



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Paula Maria Rosa

Trematódeos digenéticos (Platyhelminthes: Digenea) influenciam o desempenho da alimentação e comportamentos antipredatórios em girinos?

São José do Rio Preto
2021

Paula Maria Rosa

Trematódeos digenéticos (Platyhelminthes: Digenea) influenciam o desempenho da alimentação e comportamentos antipredatórios em girinos?

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (GM - 131805/2019-3) e (PQ/CNPq – 302328/2017-3)

Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise de Cerqueira
Rossa-Feres

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos

São José do Rio Preto
2021

R788t

Rosa, Paula Maria

Trematódeos digenéticos (Platyhelminthes: Digenea) influenciam o desempenho da alimentação e comportamentos antipredatórios em girinos? /

Paula Maria Rosa. -- São José do Rio Preto, 2021

42 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Denise de Cerqueira Rossa-Feres

Coorientador: Luciano Alves dos Anjos

1. Endoparasitos. 2. Digenea. 3. Larvas de Anfíbios. 4. Alterações Comportamentais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Paula Maria Rosa

Trematódeos digenéticos (Platyhelminthes: Digenea) influenciam o desempenho da alimentação e comportamentos antipredatórios em girinos?

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (GM - 131805/2019-3) e (PQ/CNPq – 302328/2017-3)

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Denise de Cerqueira Rossa-Feres
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fausto Nomura
UFG – Câmpus de Goiânia

Prof^a. Dr^a. Karla Magalhães Campião
UFPR – Câmpus de Curitiba

São José do Rio Preto
12 de julho de 2021

Àqueles que acreditam na ciência e que admiram os processos da natureza que me trouxeram até aqui. Que isso também possa guiar os que virão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise de Cerqueira Rossa-Feres, por toda jornada desde a minha Iniciação Científica I. Por ter inspirado todo amor, curiosidade e compromisso com a pesquisa. Agradeço imensamente por cada conversa (por vezes acompanhada de choro), cada conselho e cada sugestão. Inclusive por me apoiar nas ideias de projeto, principalmente na área experimental, que descobrimos ser bem imprevisível, mas extremamente interessante. A senhora é como uma mãe para mim, aquela pessoa que cuida, que quer saber como tudo está indo e que eu confio de olhos fechados para falar sobre qualquer assunto. Muito obrigada por ter feito parte da minha pequena carreira científica até aqui, tudo que a senhora me ensinou e fez por mim jamais será esquecido. Eu só tenho a agradecer pela oportunidade, privilégio e sorte de ser sua aluna, pois tudo que vivi não contribuiu somente para meu crescimento profissional, mas pessoal e humano, também. A senhora não é uma orientadora fácil de se encontrar, por fazer questão de ser próxima dos alunos, amiga e carinhosa em um nível que ultrapassa a relação aluno-orientador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos, que fez uma visita muito feliz a minha orientadora quando eu estava pensando no tema do meu projeto de mestrado. Agradeço por toda ajuda, desde a disponibilização dos seus alunos do laboratório para me ajudarem (e que equipe!), todo material de coleta e de laboratório necessários não só para o desenvolvimento do meu projeto, mas também para realização do meu estágio, onde pude aprender todas as técnicas e métodos adequados que empreguei no decorrer dos meus experimentos. O senhor proveu todo meu conhecimento e interesse por parasitos, quem diria?! Eu detestei essa matéria na graduação! Obrigada por todo apoio, por me receber de braços abertos e por ter me apresentado não só colaboradores, mas também amigos e pesquisadores sensacionais que passaram a fazer parte da minha vida.

Ao meu amigo e colaborador Dr. Murilo de S. Queiroz, que me acompanhou desde o início na parasitologia, me ensinou tudo na prática, desde o meu estágio no laboratório e que sempre me ajudou, mesmo a distância em todas as dúvidas que eu tive ao longo do meu mestrado. Que sorte a minha conhecer um pesquisador tão competente e disposto a colaborar comigo. Obrigada por todas as mensagens respondidas, mesmo fora do horário comercial, por todas as dicas, orientações, ideias e pelos dias que não pode se dedicar ao seu doutorado por estar me ajudando a coletar caramujos e identificar cercárias e metacercárias. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu amigo e colaborador Dr. Rodolfo Mei Pellinson, que mesmo antes de ser meu colaborador oficial já me ajudava muito com meus dados. Obrigada por ter aceitado prontamente a me orientar nas análises estatísticas, por toda paciência em me ensinar essa ciência que é tão complexa, por responder milhares de vezes a mesma pergunta e por essa didática incrível que você tem! Sem dúvidas eu estaria olhando para interface do R sem saber o que fazer até agora, se não fosse por você. Também agradeço por nunca ter me dado o peixe e por ter me ensinado a pescar. Com certeza eu amadureci muito com todos os seus ensinamentos. Obrigada também por sua amizade, por ter me dado a oportunidade em ajudar um pouquinho com a sua coleta de dados do Doutorado e pelos momentos divertidos que vivemos nos bares, churrascos da biologia e na cidade de São Paulo.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Lilian Casatti que contrubui com a minha formação desde que a conheci. Tenho nela uma grande admiração e inspiração, principalmente pelo seu pensamento crítico, por sempre defender seus ideais e por nos fazer pensar criticamente dentro do contexto histórico-social que estamos inseridos. Muito obrigada pelos comentários na minha qualificação e por toda a ajuda, seja me emprestando livros de parasito, me mandando artigos sensacionais e indicando pessoas para me avaliar. Você é fonte de força e de coragem, professora. Como diria o meu amigo João Paulo, para resolver um problema basta pensar: “O que a Lilian Casatti faria nessa situação?”.

Também agradeço a Profa. Dra. Karla M. Campião, pela contribuição direta na melhoria dessa pesquisa, por meio de todas as sugestões, críticas e pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Primeiramente agradeço por terem aceitado contribuir com esse trabalho. Vocês são pesquisadores incríveis e de grande destaque, que com certeza farão toda diferença nessa avaliação. Meus sinceros agradecimentos e admiração, Prof. Dr. Fausto Nomura e Profa. Dra. Karla M. Campião.

Primeiramente agradeço a minha mãe, dona Nelza, quem me criou e quem sempre me ensinou a observar e admirar a natureza, por todo suporte e apoio financeiro, além de ser uma grande admiradora dos meus estudos. Ao meu pai, que nem sempre presente, me levou para conhecer os lugares mais lindos do nosso país, sempre muito entusiasta da biodiversidade dos nossos biomas.

Aos meus tios, irmãos e irmãs da minha mãe, por todas as palavras de conforto e coragem sempre que eu quis desistir da graduação e voltar para casa dos meus pais.

