



Universidade Federal do Amazonas

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Departamento de Apoio à Pesquisa

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Bolsista: Jessica da Silva Padinha, CNPq.

MANAUS

2015



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa



Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

RELATÓRIO FINAL
PIBIC/PIBITI 2014/2015

Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Bolsista: Jessica da Silva Padinha
Orientador: Jaydione Luiz Marcon

MANAUS
2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Sumário

Resumo	5
Abstract	5
Introdução.....	6
Objetivos.....	9
Material e Métodos	10
Análise dos Dados.....	13
Resultados.....	14
Discussão	20
Considerações Finais.....	27
Referências bibliográfica.....	28

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil hematológico e morfométrico de representantes de *Leptodactylus pentadactylus*, que habitam o fragmento florestal urbano na Amazônia Central (Manaus). Por se tratar de continuidade de projeto, os resultados obtidos nesse trabalho foram agrupados com o projeto PIB-B-0126/2013 (PIBIC/UFAM) para obter um melhor número amostral. No total, 38 animais de vida livre foram coletados no período de agosto de 2013 a julho de 2015, dentre eles 20 machos, 13 fêmeas e cinco indivíduos de sexo indeterminado. Foram avaliadas as medidas biométricas (massa e tamanho), o sexo e o perfil hematológico, com a caracterização das células sanguíneas. Os indivíduos foram marcados individualmente e de forma definitiva com microchips. Os valores (média $\pm$ DP) observados para a massa e tamanho dos anuros foram $133,0 \pm 41,3$ mm e $295,6 \pm 111,3$ g, respectivamente. Nas análises hematológicas não foram observados diferenças em relação ao tamanho e massa, bem como entre o sexo dos animais.

Palavra chave: hematologia, *L. pentadactylus*, morfologia celular.

Abstract

The main goal of the present study was to establish the morphometric and hematological profile of free living individuals of *Leptodactylus pentadactylus* inhabiting an urban forest fragment in Central Amazon (Manaus). This project is a continuation of PIB-B-0126/2013 project (PIBIC/UFAM), and results were grouped to obtain a better sample size. In a total, 38 individuals were collected from August 2013 to July 2015, being 20 males, 13 females and five with indeterminate sex. Values (mean $\pm$ SD) obtained for body mass and size were 295.6 ± 111.3 g and 133.0 ± 41.3 mm, respectively. There were no significant differences between the hematological parameters and the body measured parameters, as well as with the sex of the studied individuals.

Key words: hematology, *L. pentadactylus*, cell morphology.

INTRODUÇÃO

A região Amazônica é formada por distintos ecossistemas como florestas densas de terra firme, florestas estacionais, florestas de igapó, campos alagados, várzeas, savanas, refúgios montanhosos e formações pioneiras, esse conjunto de sistemas forma o bioma Amazônico (IBGE, 2015). Com uma área de aproximadamente 49,29% do território brasileiro, o bioma amazônico é o de maior extensão territorial dentre os seis biomas, e também a maior bacia hidrográfica, onde ocupa 2/5 da América do Sul e 5% da superfície terrestre (IBGE, 2014).

O Brasil é o país que possui a maior riqueza e diversidade de anfíbios, com 946 espécies descritas até o presente momento (Segalla et al., 2012), das quais 60% são endêmicas (Lewinsohn & Prado, 2004). Com isso, a Amazônia contribui de forma significativa para a maior diversidade de anuros observada nas regiões neotropicais (Heyer et al., 1990; Duellman, 1999).

Dentre os vários grupos de anuros, a família Leptodactylidae se destaca por possuir quatro gêneros (*Hydrolaetare*, *Scythrophrys*, *Paratelmatobius* e *Leptodactylus*) e 95 espécies (Frost, 2008). A maior parte delas está contida no gênero *Leptodactylus* (85 espécies). Este grupo é, em geral, representado por animais de pequeno e médio porte, insetívoros, terrestres ou semi-aquáticos, com atividade noturna (Frost, 2008). Esses animais vivem associados à serapilheira de florestas tropicais úmidas ou próximos aos corpos de água, com exceção de algumas espécies que habitam ambientes áridos e, cujos modos reprodutivos são bastante variados (Duellman & Trueb 1994, Pough et al. 2004).

A maior parte das espécies de anuros depositam ovos em ambientes aquáticos onde as larvas se desenvolvem (Haddad & Prado, 2005) e, portanto, a atividade diária e anual, considerando o período reprodutivo, está fortemente relacionada com fatores como a temperatura, umidade e a precipitação (Almeida et al., 2001).

A espécie *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768), popularmente conhecido na região como rã pimenta, é um anuro de grandes dimensões e amplamente distribuído na bacia amazônica (Heyer, 2005). De acordo com a

literatura, a espécie *Leptodactylus pentadactylus* é encontrada em todos os países da América do Sul inseridos no bioma Amazônico: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Suriname. É um dos maiores anuros deste bioma, podendo atingir 185 mm de comprimento rostro-cloacal (Heyer, 1979). Possui hábitos terrestres noturnos e são encontrados principalmente nas margens de igarapés, mas também em áreas mais altas, como os platôs, afastados dos corpos d'água (Costa, 2013).

