mavian C, Salemi M, Wisely S, Waltzek TB (2017) Ranavirus phylogenomics: Signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates. *Virology* 511:330–343.
- Cunningham a a, Langton TE, Bennett PM, Lewin JF, Drury SE, Gough RE, Macgregor SK (1996) Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:1539–1557.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* (80-) 287:443–449.
- Day T, Proulx SR (2004) A General Theory for the Evolutionary Dynamics of Virulence. *Am Nat* 163:E40–E63.
- Denver RJ, Glennemeier KA, Boorse GC (2002) Endocrinology of complex life cycles: Amphibians. *Horm Brain Behav Online* :707–745.
- Dias D de C, Stéfani MV De, Ferreira CM, França FM, Ranzani-Paiva MJT, Santos AA (2010) Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquac Res* 41:1064–1071.
- Earl JE, Chaney JC, Sutton WB, Lillard CE, Kouba AJ, Langhorne C, Krebs J, Wilkes RP, Hill RD, Miller DL, Gray MJ (2016) Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. *Oecologia* 182: 611–623.
- Earl JE, Gray MJ (2014) Introduction of Ranavirus to Isolated Wood Frog Populations Could Cause Local Extinction. *Ecohealth* 11: 581–592.
- Echaubard P, Leduc J, Pauli B, Chinchar VG, Robert J, Lesbarrères D (2014) Environmental dependency of amphibian-ranavirus genotypic interactions: Evolutionary perspectives on infectious diseases. *Evol Appl* 7: 723–733.
- Echaubard P, Little K, Pauli B, Lesbarrères D (2010) Context-dependent effects of ranaviral infection on northern leopard frog life history traits. *PLoS One* 5:1–7.
- Forzán MJ, Jones KM, Ariel E, Whittington RJ, Wood J, Markham RJF, Daoust P-Y (2017) Pathogenesis of *Frog virus 3* (*Ranavirus*, *Iridoviridae*) Infection in Wood Frogs (*Rana sylvatica*). *Vet Pathol* 54: 531–548.
- Forzán MJ, Jones KM, Vanderstichel R V., Wood J, Kibenge FSB, Kuiken T, Wirth W, Ariel E, Daoust PY (2015) Clinical signs, pathology and dose-

- dependent survival of adult wood frogs, *Rana sylvatica*, inoculated orally with Frog virus 3 (Ranavirus sp., iridoviridae). *J Gen Virol* 96: 1138–1149.
- Forzán MJ, Wood J (2013) Low Detection of Ranavirus Dna in Wild Postmetamorphic Green Frogs , *Rana (Lithobates) Clamitans* , Despite Previous or Concurrent. *J Wildl Dis* 49: 879–886.
- Freitas JJG, Viau P, Oliviera CA, Teixeira PC, Tachibana L, Carla Dias D de, Hipolito M, Bordon ICC, Alfaia SR, Ferreira CM (2017) Effect of dietary supplements in American bullfrogs reared in low and high stocking densities. *Aquac Reports* 8: 45–48.
- Frot DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, Sá RO de, Channing A, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JD, Green DM, Wheeler WC (2006) the Amphibian Tree of Life. *Bull Am Museum Nat Hist* 297: 1–291.
- Galli L, Pereira A, Ma A (2006) Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw , 1802) from South America. 257:78–82
- Gervasi SS, Foufopoulos J (2008) Costs of plasticity: Responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Funct Ecol* 22: 100–108.
- Grayfer L, Andino FDJ, Chen G, Chinchar G V., Robert J (2012) Immune evasion strategies of ranaviruses and innate immune responses to these emerging pathogens. *Viruses* 4:1075–1092.
- Haislip NA, Gray MJ, Hoverman JT, Miller DL (2011) Development and disease: How susceptibility to an emerging pathogen changes through anuran development. *PLoS One* :1-6.
- Hamer AJ, McDonnell MJ (2008) Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biol Conserv* 141: 2432–2449.
- Hoverman JT, Gray MJ, Haislip NA, Miller DL (2011) Phylogeny, life history, and ecology contribute to differences in amphibian susceptibility to ranaviruses. *Ecohealth* 8:301–319.
- Jesús Andino F De, Jones L, Maggirwar SB, Robert J (2016) Frog virus 3 dissemination in the brain of tadpoles, but not in adult *Xenopus*, involves blood brain barrier dysfunction. *Sci Rep* 6:22508
- Kolby JE, Smith KM, Berger L, Karesh WB, Preston A, Pessier AP, Skerratt LF (2014) First evidence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in Hong Kong amphibian trade. *PLoS One* 9
- Lancaster KZ, Pfeiffer JK (2012) Viral Population Dynamics and Virulence Thresholds. *Curr Opin Microbiol* 15:525–530.
- Landsberg JH, Kiryu Y, Tabuchi M, Waltzek TB, Enge KM, Reintjes-Tolen S, Preston A, Pessier AP (2013) Co-infection by alveolate parasites and Frog virus 3-like ranavirus during an amphibian larval mortality event in Florida, USA. *Dis Aquat Organ* 105:89–99.
- Lee E, Lobigs M (2002) Mechanism of Virulence Attenuation of Glycosaminoglycan-Binding Variants of Japanese Encephalitis Virus and Murray Valley Encephalitis Virus. *J Virol* 76:4901–4911.
- Lesbarrères D, Balseiro A, Brunner J, Chinchar VG, Duffus A, Kerby J, Miller DL, Robert J, Schock DM, Waltzek T, Gray MJ (2012) Ranavirus: past, present and future. *Biol Lett* 8:481–3.
- Majji S, LaPatra S, Long SM, Sample R, Bryan L, Sinning A, Chinchar VG (2006) *Rana catesbeiana* virus Z (RCV-Z): A novel pathogenic ranavirus.