Ao meu amigo e colega de programa de pós, Douglas Ribeiro, por todas as receitas de ração para girinos mais baratas e fáceis de fazer, por todos os dias de coleta que você participou sem pensar duas vezes, por todo material que cedeu para eu realizar os meus experimentos, por todas as discussões sobre ciência e por me receber na sua casa, junto com a Jumma, todas as vezes que eu tive que ficar mais de um dia em Ilha Solteira. Agradeço por vocês dois me apresentarem a cidade e todos os lugares bons de comer por um preço camarada, por não me deixarem com fome no jantar fazendo stroganoff e pão com ovo e por terem me recebido tão bem, como se já nos conhecêssemos há muito tempo.

Aos meus amigos de graduação e pós-graduação: André Vitor, Ariane Queiroz, Ivan F. Golfetti, Igor Noll, João Paulo S. Silva, Vitor F. Oliveira e Ynaiá Y. Marques; por todos os momentos que compartilhamos de alegria, tristeza, perrengues e por toda ajuda e suporte que vocês me deram ao longo de todos esses anos, me acompanhando nas coletas, dando ideias e soluções. Agradeço a amizade e por compartilharmos tanto. Sem a participação de vocês na minha vida, nada disso seria possível. Obrigada por segurarem a minha mão.

Às minhas amigas de casa, minhas irmãs e parceiras para todas as horas. Muito obrigada Ana Rita L. R. V. Barbas e Caroline A. de Almeida, pelos jantares e cafés da tarde, por todas as risadas e brincadeiras, por me acompanharem no médico e quando eu fiz cirurgia. Obrigada por cuidarem tão bem de mim e me fazer sentir bem, segura

e acolhida em casa, livre (nem sempre) de qualquer julgamento. Eu amo vocês demais!

Às minhas amizades de longa data, que se fizeram quando eu ainda estava na escola e que duram até hoje. Meus amigos, Luana B. Bonilha, Jhonatan Lodo e Tainá F. Lente, muito obrigada por estarem até hoje ao meu lado. Por sempre cuidarem de mim, pelos momentos mais divertidos que vivi, risadas e muito companheirismo. Agradeço tanto por terem me permitido ser amiga de vocês, tenho muita sorte. Aos meus amigos que ingressaram no mesmo ano que eu na graduação, Leonardo H. C. Longo e Vitor H. da S. da Silva, por também nunca terem me abandonado e por compartilharem tudo comigo. Agradeço também ao meu amigo Leonardo Zagui, que em pouco tempo conquistou tudo que tinha para conquistar de mim! Sou muito feliz por ter vocês na minha vida e pela consideração que temos uns pelos outros, por me darem casa e ouvidos sempre que preciso.

Agradeço meu amigo alma-gêmea Julio B. Ronchi, por me entender como ninguém mais consegue. Por toda paciência que ele tem para me explicar que eu sou extremamente passional e que a maioria das coisas que me fazem sofrer existem apenas na minha cabeça. Muito obrigada por me carregar no colo, por todos os momentos engraçados e por me deixar reclamar à vontade. Obrigada por existir e saiba que eu admiro muito sua luta e estou sempre ao seu lado, assim como você está por mim!

Por fim, agradeço minha amiga Izabella L. Tambones, por ser a maior admiradora e incentivadora do meu trabalho. Obrigada por todos os conselhos, por toda motivação para eu entrar na pós e por me ensinar tanto sobre amor em seus vários formatos. Obrigada pelo apoio em todos os momentos importantes. Eu amo você.

Aos meus colegas do laboratório, em especial a Dra. Fabiane Annibale, que sempre me socorreu em momentos de incerteza, além de ter sido minha coorientadora de Iniciação Científica II e no Trabalho de Conclusão de Curso. Também agradeço por cada ideia, sugestão e cada conversa compartilhada. Agradeço a Katiuce Pichelli, por todos os abraços, conversas e por ela ser uma fotógrafa e girinóloga excelente! Apreendi muita coisa com você, Kat. Agradeço aos técnicos Cristiano, por cuidar da coleção como ninguém e pelas sugestões que me deu quando eu precisava esterilizar os aquários; e ao Carlos, que sempre me acompanhou nas coletas de desovas e em algumas de caramujos, sempre disposto e incansável no trabalho braçal de ficar passando a peneira pesada sob sol ardente, sempre de muito bom humor.

Agradeço ao Prof. Dr. Florindo e todo o pessoal do Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados, por todas as vezes que me emprestaram material, me deram café, me contaram histórias, permitiram que eu desabafasse inúmeras vezes sobre assuntos para além dos acadêmicos e por me deixarem dormir embaixo da bancada em dias que eu tinha tanta dor de cabeça que não conseguia nem ir para a casa. O apoio de vocês em momentos de descontração foi fundamental para que eu tomasse um ar e voltasse para meus experimentos que nem sempre davam certo.

O presente trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a Paula Maria Rosa (GM - 131805/2019-3) e pela Bolsa de Pesquisa (PQ/CNPq – 302328/2017-3) a Denise de C. Rossa-Feres.

Muito obrigada a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para que essa dissertação acontecesse.

“[...] Ela não queria saber *como* uma coisa era feita, mas o *porquê*. Isso pode ser embaraçoso. Você pergunta o *porquê* de muitas coisas e, se insistir, acaba se tornando realmente muito infeliz. A coitada da garota está morta, e foi melhor para ela.”

Bradbury, Ray (2003, p. 84).

RESUMO

Girinos de anuros são hospedeiros intermediários de um grande número de espécies de trematódeos digenéticos e, portanto, um importante elo na transmissão desses parasitos para os hospedeiros terrestres. Com o objetivo de avaliar o efeito desses parasitos no comportamento de girinos desenvolvemos um estudo experimental, sob a hipótese de que as alterações comportamentais induzidas pelos parasitos poderiam facilitar a predação dos girinos pelos hospedeiros definitivos. Os parasitos *Lophosicyadiplostomum* sp. e uma espécie de Echinostomatidae foram obtidos de moluscos Planorbidae, hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos e girinos de *Physalaemus cuvieri*, obtidos de desovas coletadas em campo, foram experimentalmente infectados. Experimentos idênticos foram conduzidos para girinos infectados com cada um desses parasitos, de modo a obtermos as mesmas variáveis resposta, que quantificaram aspectos da atividade e taxa de consumo de alimento pelos girinos. Os girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. consumiram maior quantidade de alimento, apresentaram menor tempo de atividade e de deslocamento, mas não apresentaram alteração na resposta de escape a predadores. Os girinos parasitados por Echinostomatidae também apresentaram menores tempo de atividade e de deslocamento, mas seu tamanho e a velocidade de arranque na resposta de escape a predadores foram maiores. Os resultados obtidos evidenciam que os dois parasitos alteraram o comportamento dos girinos e, apesar de causarem alterações similares no tempo de atividade e no número de deslocamentos efetuados pelos girinos, provavelmente possuem estratégias diferentes de transmissão para o hospedeiro definitivo.

Palavras-chave: Endoparasitos; Digenea; Larvas de Anfíbios; Alterações Comportamentais.