A rã pimenta apresenta coloração dorsal castanho avermelhada, com manchas transversais escuras entre as pregas dorsolaterais. A coloração da região ventral é composta por manchas brancas sobre fundo acinzentado. Uma faixa negra vai desde a ponta do focinho, passando pelos olhos e curva sobre o tímpano pela lateral do corpo. A íris dos adultos apresenta duas cores, bronze na parte superior e laranja na parte inferior. Os machos apresentam membros anteriores hipertrofiados, espinhos nupciais nos polegares (pré-polex) e coloração avermelhada nas laterais do corpo durante a atividade reprodutiva (Duellman, 1978; Hero & Galatti, 1990; Lima et al., 2006).

Esta espécie deposita os ovos em ninhos de espuma construídos durante a ovoposição e tem por função a proteção dos ovos e embriões durante as fases iniciais do desenvolvimento contra predação e dessecação (Heyer, 1969; Downie, 1993; Menin & Giaretta, 2003). Durante esse trabalho observou-se que, no período das chuvas há uma grande concentração desses animais devido à disponibilidade de ambientes de reprodução (de agosto a novembro), confirmando o que Lima et al. (2006) e Silva & Giaretta (2009) registraram para a espécie. Durante a época reprodutiva, os machos deslocam-se para os platôs e exibem maior atividade vocal (Galatti, 1992).

A análise das propriedades hematológicas do sangue ainda é muito restrita nos anfíbios, especialmente em espécies tropicais (Gatten Jr. & Brooks, 1969). Em seu estudo, Kuramoto (1981) demonstrou diferenças na morfologia, tamanho e número de eritrócitos entre anuros e urodelos, estes últimos possuindo eritrócitos maiores, mais alongados e em menor número no sangue circulante. Gül et al. (2011), em estudo com anuros da Turquia, verificaram que o RBC foi mais elevado em espécies terrestres, do que em espécies semi-aquáticas. Também a concentração de hemoglobina, os valores de hematócrito e índices hematológicos, como VCM e HCM, foram superiores nas espécies

terrestres em comparação às espécies semi-aquáticas e aquáticas, demonstrando que variáveis ambientais como habitat, altitude (Friedmann, 1971) e variação anual (Friedmann, 1977) podem influenciar no perfil hematológico de uma espécie.

Alguns estudos apontam que fatores intrínsecos tais como tamanho e sexo também podem determinar diferenças em parâmetros do sangue de diferentes espécies de anuros (Wojtaszek & Adamowicz, 2003), embora outros estudos não tenham demonstrado estas diferenças (Arikan et al., 2010).

Para espécie de anuro *Rana catesbeiana* (rã- touro) os tipos celulares de leucócitos mais abundantes encontrados foram linfócitos e neutrófilos e de forma mais escassa eosinófilos, basófilos. Ferreira (2002) e Marcantônio (2005). Contudo, ainda não foram estipulados dados mais amplos sobre leucograma em anuros. Informações sobre os parâmetros sanguíneos ainda não estão disponíveis na literatura para indivíduos de vida livre de *L. pentadactylus*, embora Couto (2013) tenha iniciado as atividades relacionadas ao estabelecimento de valores referenciais para esta espécie de anuro tropical em ambiente natural.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar a biologia e o perfil hematológico da população de *Leptodactylus pentadactylus* em habitats de fragmento florestal urbano e de floresta contínua na Amazônia Central.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar o tamanho corporal e o sexo dos indivíduos amostrados;
- 2) Estabelecer o perfil hematológico para indivíduos de vida livre da espécie;
- 3) Determinar o leucograma *Leptodactylus pentadactylus*;
- 4) Testar possíveis associações entre o perfil hematológico, o tamanho corporal e o sexo dos anuros;
- 5) Marcar individualmente e de forma definitiva, com microchip, os indivíduos amostrados para estudos populacionais futuros.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas de *Leptodactylus pentadactylus* (Figura 1) foram realizadas durante o período de agosto de 2013 a julho de 2015 e os dados foram agrupados. As idas a campo foram nas áreas do fragmento florestal urbano na mata da UFAM, uma área de 591,97 ha (Marcon et al., 2012) de vegetação contínua com 30 nascentes de água e 12 igarapés de primeira e segunda ordem. As coletas foram feitas ao cair da noite (17:30 – 21:00h), com a localização dos indivíduos por vocalização “woop” (Duellman, 2005) ou visualmente, com auxílio de uma lanterna de cabeça e apanhados com puçá ou manualmente. Nesse período de 2013 a 2015 foram capturados 38 animais, dentre eles sete recapturas; 13 fêmeas e 20 machos e cinco de sexo

indeterminado, como são animais de vida livre, Indivíduos desta espécie são extremamente rápidos e difíceis de capturar.