- Dis Aquat Organ 73:1–11.
- Mazzoni R, Mesquita AJ De, Fleury LFF, Brito WMED De, Nunes IA, Robert J, Morales H, Coelho ASG, Barthasson DL, Galli L, Catroxo MHB (2009) Mass mortality associated with a Frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Dis Aquat Organ* 86:181–191.
- Miaud C, Pozet F, Gaudin NCG, Martel A, Pasmans F, Labrut S (2016) *RANAVIRUS* CAUSES MASS DIE-OFFS OF ALPINE AMPHIBIANS IN THE SOUTHWESTERN ALPS, FRANCE. *J Wildl Dis* 52:242–252.
- Miller DL, Gray MJ, Rajeev S, Schmutzer AC, Burton EC, Merrill A, Baldwin CA (2009) Pathologic Findings in Larval and Juvenile Anurans Inhabiting Farm Ponds in Tennessee, Usa. *J Wildl Dis* 45:314–324.
- Miller D, Gray M, Storfer A (2011) Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. *Viruses* 3:2351–2373.
- Miller DL, Rajeev S, Gray MJ, Baldwin CA (2007) Frog virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs. *Emerg Infect Dis* 13:342–343.
- Morales HD, Abramowitz L, Gertz J, Sowa J, Vogel A, Robert J (2010) Innate Immune Responses and Permissiveness to Ranavirus Infection of Peritoneal Leukocytes in the Frog *Xenopus laevis*. *J Virol* 84:4912–4922
- Morales HD, Robert J (2007) Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *J Virol* 81:2240–8.
- Moreira CR, Henriques MB, Ferreira CM (2013) Frog farms as proposed in agribusiness aquaculture: economic viability based in feed conversion. *Bol do Inst Pesca* 39:389–399.
- Neves PV, Catroxo MH, Hipolito M, Oliveira CR de, Ferreira CM (2016) Uso de anticorpos policlonais, microscopia eletrônica e histologia para detecção de partículas semelhantes ao iridovírus em rãs-touro. *Bol do Inst Pesca* 42:523–531.
- Pasquier L Du (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 129:1–15.
- Robert J, Abramowitz L, Gantress J, Morales HD (2007) *Xenopus laevis*: a possible vector of Ranavirus infection? *J Wildl Dis* 43:645–652.
- Robert J, Jancovich JK (2016) Recombinant ranaviruses for studying evolution of host–pathogen interactions in ectothermic vertebrates. *Viruses* 8:1–13.
- Robert J, Morales H, Buck W, Cohen N, Marr S, Gantress J (2005) Adaptive immunity and histopathology in Frog virus 3-infected *Xenopus*. *Virology* 332:667–675.
- Rollins-Smith LA (1998) Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunol Rev* 166:221–230.
- Rollins-Smith LA (2017) Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. *Dev Comp Immunol* 66:111–119.
- Sasso T, Lopes CM, Valentini A, Dejean T, Zamudio KR, Haddad CFB, Martins M (2017) Environmental DNA characterization of amphibian communities in the Brazilian Atlantic forest: Potential application for conservation of a rich and threatened fauna. *Biol Conserv* 215:225–232.
- Schloegel LM, Ferreira CM, James TY, Hipolito M, Longcore JE, Hyatt AD, Yabsley M, Martins AMCRPF, Mazzoni R, Davies AJ, Daszak P (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53–61.

- Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, Davies AJ, Hyatt AD, Daszak P (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biol Conserv* 142:1420–1426.
- Seixas Filho JT., Camargo Filho CB., Pereira MM., Martins AMCRPF, Ribeiro Filho OP., Mello SCRPF, Cassiano LL, Hipolito M (2017) Histopathological aspects of the liver of free-living and farmed bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Brazilian J Anim Sci* 46:275–279.
- Seixas Filho JT de, Hipólito M, Pereira MM, Martins AMCRP da F, Rodrigues E, Mello SCRPF (2013) –Liver histopathological changes in breeding bullfrogs– - doi: 10.4025/actascibiolsci.v35i4.15981. *Acta Sci Biol Sci* 35:461–465.
- Soto-Azat C, Peñafiel-Ricaurte A, Price SJ, Sallaberry-Pincheira N, García MP, Alvarado-Rybak M, Cunningham AA (2016) *Xenopus laevis* and Emerging Amphibian Pathogens in Chile. *Ecohealth* 13:775–783.
- Tamukai K, Tokiwa T, Kobayashi H, Une Y (2016) Ranavirus in an outbreak of dermatophilosis in captive inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Vet Dermatol* 27:99-e28.
- Teixeira PC, Vicentini IBF, Ferreira CM, França FM, Bordon ICA da C, Ranzani-Paiva MJT (2015) Bullfrog hemogram under management stress. *Ciência Agrotec, Lavras* 39:154–163.
- Vences M, Köhler J (2008) Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:569–580.
- Warne RW, Crespi EJ, Brunner JL (2011) Escape from the pond: Stress and developmental responses to ranavirus infection in wood frog tadpoles. *Funct Ecol* 25:139–146.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após dez anos da descoberta da presença da doença no Brasil, o avanço científico na área ainda segue lento. É de suma importância entender a susceptibilidade de espécies, sua transmissão e sua distribuição geográfica em um país com uma biodiversidade tão significativa e uma extensão a nível continental. Estimula-se a ideia de trabalhos interdisciplinares que abordem áreas da biologia molecular, ecologia, biossegurança e imunologia. O presente estudo é o primeiro, que se tem reporte, onde utiliza a rã-touro em um processo de infecção experimental para uma doença viral.

A ranicultura é uma atividade de modesta expressão quando comparada ao panorama agroprodutor do país, sendo visto como um produto de luxo ou exótico ao mercado consumidor. Apesar disso a espécie *Lithobates catesbeianus* parece ter um papel de destaque visto ser a única reportada como afetada pela doença no país. Observa-se que os surtos são co-dependentes de fatores atenuantes que tendem a resultar em uma possível imunodepressão do sistema imune, o que torna os animais pré-dispostos a doença. Em um ambiente produtivo esses fatores podem ser de origem física, química ou biológica, sendo um bom manejo a melhor prevenção a qual um produtor pode ter como aliado a patologia.

Há de se ter atenção com a possibilidade de escapes e a entrada de outras espécies em áreas de produção. O presente estudo sugere que a espécie testada, assim como outras espécies relatadas fora do país, pode se manter saudável devido a persistência da ranavírus. Porém, ainda não se tem dados do comportamento do vírus em um ambiente natural e espécies de vida livre no Brasil, logo são prudentes ações que previnam o escape, descarte irregular e a

entrada de outras espécies (peixes, anfíbios e répteis) que podem vetorizar doenças de forma bidirecional.

Por fim se destaca os esforços para a subsequência do trabalho. Como os planos de sequenciar o genoma viral completo, o que dará base para uma análise aprofundada quanto sua patogenicidade, virulência e capacidade de disseminação viral, assim como a possibilidade de comparar com as cepas que acometeram raniculturas nos Estados Unidos e Japão. Também se mantém a ideia de um processo de hibridização *In Situ* para confirmar a presença viral no interior dos tecidos e a presença de corpúsculos de inclusão. Recomendamos um retorno a comunidade produtora com explicações simplificadas sobre a doença, seus riscos e a importância de medidas zootécnicas, sanitárias e alimentares como profilaxia a uma doença que até o presente momento não apresenta vacinas ou metodologias terapêuticas.