ABSTRACT

Tadpoles are intermediate hosts of a great number of digenetic trematodes and an important link between these parasites and their terrestrial final hosts. Aiming at assessing the effect of parasites on tadpole behavior, we conducted experiments to test the hypothesis that the behavioral changes induced by parasites could facilitate the predation of tadpoles by their definitive hosts. The parasites of *Lophosicyadiplostomum* sp. and Echinostomatidae family were obtained from Planorbid gastropods, which are intermediate hosts of digenetic trematodes. Tadpoles of *Physalaemus cuvieri* were obtained from foam nests collected at temporary ponds and tadpoles hatched in the laboratory. We conducted two experiments in order to quantify different aspects of activity and consumption rates for both parasite types. Tadpoles infected by *Lophosicyadiplostomum* sp. consumed a larger amount of food, exhibited lower activity time, a lower number of movements, and exhibited no alteration in their scape response to predators. On the other hand, tadpoles with cists of Echinostomatidae, although exhibiting similar patterns of activity time and number of movements, exhibited higher body length and starting speed (cm/s) when scaping from predation. Our results emphasize that both parasites altered the behavior of tadpoles and, despite causing similar changes in activity time and number of movements, they probably differ in transmission strategies to their final host.

Keywords: Endoparasites; Digenea; Amphibian Larvae; Behavior Modifications.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A - Parte do córrego que dá origem a uma poça onde parte da coleta foi realizada; e B – Desova em espuma obtida na coleta.....	17
Figura 2 – A – Parte da lagoa temporária formada pelo Córrego da Véstia, local de coleta dos caramujos; e B – Amostra de um exemplar (<i>Drepanotrema lucidum</i>) obtido nas coletas.....	18
Figura 3 – Dois tipos cercarianos utilizados nas infecções experimentais. A - tipo Distoma Longifurcada Faringeada e B - tipo Equinostoma.....	19
Figura 4 – A: metacercária de <i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.; B: cistos de Echinostomatidae sob a pele dos girinos; e C: um cisto que foi retirado da cauda.....	22
Figura 5 – (A) Tempo de atividade (em segundos) nos períodos dia e noite (B); número de deslocamentos nos períodos do dia e da noite; (C) proporção de alimento consumido por; e (D) tamanho (em centímetros) dos girinos infectados por <i>Lophosicyadiplostomum</i> sp. (parasitado) e girinos não infectados (não parasitado).....	27
Figura 6 – Relação da carga parasitária de cercárias de <i>Lophosicyadiplostomum</i> sp. na atividade dos girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> . (A) Tempo de atividade (em segundos) e (B) número de deslocamentos.....	28
Figura 7 – (A) Tempo de atividade (em segundos) nos períodos do dia e da noite (B); número de deslocamentos nos períodos do dia e da noite (C); proporção de alimento consumido (D) e tamanho ao final do experimento dos girinos (em centímetros) infectados por Echinostomatidae (parasitado) e girinos não infectados (não parasitado).....	29
Figura 8 – Relação da carga parasitária de cistos da família Echinostomatidae na atividade dos girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> . (A) Tempo de atividade (em segundos) e (B) número de deslocamentos.....	29
Figura 9 – Desempenho na natação de arranque em girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> infectados por trematódeos da família Echinostomatidae (parasitados) e não infectados.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	METODOLOGIA.....	17
2.1	Espécies.....	17
2.2	Delineamento experimental.....	19
2.2.1	Experimento 1 – Influência do parasito no comportamento dos girinos.....	20
2.2.2	Experimento 2 – Influência do parasito na natação de escape dos girinos..	21
2.3	Análises estatísticas.....	22
3	RESULTADOS.....	25
3.1	Influência do parasito no comportamento dos girinos.....	26
3.2	Influência do parasito na natação de escape dos girinos.....	30
4	DISCUSSÃO.....	32
5	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os Digenea compõem uma das duas subclasses de Trematoda, que, por sua vez, junto com as classes Cestoda e Monogenea, formam o clado Neordermata, dentro do filo Platyhelminthes (OLSON *et al.*, 2003). Nas três classes citadas, todas as formas de vida são parasíticas (JOHNSON; LUNDE, 2005), embora Digenea seja a subclasse que apresente indivíduos com o ciclo de vida mais complexo dentre esses clados, além de representar o maior grupo de metazoários endoparasitos (CRIBB *et al.*, 2003; OLSON *et al.*, 2003). Eles possuem, obrigatoriamente, um hospedeiro intermediário e um definitivo, mas seu ciclo pode incluir até quatro hospedeiros intermediários diferentes, que infectam o hospedeiro das mais variadas formas (ESCH; BARGER; FELLIS, 2002; OLSON *et al.*, 2003; TRAVASSOS, 1950). Geralmente é no segundo hospedeiro intermediário (e.g. larvas de insetos, anelídeos, girinos e peixes) que são formadas as metacercárias, formas que são transmitidas ao hospedeiro definitivo (PINTO; DE MELO, 2013). Parasitos que possuem um segundo hospedeiro intermediário apresentam maior sucesso de infecção e conclusão do ciclo reprodutivo quando o hospedeiro intermediário é ingerido pelo definitivo, já que o encistamento direto no hospedeiro definitivo frequentemente é eliminado pela resposta imune do hospedeiro (ORLOFSKE, SARAH A. *et al.*, 2012).

As metacercárias de platelmintos digenéticos são agentes causadores de malformações nos membros e de altos índices de mortalidade em adultos e larvas de anfíbios, tanto em condições naturais quanto experimentais (GOODMAN; JOHNSON, 2011; JOHNSON; LUNDE, 2005; SCHOTTHOEFER; COLE; BEASLEY, 2003). Aumenta o interesse por esse grupo de parasitos, o fato dos anfíbios representarem o grupo de vertebrados mais ameaçado na atualidade, com declínio mundial documentado há pelo menos 30 anos (CAMPBELL GRANT; MILLER; MUTHS, 2020; GREEN *et al.*, 2020).

Estudos que investigaram os efeitos da interação parasitos digenéticos e girinos avaliaram principalmente estratégias antiparasitas e/ou efeitos do parasito na resposta de escape de predadores. Koprivnikar *et al.* (2006) demonstraram que girinos *Lithobates clamitans* e *L. sylvaticus* tiveram o nível de atividade, determinado pela porcentagem de tempo que os girinos permaneceram nadando, aumentado na presença de cercarias de *Echinostoma trivolvis*, o que foi interpretado pelos autores como uma forma de evitar o contágio. Em acordo com esse resultado, girinos de *L.*

sylvaticus considerados mais ativos e que exploraram mais o ambiente foram menos susceptíveis ao contágio por *Echinoparyphium* sp. (KOPRIVNIKAR; GIBSON; REDFERN, 2012). Além disso, a queda na temperatura da água, que reduz a atividade dos girinos, provocada pelos pesquisadores nesse trabalho, levou a um aumento na prevalência de parasitos (KOPRIVNIKAR; FORBES; BAKER, 2006; SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012). Dois outros estudos reforçam esses resultados. Girinos de *Pseudacris regilla* anestesiados, portanto incapazes de se deslocar, tiveram aumento de 20 a 39% na chance de serem infectados por parasitos dos gêneros *Ribeiroia* e *Echinostoma* (DALY; JOHNSON, 2011); e por meio da análise de vídeos (ROHR et al., 2009) demonstraram que girinos podem evitar cercárias livres e caramujos que estão emitindo cercárias de *Echinostoma trivolvis*, se distanciando desses organismos.