Logo após a captura a foi realizada a coleta de sangue, com a aplicação prévia de uma solução de iodo 0,1% como agente antibacteriano (Christy, 1996) e a utilização de seringas de insulina descartável de 1mL, contendo heparina (5000 unidades) como anticoagulante colocada na ponta da seringa. A quantidade máxima de sangue coletado por indivíduo foi de 0,3 ml, não excedendo 1% do peso do animal (Wright & Whitaker, 2001), pela veia abdominal, e armazenada em tubos Eppendorf sem anticoagulantes. O sangue coletado foi armazenado em local com gelo e analisado no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Amazonas, em período de até 24 horas.

Após a coleta do sangue, foram feitas a morfometria, com determinação do comprimento rostro-uróstilo (CRU; mm) com um paquímetro digital, a massa corporal (gramas) com uma balança Pesola® de 1000g. O sexo de cada indivíduo foi determinado com base no dimorfismo sexual existente nesta espécie, que inclui a presença de membros anteriores hipertrofiados, a presença de um espinho do pré-polex e coloração (Lima et al., 2006). Por fim, foi introduzido um microchip subcutâneo na coxa esquerda de cada indivíduo capturado no fragmento florestal da UFAM para marcação individual e permanente. A inserção do microchip foi feita com um aplicador (seringa e agulha), previamente esterilizado.



Figura 1. Fêmea adulta de *L. pentadactylus* coletado no fragmento do Campus da UFAM.

Parâmetros hematológicos

Após a realização das atividades a campo, foram realizados os procedimentos laboratoriais no Laboratório de Fisiologia- UFAM. Foram realizados, o hemograma e as análises dos seguintes parâmetros hematológicos: micro-hematócrito (Ht, %); concentração de eritrócitos (RBC, milhões/ μ L), em amostras diluídas em formol-citrato lidas na câmara de Neubauer (Fowler & Miller, 2007); concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), determinada pela leitura espectralométrica a 540 nm (Kampen & Zijlstra, 1964). A partir dos parâmetros obtidos foram também calculados os seguintes índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM; fL); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; g/dL) e hemoglobina corpuscular média (HCM; pg), conforme sugerido por Wintrobe (1934).

Morfologia celular

Para as análises morfológicas, foram feitas as extensões sanguíneas nas lâminas, com a utilização de 6 e 7 μ ml de sangue, as lâminas ficavam postas para secagem natural e posteriormente feita a coloração, cobrindo a lâmina com corante May- Grunwald Gyemsa Wright – MGGW, deixando agir por 1 minutos, posteriormente retirava o excesso com água destilada e esperava secar para observação no microscópio na objetiva de 40x e posteriormente na objetiva de 100x (imersão). Foram tiradas fotos para posterior observação e identificação das células.

Análises dos Dados

A variação dos valores do hemograma e da biometria foi avaliada entre as populações urbanas de *Leptodactylus pentadactylus* utilizando a ANOVA, seguido do teste à posteriori de Tukey. A comparação entre os sexos para os dados biométricos, hemograma onde foram feitos pelo emprego do teste-t de Student.

A correlação entre o hemograma e o tamanho (CRU) e peso dos animais foi testada pelo uso de regressão linear simples ou Correlação de Pearson. Respeitando em ambos o limite de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SYSTAT (Systat 8.0, SPSS INC., Chicago). Os dados do sexo indeterminado não foram incluídos na análise biométrica e hematológica.

Resultados

Biometria

No total de dados foram amostrados 38 indivíduos no fragmento florestal urbano da UFAM, dentre eles 20 machos, 13 fêmeas e cinco indivíduo de sexo indeterminado. Deste total, sete indivíduos foram recapturas (quatro fêmeas três machos). Os valores das recapturas e dos indivíduos com sexo indeterminado não foram considerados.

Os valores dos resultados da biometria são apresentados na Tabela 1. Os machos apresentaram valores de CRU e Massa (médias $\pm$ DP) de $136,6 \pm 52,1$ mm e $290,1 \pm 92,2$ g, respectivamente. Já as fêmeas apresentaram valores de CRU e Massa de $131,1 \pm 21,6$ mm e $308,8 \pm 86,3$ g, respectivamente. Não foram constatadas diferenças significativas entre machos e fêmeas, tanto no CRU ($p = 0.704$) quanto na massa ($p = 0.464$) dos mesmos.

Considerando que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre machos e fêmeas, os dados foram agrupados, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Biometria de machos e fêmeas de *L. pentadactylus* em fragmento florestal urbano (UFAM). Média $\pm$ desvio padrão, mínimo e máximo.

Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DP
FÊMEA					
CRU (mm)	10	81,8	158,7	131,1	21,6
Massa (g)	10	165,0	438,0	308,8	86,3
MACHO					
CRU(mm)	16	72,5	320,0	136,6	52,1
Massa (g)	16	190,0	540,0	290,1	92,2
TOTAL					
CRU (mm)	31	71,4	320,0	133,0	41,3
MASSA (g)	31	45,0	540,0	295,6	111,3

Parâmetros hematológicos

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos ($p_{Ht} = 11,3$; $p_{RBC} = 0,34$; $p_{Hb} = 3,1$) e índices hematimétricos ($p_{VCM} = 384,1$; $p_{HCM} = 93,2$; $p_{CHCM} = 12,2$) entre machos e fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de fêmeas e machos de *L. pentadactylus* capturados no fragmento florestal da UFAM. Média $\pm$ desvio padrão, mínimo e máximo.

Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DP
Fêmea					
Ht %	9	9,0	39,0	25,4	8,5
RBC milhões/ μ L	9	0,15	1,91	0,561	0,5
Hb g/dL	9	3,2	15,6	5,8	4,0
VCM fl	9	5,7	1556,7	513,0	472,7
HCM pg	9	26,3	386,3	170,0	136,0
CHCM g/dL	9	9,5	53,7	24,7	15,0
Macho					
Ht %	13	4,8	38,0	27,4	8,5
RBC milhões/ μ L	13	0,16	0,9	0,5	0,23
Hb g/dL	12	1,14	9,6	5,1	2,8
VCM fl	13	3,8	1025,3	341,5	325,2
HCM pg	12	42,8	170,2	98,8	41,6
CHCM g/dL	12	4,5	36,3	17,6	10,2

Considerando estes resultados, foi possível obter de forma agrupada (machos e fêmeas), conforme Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos obtidos para a espécie *L. pentadactylus* capturados no fragmento florestal urbano, agrupando machos e fêmeas. Valor médio $\pm$ desvio padrão, mínimo e máximo.

	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Ht %	27	4,8	66,8	28,8	11,3
RBC milhões/ μ L	27	0,15	1,9	0,51	0,34
Hb g/dL	24	1,13	15,6	5,38	3,1
VCM fl	27	3,8	1556,7	359,9	384,1
HCM pg	24	26,3	386,3	126,7	93,2
CHCM g/dL	24	4,5	53,7	19,9	12,2

Morfologia das células dos anuros

Com base na literatura consultada, as células encontradas nas lâminas dos *L. pentadactylus* são semelhantes aos vertebrados. Foram encontradas as células dos glóbulos vermelhos, os eritrócitos, onde são as mais abundantes do sangue dos anuros assim como nos vertebrados. (Zenklusen,2014). (figura 2).

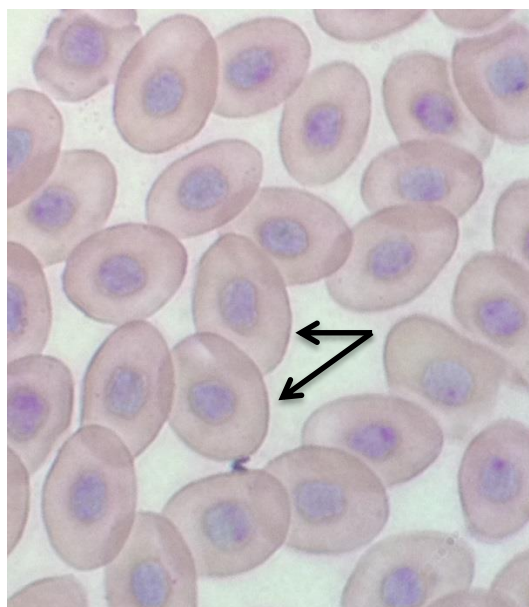


Figura 2: Eritrócitos (seta) de uma extensão na lâmina de *L. pentadactylus*.

Já as células dos glóbulos brancos, que foram observadas nas extensões sanguíneas representam as células do grupo de granulócitos e agranulócito, onde são compostas por neutrófilos ou heterófilos, eosinófilos, e basófilos, representando as células granulocíticas e os linfócitos e monócitos as células agranulocíticas, semelhantes às encontradas nos vertebrados (Zenklusen,2014). (Figura 3-8).

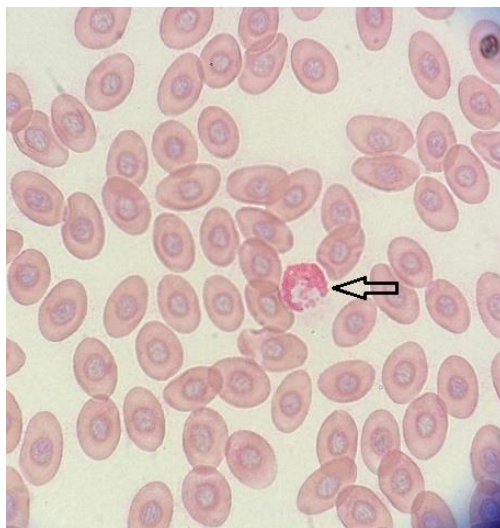


Figura 3 – Localização de um eosinófilo (seta) na extensão sanguínea.