Quando combinada com a presença de predadores, a influência de parasitos digenéticos difere conforme a espécie de hospedeiro. Girinos de *L. sylvaticus* reduziram o tempo de natação na presença do parasito *E. trivolvis* e do predador *Lepomis gibbosus*, enquanto os girinos de *L. catesbeianus* aumentaram os níveis de atividade (SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012). Os girinos que apresentaram menor taxa de atividade tiveram carga parasitária mais elevada em comparação com os de *L. catesbeianus* que apresentaram maior taxa de atividade, sendo que nem todos os girinos foram infectados (SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012). Resultado semelhante foi obtido por Thiemann et. al. (2000) em experimento que evidenciou que a resposta a presença de parasitos e predadores difere entre girinos de espécies diferentes. Girinos de *L. sylvaticus* apresentaram maior redução na atividade, enquanto os de *L. clamitans*, embora tenham também reduzido a atividade na presença de parasitos e predadores separadamente, não manifestaram redução significativa no além da já observada no tratamento combinado. Como resultado, o número de parasitos encistados em girinos de *L. sylvaticus* não diferiu entre o grupo exposto apenas aos parasitos e o grupo exposto a uma combinação de parasitos e predadores, ao passo que os girinos de *L. clamitans* do grupo exposto a parasitos e predadores combinados, quando a redução da sua atividade não foi significativa, tiveram um aumento de 16% no número de cistos (THIEMANN; WASSERSUG, 2000). Entretanto, o aumento na atividade, que pode evitar ou diminuir a infecção pelo parasito, pode atrair a atenção de predadores (BAKER; SMITH, 1997), já que cessar o deslocamento e permanecer

imóvel é uma conhecida estratégia antipredatória (HEYER; MCDIARMID; WEIGMANN, 1975; NOMURA *et al.*, 2013; WATKINS, 1996).

Diversos experimentos (SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012; THIEMANN; WASSERSUG, 2000) indicam ainda que as respostas dos girinos ao parasitismo podem ser espécie-específicas. Por exemplo, a presença de metacercárias de *Echinoparyphium* no ambiente levou a um aumento nos níveis de atividade de girinos de três espécies (*Anaxyrus americanus*, *Lithobates sylvaticus* e *L. catesbeianus*), enquanto uma redução na atividade foi observada em duas outras espécies, *L. pipiens* e *Hyla versicolor* (KOPRIVNIKAR; REDFERN; MAZIER, 2013). Esse resultado indica que a reação a presença de parasitos não segue um padrão, uma vez que as espécies diferem em vulnerabilidade e em mecanismos de defesa (BELDEN; WOJDAK, 2011; KOPRIVNIKAR; REDFERN; MAZIER, 2013). Aspectos da história de vida, como o tempo que os girinos demoram para completar a metamorfose, podem influenciar as estratégias comportamentais ou imunológicas contra patógenos, dependendo da espécie em questão (KOPRIVNIKAR; REDFERN; MAZIER, 2013).

Nesse contexto, estratégias imunológicas mais elaboradas foram observadas em girinos que levam mais tempo para completar a metamorfose, enquanto que estratégias comportamentais foram predominantes em girinos com período de desenvolvimento mais curto, embora isso não seja uma regra (KOPRIVNIKAR; REDFERN; MAZIER, 2013; SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012). Entretanto, essa não é uma relação unidirecional, pois uma intensa infecção por *Echinostoma trivolvis* foi responsável pela redução no crescimento e atraso no desenvolvimento de girinos de *L. sylvaticus* (ORLOFSKE, S. A.; BELDEN; HOPKINS, 2013). Esse efeito se deu, provavelmente, por alteração na fisiologia dos indivíduos parasitados, embora não tenha sido observada mudança na taxa metabólica, determinada pela taxa metabólica padrão, obtida por meio de respirometria (ORLOFSKE, S. A.; BELDEN; HOPKINS, 2013). Os autores sugerem que o desenvolvimento tenha sido retardado em razão da interferência dos cistos no desenvolvimento dos rins, inferindo que, no ambiente natural, esse atraso estenderia o tempo de exposição do hospedeiro a mais patógenos e outras ameaças (ORLOFSKE, S. A.; BELDEN; HOPKINS, 2013; RAFFEL *et al.*, 2010).

É importante considerar que esses estudos foram desenvolvidos majoritariamente com espécies de parasitos e de girinos de regiões temperadas, que possuem aspectos de história de vida diferentes e estão submetidos a condições climáticas diferentes

das de regiões tropicais e subtropicais (KEARNEY; PORTER, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2010). Por exemplo, em regiões temperadas, Echinostomatidae (MARINO; HOLLAND; MAHER, 2014), tem como sítio de encistamento os rins dos girinos (MARINO; HOLLAND; MAHER, 2014), enquanto que em regiões tropicais, parasitos dessa mesma família encistam na região subcutânea da cauda (HAMANN; GONZÁLEZ, 2009).

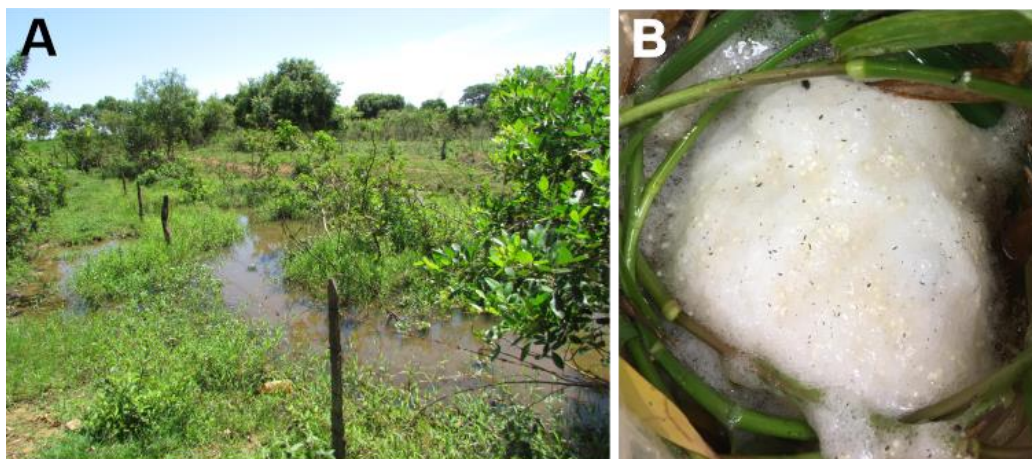
O ciclo de vida dos trematódeos digenéticos parasitos de girinos no Brasil é muito pouco conhecido, bem como seu efeito sobre o comportamento e desenvolvimento dos girinos (QUEIROZ, MURILO S. *et al.*, 2020; TRAVASSOS, 1950). Sabe-se que eles possuem uma grande variedade de hospedeiros intermediários, desde invertebrados a vertebrados ectotérmicos, bem como de hospedeiros definitivos, que envolvem qualquer grupo de vertebrado (ESCH; BARGER; FELLIS, 2002). Nesse estudo, investigamos experimentalmente se trematódeos digenéticos levam a alterações comportamentais em girinos, especificamente no nível de atividade, eficiência de forrageamento e na natação de escape à predadores. Alterações nesses comportamentos são comumente associadas ao que se conhece como estratégias de transmissão trófica, conceito designado para parasitos que causam alterações comportamentais complexas no hospedeiro intermediário, como o aumento na exposição e a redução do nível de alerta do indivíduo, que parecem facilitar sua predação pelo hospedeiro definitivo (KURIS, 2003).

2. METODOLOGIA

2.1. Espécies

Girinos de *Physalaemus cuvieri* foram obtidos de cinco desovas coletadas em diferentes corpos d'água temporários no distrito de Nova Itapirema, SP (21°04'41.7"S 49°32'25.5"W). Cada desova foi acomodada em um recipiente plástico com água sem cloro e oxigenada por uma bomba compressora para aquários. As desovas e os girinos que emergiram delas foram mantidos a temperatura ambiente de 28°C ± 1°C e fotoperíodo controlado (12h de claro e 12h de escuro). Girinos de desovas coletadas em diferentes corpos d'água garantem maior variabilidade genética para os experimentos (SZUROCZKI; RICHARDSON, 2012) e, além disso, é garantida a ausência de infecção parasitológica prévia, uma vez que os ovos se desenvolveram em um ambiente controlado (SCHOTTHOEFER *et al.*, 2003). Os girinos foram alimentados com ração em pó a base de algas e krill (Sera Micron®) duas vezes ao dia, até alcançarem o estágio de desenvolvimento 30 (GOSNER, 1960), que é a fase com menor taxa de mortalidade a infecção por parasitos trematódeos (SCHOTTHOEFER; COLE; BEASLEY, 2003).

Figura 1. A - Parte do córrego que dá origem a uma poça onde parte da coleta foi realizada; B – Desova de *Physalaemus cuvieri*.

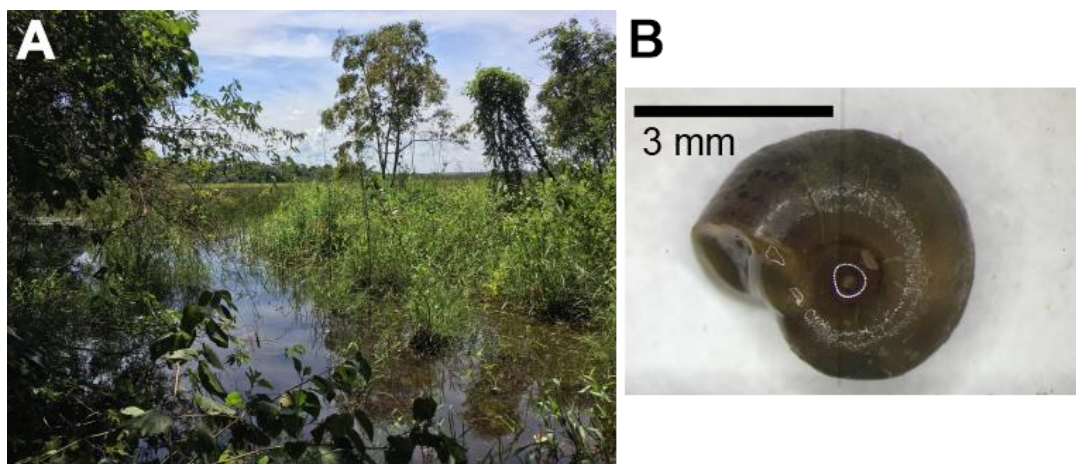


Fonte: elaborado pela autora.

Gastrópodes da família Planorbidae, *Drepanotrema lucidum* (Pfeiffer, 1839) e *Drepanotrema depressissimum* (Moricand, 1839), conhecidos hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos (PINTO; DE MELO, 2013), foram coletados em corpos d'água temporários em um fragmento de cerrado localizado na mata ripária

do Córrego da Véstia (-20.387000 -51.411700; - 20.395400 -51.394400), em Selvíria, MS. Os gastrópodes foram individualizados em placas de cultura de células de 24 poços com água potável e expostos por 12h à iluminação incandescente de 60W. Esse procedimento estimula a emergência das cercárias dos gastrópodes permitindo, assim, a confirmação visual da presença dos parasitos em microscópio estereoscópio (BRASIL, 2008).

Figura 2. A – Parte da lagoa temporária formada pelo Córrego da Véstia, local de coleta dos caramujos; B – Exemplar de *Drepanotrema lucidum* obtido nas coletas.

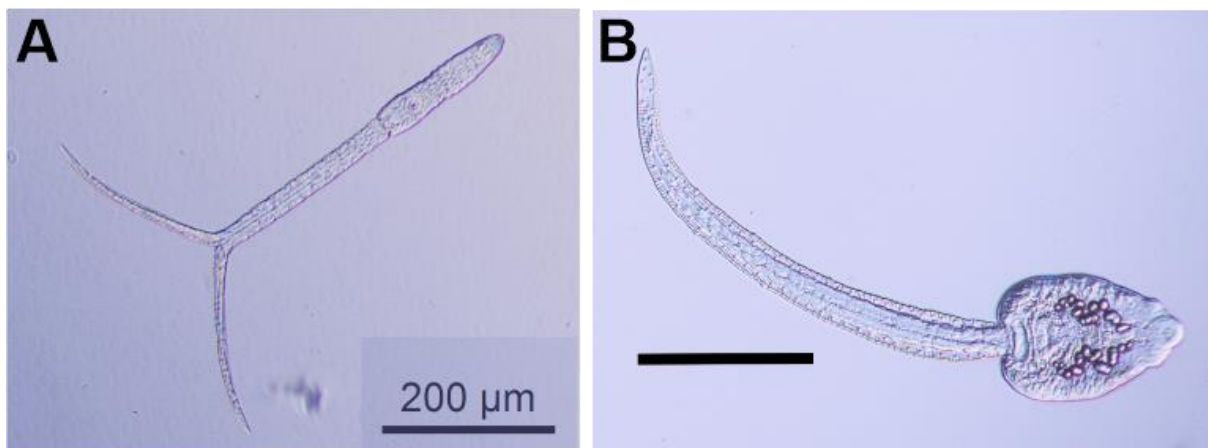


Fonte: elaborado pela autora.