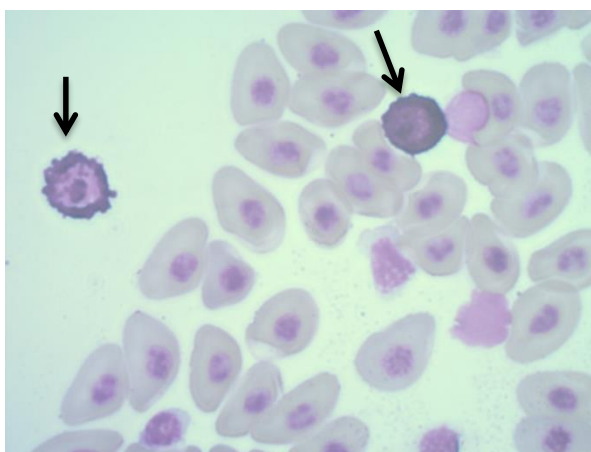


Figura 4 – Localização de um basófilo (seta) na extensão sanguínea.

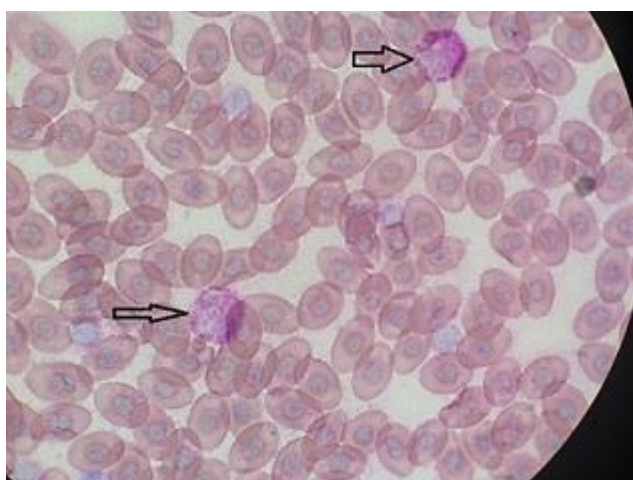


Figura 5- Observação de 2 (seta) Neutrófilos na extensão sanguínea

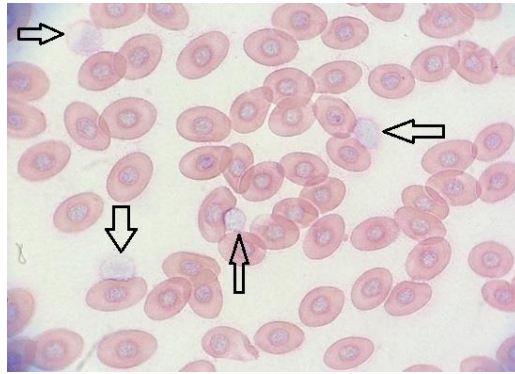


Figura 6 – Observação de vários leucócitos (seta) na extensão sanguínea.

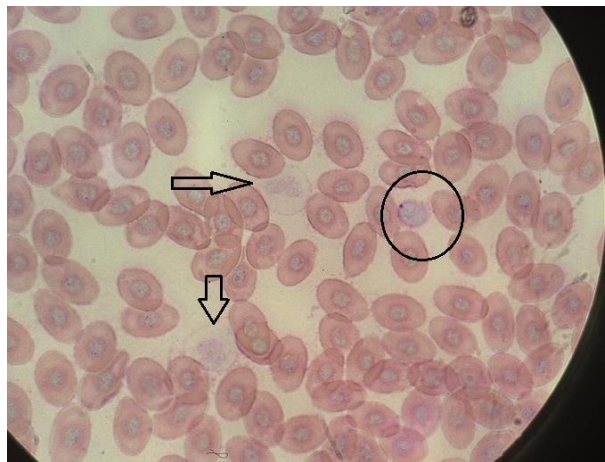


Figura 7 – Visualização de dois macrófagos (seta) e de um basófilo (circulo) na extensão sanguínea.

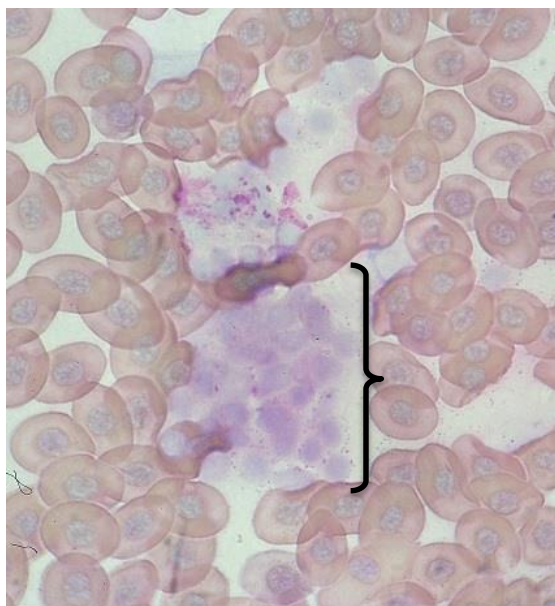


Figura 8- Visualização de um aglomerado de plaquetas (chave) na área da extensão sanguínea.

Discussão

Biometria

As dimensões corporais observadas nos indivíduos amostrados no presente estudo são semelhantes às observadas em outras populações de *Leptodactylus pentadactylus* na Amazônia (Duellman, 1978; Galatti, 1992; Heyer, 2005) e para populações de diferentes regiões da Amazônia, como Peru (machos: 140-169 mm, fêmeas: 125-181 mm; Rodriguez & Duellman 1994; Duellman, 2005), Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (machos: 100-195, fêmeas: 135-174; Heyer, 2005).

O recente trabalho de Couto (2013), também realizado no fragmento florestal da UFAM comparou os tamanhos corporais da população de *L. pentadactylus* do fragmento com populações de duas áreas de floresta contínua e registrou diferenças significativas, sendo o tamanho das fêmeas do fragmento maior que o das fêmeas de floresta contínua. Em fragmentos florestais, é esperado um menor tamanho populacional devido à redução do tamanho da área (Laurence & Vasconcelos, 2009).

No entanto, o presente trabalho com os dados agrupados não registrou diferenças significativas no CRU, na massa corporal e entre os sexos, contrariamente o que foi reportado por Heyer (2005), onde foram observadas diferenças no dimorfismo sexual nas medidas biométricas. Entretanto as diferenças observadas entre os sexos foram somente no dimorfismo sexual na presença de caracteres sexuais secundários nos machos, como a presença de pré-polex e membros anteriores hipertrofiados (Figura 9). Tais características estão relacionadas com interações agonísticas entre machos, especialmente no período reprodutivo (Costa, 2013).

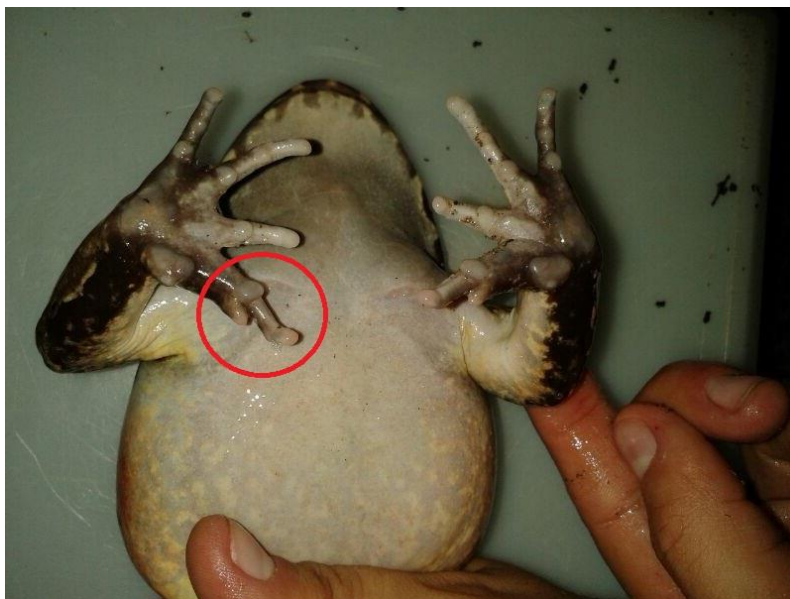


Figura 9. Macho adulto de *L. pentadactylus*, em destaque no círculo vermelho o pré-polex, característico deste sexo.

Parâmetros hematológicos.

As diferenças nos parâmetros hematológicos sexuais que foram observadas no *L. pentadactylus* divergem para outras espécies, como para os machos de *Duttaphrynus melanostictus* (= *Bufo melanostictus*) que apresentam valores de Ht, Hb e RBC mais elevados que as fêmeas da espécie (Glomski et al., 1997). Em *Pelophylax lessonae* (= *Rana esculenta*) o mesmo padrão foi observado para os valores de Hb e RBC (Sinha, 1983); Harris (1972) observou valores de Ht consistentemente mais elevados nos machos de *Lithobates pipiens* e em *Bombina bombina* os valores de RBC dos machos também foram superiores aos das fêmeas (Wojtaszek & Adamowicz, 2003).

Embora acreditasse que nos machos de *L. pentadactylus* os valores poderiam ser maiores no comparativo com as fêmeas por possuir maior atividade metabólica, esta correlação ocorre pelo comportamento específico dos machos, como a vocalização (Prestwich, 1994) e comportamento territorial (Wells, 1977), entretanto essas diferenças entre os sexos não foram observadas. Os valores médio obtidos assemelham-se ao perfil hematológico de outros anfíbios (Glomski et al., 1997).

Em outras espécies como *Euphlyctis cyanophlyctis* (= *Rana cyanophlyctis*) e *Polypedates maculatus*, são as fêmeas que apresentam valores hematológicos mais elevados (Glomski et al., 1997; Mahapatra et al. 2010), diferença também não observada em *L. pentadactylus*.