Os tipos de cercária emitidas pelos caramujos foram identificadas sob microscópio de luz, em lâminas preparadas a fresco empregando corante vital vermelho neutro e sulfato azul do Nilo. Esses corantes permitem a visualização de estruturas diagnósticas das cercárias como, por exemplo, tronco caudal estreito (distoma brevifurcada faringeada) ou largo (distoma brevifurcada faringeada com tronco caudal largo) com faringe presente, e ventosa ventral desenvolvida (distoma longifurcada faringeada) ou vestigial (monostoma longifurcada faringeada) com um ou dois pares de ductos excretorios coletores (PINTO; DE MELO, 2013). Além da identificação do tipo morfológico de cercária, essa técnica permitiu que identificássemos se as cercárias tem comportamento de infecção ativa ou passiva. Dos gastrópodes coletados emergiram dois tipos de cercárias, ambas com comportamento de infecção ativa: *Lophosicyadiplostomum* sp., do tipo distoma longifurcada faringeada (Figura 2), que origina metacercárias nos rins dos girinos infectados (PINTO; DE MELO, 2013; QUEIROZ, MURILO S. et al., 2020) e têm aves como hospedeiro definitivo (CHAPPELL, 1995; FERNANDES et al., 2015; QUEIROZ, MURILO S. et al., 2020); e

uma espécie da família Echinostomatidae, do tipo equinostoma (Figura 2), que encista na região entre a pele e a musculatura da cauda dos girinos e têm diferentes classes de vertebrados como hospedeiro definitivo (FERNANDES *et al.*, 2015; PINTO; DE MELO, 2013).

Figura 3. Dois tipos cercarianos utilizados nas infecções experimentais. A - *Distoma Longifurcata* Faringeada; B - *Equinostoma*.



Fonte: Murilo de Souza Queiroz (2018).

2.2. Delineamento experimental

Foram desenvolvidos dois experimentos com os objetivos de (i) avaliar a influência dos parasitos trematódeos no comportamento dos girinos, incluindo o nível de atividade, uso da coluna d'água e eficiência de alimentação, e (ii) quantificar o comportamento de fuga à predadores, por meio da natação de escape.

Para a infecção experimental os girinos provenientes das cinco desovas obtidas em campo foram acomodados em um mesmo aquário, formando os grupos experimentais. A fim de manter o maior controle de variáveis possível, selecionamos girinos com tamanho e peso semelhantes que constituíram um grupo controle, aqui identificado como “não parasitado” e um grupo tratamento, identificado como parasitado; para cada experimento. Cada grupo foi formado com 15 girinos que foram acondicionados em aquários (30x22x7 cm) com 3 cm de água por um período de 30h (HAAS, 2003). Aos aquários dos grupos experimentais foram adicionados os gastrópodes hospedeiros, cuja infecção havia sido previamente confirmada. Das centenas de gastrópodes coletados, apenas um estava infectado por cercárias de *Lophosicyadiplostomum* sp. e três por cercárias de Echinostomatidae. Dessa forma, 15 girinos foram acondicionados com o gastrópode infectado por cercárias de

Lophosicyadiplostomum sp. e 15 com os três gastrópodes infectados por cercárias de Echinostomatidae.

Apesar dos gastrópodes não terem sido coletados na mesma localidade que as desovas, há registro da presença de indivíduos adultos e girinos de *Physalaemus cuvieri* na mata ripária e nos corpos d'água temporários formados pelo córrego da Véstia (QUEIROZ, MURILO S. *et al.*, 2020). A coleta dos girinos foi feita com permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio #18163-1 para Denise C. Rossa-Feres). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP, Campus de São José do Rio Preto (205/2019-CEUA).

2.2.1. Experimento 1 – Influência do parasito no comportamento dos girinos

Após 30h de permanência com os gastrópodes infectados, os girinos foram acondicionados individualmente em aquários (dimensões 20x10x30 cm) com 15 cm de água, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo anteriormente citadas. Os indivíduos foram filmados duas vezes ao dia (9h e 19h, períodos em que os girinos estão mais ativos; DCRF, com. pess.) por dois dias, durante 5 minutos em cada período. A câmera filmadora (câmera SONY® HDR-XR160) foi posicionada em frente a cada quatro aquários, a 60 cm de distância, com altura regulada por tripé.

Com base nos vídeos obtidos e utilizando um software de marcação de tempo (CTA – contador de tempo de atividade – desenvolvido especialmente para a marcação de tempo deste trabalho, por um cientista da computação), determinamos o tempo de atividade do indivíduo, ou seja, a porcentagem de tempo que ele se deslocou pelo aquário, o número de vezes que ele se deslocou e a posição ocupada na coluna d'água (superfície ou fundo) na maior parte do período de 5 minutos de filmagem. A seleção dessas variáveis resposta levou em consideração a avaliação se a possível influência dos parasitos no comportamento dos girinos: (i) facilitaria sua predação pelos hospedeiros definitivos dos parasitos trematódeos digenéticos testados, seja deixando-os mais visíveis por permanecerem mais tempo nadando ou por visitarem maior número de vezes a superfície da coluna d'água, ou (ii) mais fáceis de serem capturados pelos predadores hospedeiros definitivos por prejuízos na natação de escape a tentativa de predação. Essas alterações comportamentais já foram relatadas como facilitadores potenciais de predação (KURIS, 2004).

Para avaliar a influência do parasito na taxa de consumo de alimento, os girinos foram alimentados com uma solução de água e ração à base de algas e krill (Sera Micron®; em concentração de 40mg/ml), oferecida em porções de 2,5 ml pinceladas em placas de vidro (15x7,5 cm) uma vez ao dia, seguindo metodologia adaptada de Annibale *et al.* (2019), sempre no intervalo entre os períodos de filmagem. Após a alimentação, as placas de alimento foram retiradas dos aquários e deixadas para secar naturalmente. As placas foram então fotografadas e as imagens foram analisadas no software ImageJ® (HARTIG, SEAN M., 2013) para quantificar a proporção de alimento removido da área da placa de vidro, obtendo assim a taxa de consumo para cada girino. Essa variável resposta teve como objetivo avaliar se a infecção pelos trematódeos digenéticos testados reduz ou aumenta a taxa de consumo, já que os parasitos frequentemente induzem processos nos hospedeiros que são energeticamente custosos (ROBAR; MURRAY; BURNES, 2011).