Os dados analisados dos parâmetros sanguíneos representam informações importantes para *L. pentadactylus* em ambiente natural atualmente, pois quase não se tem trabalhos dessa natureza.

Morfologia das células dos anuros

As células que foram observadas nas lâminas dos esfregaços sanguíneos dos indivíduos, são semelhantes as encontradas nos vertebrados.

Os eritrócitos encontrados nas lâminas dos anuros tem uma forma oval e são delgadas com uma protrusão central devido ao núcleo, são pequenos com citoplasma basofílico, semelhante aos eritrócitos dos reptéis, são as células, mas abundantes do sangue e sua função é o transporte de oxigênio e dióxido de carbono. (Allender M. 2008).

Outro tipo celular encontrado no sangue dos anuros são os leucócitos, que são classificados como granulócitos e agranulócito. (Zenklusen, 2014). As células granulocíticas, representadas pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos apresentam atividade fagocitária e estão intimamente relacionados aos mecanismos de defesa do hospedeiro, particularmente contra bactérias.

Os neutrófilos observados nas lâminas possuem frequentemente núcleo não segmentado, com citoplasma com granulações basofílicas, eosinofílicas e azurofílicas, são geralmente menores e mais alongados do que os dos eosinófilos e pode ser de forma irregular (Allender M. 2008), semelhante ao que relata a literatura.

Os basófilos são figuras sanguíneas comuns no sangue periférico de anuros larvais, particularmente em girinos de *R. catesbeiana*. (Teixeira, 2007). Essa célula é o tipo predominante de WBC em alguns anfíbios, dado que se pôde notar nas lâminas dos indivíduos de *L. pentadactylus*. Os basófilos

apresentam coloração intensa, grânulos e núcleos citoplasmáticos intensamente basofílicos e não são lobuladas (Allender M. 2008).

Os eosinófilos observados nas lâminas apresentam granulação citoplasmática esférica, em formato de rosário que se coram pela eosina, com núcleo localizado centralmente e possuem citoplasma fracamente acidófilo, semelhante ao descrito na literatura. (Allender M. 2008) (figura 13).

Já as células agranulócito, que são representadas pelos monócitos, linfócitos e as plaquetas, onde os monócitos apresentam marcante atividade macrofágica, enquanto os linfócitos estão relacionados com a estimulação do crescimento dos tecidos e à síntese de anticorpos. (Teixeira, 2007). E as plaquetas, ou trombócitos, são corpúsculos anucleados, que têm sua origem a partir de fragmentos do citoplasma de células gigantes da medula óssea, os megacariócitos e sua função estão primariamente ligadas à coagulação sanguínea. (TEIXEIRA, 2007).

Os monócitos são raros e podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico ou em forma de “U”, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolado e fracamente basofílico, sendo maiores que os grandes linfócitos (Teixeira, 2007). DUELLMAN e TRUEB (1986), TURNER (1988) e FERREIRA (2002) afirmam que os linfócitos são os leucócitos mais freqüentes no sangue periférico de anuros larvais.

Foram observados nas lâminas com núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico, em algumas espécies apresenta as vezes microvilosidades (pseudopoidia), entretanto não foi observado tal características nos *L. pentadactylus*, possuem citoplasma finamente granular, coram-se de azul claro e podem conter granulações hialinas azurofílicas com núcleo bastante desenvolvido. (Allender M. 2008) (figura 15).

Os trombócitos são células nucleadas, com núcleos redondos e citoplasma mais basófilo, com função similar às plaquetas dos mamíferos, são geralmente, elipsóide (muitas vezes bastante alongados) para fusiforme, foram observados aglomerados nas extensões sanguíneas. (Allender M. 2008). A classificação utilizada para caracterização das células dos anfíbios é semelhante a dos vertebrados. DUELLMAN e TRUEB (1986), TURNER (1988) e FERREIRA (2002).

Considerações finais

De uma forma geral, não houve tanta divergência nas características hematológicas da rã pimenta em relação a outros trabalhos realizados com a mesma espécie e com espécies diferentes de anuros. Embora foi esperado encontrar nas análises laboratoriais dos machos valores hematológicos mais elevados, como descrito por Prestwich (1994) e por Wells (1977), que indicavam maior atividade metabólica em relação as fêmeas.

A caracterização das células das extensões sanguíneas foi um importante achado para a evolução dos estudos futuros com essa espécie e para esse grupo de anuros. É uma ferramenta importante para entender melhor e em longo prazo o impacto da urbanização e/ou degradação ambiental do fragmento da UFAM sobre esta espécie de anuro.

Bibliografia

Ahumada, D. P. R. (2010). Distribuição e Abundância de Anuros de Floresta de Terra Firme na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – Amazônia Central. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Christy, M. T. (1996). The efficacy of using Passive Integrated Transponder (PIT) tags without anaesthetic in free-living frogs. *Australian Zoologist*, 30(2), 139–142.