2.2.2. Experimento 2 – Influência do parasito na natação de escape dos girinos

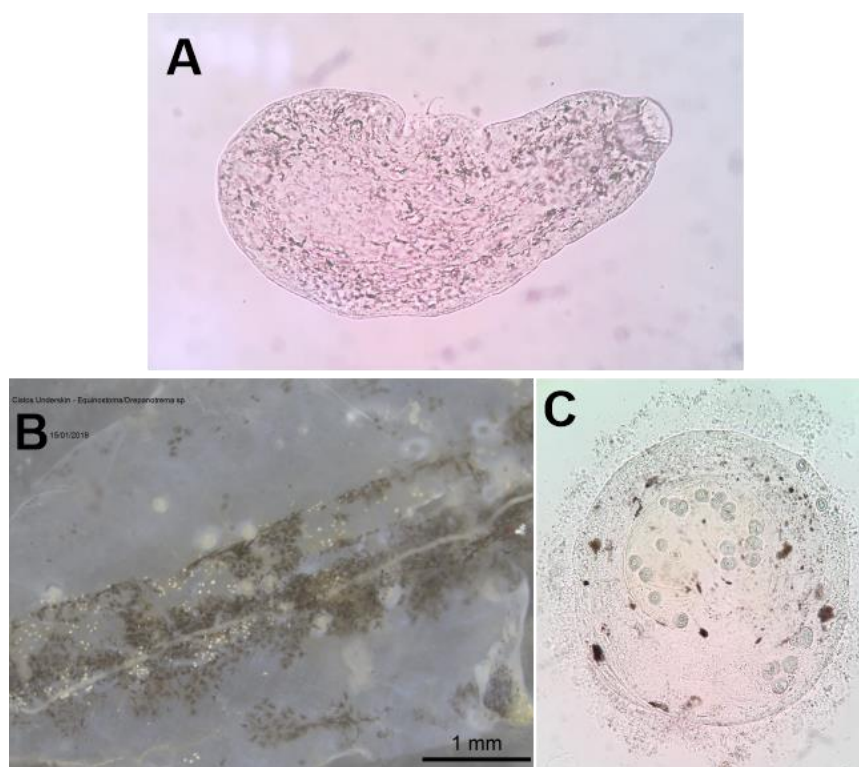
Na sequência ao experimento 1, cada girino foi submetido ao teste de resposta de escape à simulação de predação, de acordo com a metodologia adaptada da descrita por Bridges (1997). Cada indivíduo foi submetido a três tentativas de predação, simuladas por toque leve na região caudal do girino com uma haste de metal, com intervalo de 1 minuto entre cada estímulo (DAYTON *et al.*, 2005; EGEE-SERRANO; TEJEDO, 2014). O experimento foi desenvolvido em um estreito canal de natação de vidro (50x2x5 cm) preenchido com água a uma profundidade de 1 cm, adaptado ao tamanho dos girinos a fim de limitar suas respostas a um espaço bidimensional (EGEE-SERRANO; TEJEDO, 2014). O registro em vídeo foi obtido com a mesma câmera empregada no experimento anterior (SONY® HDR-XR160).

Com base nos vídeos obtidos, quantificamos: (i) a natação de arranque (*burst speed*), que é a distância percorrida desde o primeiro movimento após o toque da haste até a natação subsequente no decorrer de 0,20s (cm/s); (ii) a distância total percorrida (cm); e o tempo (s) decorrido desde o início da fuga até a cessação total dos movimentos da cauda (BRIDGES, 1997; EGEE-SERRANO; TEJEDO, 2014; WILSON; JAMES; JOHNSTON, 2000). Para isso, empregamos o software de rastreamento visual Kinovea®.

Ao final do experimento, os girinos foram fotografados para determinar o comprimento e a largura do músculo da cauda no momento da realização dos testes.

Essas variáveis foram controladas nas análises estatísticas por poderem influenciar diretamente o desempenho de natação dos girinos (DAYTON *et al.*, 2005; WILSON; JAMES; JOHNSTON, 2000). As fotos obtidas também possibilitaram medir o comprimento total dos girinos, para avaliar se o consumo interferiu nessa variável ao final do experimento (AUDO *et al.*, 1995). Depois dos testes, os girinos foram anestesiados em solução de lidocaína 2%. Uma vez cessado os batimentos cardíacos, cada girino passou por necropsia para contagem da carga parasitária e para garantir que, de fato, o grupo não parasitado não possuía infecção parasitológica prévia (Figura 3).

Figura 4. A: metacercária de *Lophosicyadiplostomum* sp.; B: cistos de Echinostomatidae sob a pele dos girinos; C: um cisto que foi retirado da cauda.



Fonte: Murilo Queiroz (imagem B) e elaboração própria (imagens A e C, obtida em microscópio de luz – aumento de 100x).

2.3. Análises estatísticas

Inicialmente, realizamos análises estatísticas descritivas para quantificar a infecção parasitológica, tomando como base o artigo de Bush *et al.* (1997). Para isso, calculamos a prevalência da infecção, que é o número de indivíduos parasitados pelo número de indivíduos examinados; a intensidade média de infecção, que é a média

de parasitos por hospedeiro parasitado, dada pelo número total de parasitos na amostra de uma espécie dividido pelo número de indivíduos parasitados; a abundância média, calculada pelo número total de parasitos na amostra de uma espécie de hospedeiro, dividido pelo número total de indivíduos parasitados e não parasitados e, finalmente, a agregação, que, segundo Poulin (1993), indica se as infecções foram agregadas por meio do índice de discrepância, onde 0 representa nenhuma agregação e 1 a agregação máxima. Todas as análises foram executadas no software Quantitative Parasitology 3.0 (REICZIGEL; MAROZZI; FÁBIÁN I, RÓZSA, 2019).

Com os dados provenientes do experimento 1, nós primeiro avaliamos se os grupos experimentais (não parasitado e parasitado) influenciaram a (a) taxa de consumo de alimento e (b) comprimento total do girino. Em seguida, utilizando apenas os girinos parasitados, analisamos se ambas as variáveis resposta foram influenciadas pela carga parasitária de cada girino. Em ambos os casos nós utilizamos modelos lineares generalizados (GLM – *generalized linear models*).

Ainda com os dados do experimento 1, nós avaliamos se os grupos experimentais (não parasitado e parasitado), o período (9h – considerado como período do dia, e 19h – considerado como período da noite), e uma possível interação entre ambos os preditores tinham efeito sobre as seguintes variáveis resposta: (a) tempo de atividade, (b) número de deslocamentos e (c) sentido do deslocamento (vertical ou horizontal). Em seguida, utilizando apenas os girinos parasitados, avaliamos se a carga parasitária, o período, e a possível interação entre ambos tinham efeito sobre as mesmas variáveis resposta. Em ambos os casos nós utilizamos modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMM - *generalized linear mixed models*) com a identidade de cada girino como um efeito aleatório, uma vez que tínhamos observações do mesmo girino em diferentes períodos do dia.