Couto, A., Menin. M., Marcon, J.L. (2013). Tamanho corporal, dieta e parâmetros hematológicos de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) em fragmento florestal e floresta contínua na Amazônia central.

Duellman, W. E. (1978). *The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador*. Lawrence: University of Kansas, Natural History Museum.

Duellman, W. E., & Lizana, M. (1994). Biology of a sit-andwait predator, the leptodactylid frog *Ceratophrys cornuta*. *Herpetologica*, 50, 51–64.

Duellman, W.E. 2005. Cusco Amazónico, the lives of amphibian and reptiles in
Fowler, M. E., & Miller, R. E. (2007). *Zoo and Wild Animal Medicine* (6th ed.).
Philadelphia: Saunders.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à
Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 33: 14.

Faria da Costa, N. M., Rojas-Ahumada, D. P., Da Silveira, R., & Menin, M. (*in press*). Notes on abundance, size and calling activity of the South American bullfrog, *Leptodactylus pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae), in pristine and fragmented forests in Central Amazonia, Brazil.

Glomski, C. A., Tamburlin, J., Hard, R., & Chainani, M. (1997). The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians.

Heyer, W. R. (2005). Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, northern South America, and Amazonia. *Arq. Zool*, 269–348.

Heyer, W. Ronald. (1969). Adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus*. *Evolution*, 23(3), 421–428

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 1999 *Histologia Básica*. 9a Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,. 427p.

Laurence, W.F.; Vasconcelos, H.L. 2009. Consequencias ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. *Oecologia Brasiliensis* 13(3): 434-451.

Laurance, W. F., Camargo, J. L. C., Luizão, R. C. C., Laurance, S. G., Pimm, S. L., Bruna, E. M., Vasconcelos, H. L. (2011). The fate of Amazonian forest fragments: a 32-year investigation. *Biological Conservation*, 144(1), 56–67.

Lima, A. P., Magnusson, W. E., Keller, C., Menin, M., Rodrigues, D. J., Hödl, W., & Erdtmann, L. K. (2006). Guia de Sapos Da Reserva Adolpho Ducke, Amazonia Central. Manaus: Attema Design Editorial.

Marcon, J. L. ; Cruz, J. ; Menin, M. ; Carolino, O. T. ; Gordo, M. . Biodiversidade fragmentada na floresta do campus da Universidade Federal do Amazonas: conhecimento atual e desafios para a conservação. In: Marcon, J.L.; Menin, M.; Araújo, M.G.P.; Hrbek, T. (Org.). Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. 1ed. Manaus: Edua, 2012, v. , p. 221-278.

Matthew C. Allender, DVM, MS, Michael M. Fry, DVM, MS, DACVP–Clinical Pathology.(2008). Amphibian Hematology.

Menin, M. (2005). Padrões de distribuição e abundância de anuros em 64 km² de floresta de terra-firme na Amazônia Central. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Menin, M., Lima, A. P., & Rodrigues, D. J. (2010). The tadpole of *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) from central Amazonia. *Zootaxa*, 2508, 65–68.

Menin, M., Rossa-Feres, D. C., & Giaretta, A. A. (2005). Resource use and coexistence of two syntopic hylid frogs (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(1), 61–72.

Prestwich, K. N. (1994). The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *American Zoologist*, 34, 625–643

Kampen, E. J., & Zijlstra, W. G. (1964). Standartization of haemoglobinometry. In C. G. Boroviczény (Ed.), *Erythrocytometric Methods and their standartization* (Vol. 18, pp. 68–72). Presented at the Transactions of the Standardizing Committee and Proceedings of Symposium 18 of the 9th Congress of the European Society of Haematology, Lisbon: Current Studies in Hematology and Blood Transfusion.

Silva, W. R., & Giaretta, A. A. (2009). On the natural history of *Leptodactylus syphax* with comments on the evolution of reproductive features in the *L.*

pentadactylus species group (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Natural History*, 43(3-4), 191–203.

Sinha, R. C. (1983). Haematological studies on the prewintering and wintering frog, *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol*, 74(A), 311– 314.

Tsuji-Nishikido, B. M., & Menin, M. (2011). Distribution of frogs in riparian areas of an urban forest fragment in Central Amazonia. *Biota Neotropica*, 11(2): 63–70.

Teixeira, C., 2007. Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea. Jaboticabal, 2007 viii, 86 f. : il.

TURNER, R.J. 1988 Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N. N.A. *Vertebrate Blood Cells*, New York,. Cambrige University Press,. p. 129-209.

Wojtaszek, J., & Adamowicz, A. (2003). Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comparative Clinical Pathology*, 12(3), 129–134.

Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32–49.

Wells, K. D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, 666–693.

Wells, K. D. (2007). *The Ecology & Behavior of Amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.

Wright, K. M., & Whitaker, B. R. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar: Krieger Publishing Company.

Zenklusen, C., Attademo, A. M. (2014). Generalidades Sobre La Hematología De Anfibios Anuros. Museo Provincial De Ciências Naturales “Florentino Ameghino”, 18, 1-15.