Para análise dos dados provenientes do experimento 2 empregamos modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMM - *generalized linear mixed models*) com a identidade de cada girino como um efeito aleatório, uma vez que nossa unidade experimental foi cada tentativa de predação, e tínhamos múltiplas observações do mesmo girino. As variáveis resposta foram, (a) velocidade alcançada na natação de arranque, (b) distância total percorrida e (c) tempo total da resposta de natação. A principal variável preditora foi o grupo experimental em um primeiro momento, e a carga parasitária, considerando apenas os girinos parasitados, em um segundo

momento. Em ambos os casos utilizamos o comprimento e a largura do músculo caudal como covariáveis para controlar o possível efeito de ambas as variáveis sobre as variáveis resposta, por serem fatores que podem interferir no desempenho da natação dos girinos, principalmente na natação de arranque (DAYTON *et al.*, 2005).

Em todos os casos, selecionamos a distribuição de probabilidades que melhor se ajustou aos modelos estatísticos para cada variável resposta por meio da inspeção de visual resíduos usando o pacote DHARMA (HARTIG, FLORIAN, 2021). Dessa forma, para testar as variáveis tempo de atividade, velocidade alcançada na natação de arranque e o tempo total da resposta de natação utilizamos a distribuição Gamma inflada por zeros. A distribuição de probabilidades Gamma é comumente utilizada para descrever tempo de duração ou de ocorrência de um evento (ZUUR *et al.*, 2009). Para o número de deslocamentos a distribuição de probabilidades melhor se ajustou aos dados foi a binomial negativa, que é adequada para números positivos inteiros ou números pequenos naturais, como contagens e frequências, onde a variância aumenta de forma não linear em relação à média (*i.e.* superdispersão) (ZUUR *et al.*, 2009). Já para o sentido do deslocamento utilizamos a distribuição binomial, adequada para dados binários, como por exemplo 0 e 1 (ZUUR *et al.*, 2009). Para o consumo de alimento utilizamos a distribuição beta binomial, usado para dados que tem distribuição limitada, entre 0 e 1, por exemplo, como é o caso da porcentagem de consumo de alimento (ZUUR *et al.*, 2009). Por fim, para o comprimento total do girino e a velocidade da natação de arranque empregamos a distribuição Gaussiana que é a mais adequada para dados decimais contínuos que apresentam distribuição normal como, por exemplo, peso e tamanho (ZUUR *et al.*, 2009). Após ajustados os modelos, realizamos análises de Deviance (*i.e.* análogo à ANOVA para modelos lineares generalizados e mistos), onde obtivemos os valores de qui-quadrado, graus de liberdade e de p. As análises dos dois experimentos foram desenvolvidas no programa computacional R (2021).

3. RESULTADOS

Em decorrência de mortalidade de girinos, o número final de girinos foi 24 para os infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp., sendo 12 para cada grupo experimental, e 18 girinos, nove em cada grupo experimental para os girinos infectados por Echinostomatidae. Uma pequena taxa de mortalidade em girinos mantidos em ambientes artificiais é esperada e pode ser resultado de diversos fatores, incluindo mal desenvolvimento das estruturas orais. Entretanto, infecções por parasitos da família Echinostomatidae frequentemente reduzem a taxa de sobrevivência das larvas (MARINO; HOLLAND; MAHER, 2014) e foi nesse grupo que ocorreu a maior mortalidade.

A infecção afetou metade do total dos girinos, constituída exclusivamente por girinos do grupo parasitado, com 100% de prevalência para a infecção por ambos os parasitos trematódeos (Tab. 1). A intensidade e abundância médias foram ligeiramente maiores para o grupo infectado com *Lophosicyadiplostomum* sp., o que indica que apenas um caramujo infectado foi capaz de liberar mais cercárias dessa espécie do que três caramujos infectados pelo parasito da família Echinostomatidae no mesmo período de tempo. Por fim, vimos que a agregação também foi maior para o grupo infectado por *Lophosicyadiplostomum* sp. (Tab. 1), indicando que as metacercárias infectaram em grande proporção poucos girinos dentro da amostra, uma vez que 3 deles continham 17 ou mais metacercárias, enquanto nos demais o número de metacercárias variou de 2 a 10 por girino. A agregação foi ligeiramente menor para os girinos infectados por Echinostomatidae, dado que apenas 3 dos 9 girinos do grupo parasitado continham 15 ou mais metacercárias encistadas na cauda, enquanto os demais continham entre 3 e 9 cistos (Tab. 1).

Tabela 1. Análises descritivas da infecção por trematódeos digenéticos em girinos de *Physalaemus cuvieri*. As siglas significam: (P) para prevalência; (IMI) intensidade média de infecção; (A) para abundância; e (D) para discrepância.

Parasito	P	IMI	A	D
<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.	50%	12,67	6,33	0,72
Echinostomatidae	50%	9,89	4,94	0,68

Fonte: elaborado pela autora.

3.1. Influência do parasito no comportamento dos girinos

O tempo de atividade dos girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. foi influenciado pelo período do dia (Tabela 2, Fig. 5A) e houve interação entre o período do dia e os grupos parasitados e não parasitados (Tabela 2, Fig. 5A). De forma geral, os girinos foram mais ativos durante o dia. No entanto, durante o dia, os girinos não parasitados permaneceram ativos por maior período de tempo do que os parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. Essa diferença não ocorreu durante a noite (Fig. 5A).

Tabela 2. Variáveis resposta, preditoras e os valores de Qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (df) e o valor de p (p-valor) para os dois parasitos que empregamos na realização dos experimentos.

Variáveis resposta	variáveis preditoras	<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.			Echinostomatidae		
		χ^2	df	p-valor	χ^2	df	p-valor
tempo de atividade (s)	tratamento	2,437	1	0,118	3,875	1	0,049*
	período	4,338	1	0,037*	9,255	1	0,002*
	tratamento*período	3,89	1	0,048*	0,146	1	0,701
	carga parasitária	6,309	1	0,012*	1,665	1	0,196
	período	0,11	1	0,739	5,021	1	0,025*
	carga parasitária*período	5,035	1	0,024*	0,762	1	0,382
número de deslocamentos	tratamento	0,378	1	0,538	4,12	1	0,042*
	período	6,681	1	0,009*	21,193	1	>0,001*
	tratamento*período	0,665	1	0,414	0,011	1	0,915
	carga parasitária	0,029	1	0,836	3,712	1	0,054**
	período	6,404	1	0,011*	14,492	1	>0,001*
	carga parasitária*período	5,757	1	0,016*	2,08	1	0,149
sentido da movimentação	tratamento	0,561	1	0,453	0,731	1	0,786
	período	0,105	1	0,745	0,848	1	0,356
	tratamento*período	1,076	1	0,299	1,38	1	0,24
	carga parasitária	0,011	1	0,916	0,885	1	0,346
	período	0,475	1	0,49	0,008	1	0,925
	carga parasitária*período	0,83	1	0,362	0	1	0,999
consumo (proporção)	tratamento	9,911	1	0,001*	2,089	1	0,148
	carga parasitária	2,927	1	0,087	0,396	1	0,529
tamanho (cm)	tratamento	0,954	1	0,328	4,227	1	0,039*
	carga parasitária	0,875	1	0,349	0,133	1	0,715

Fonte: elaborado pela autora.

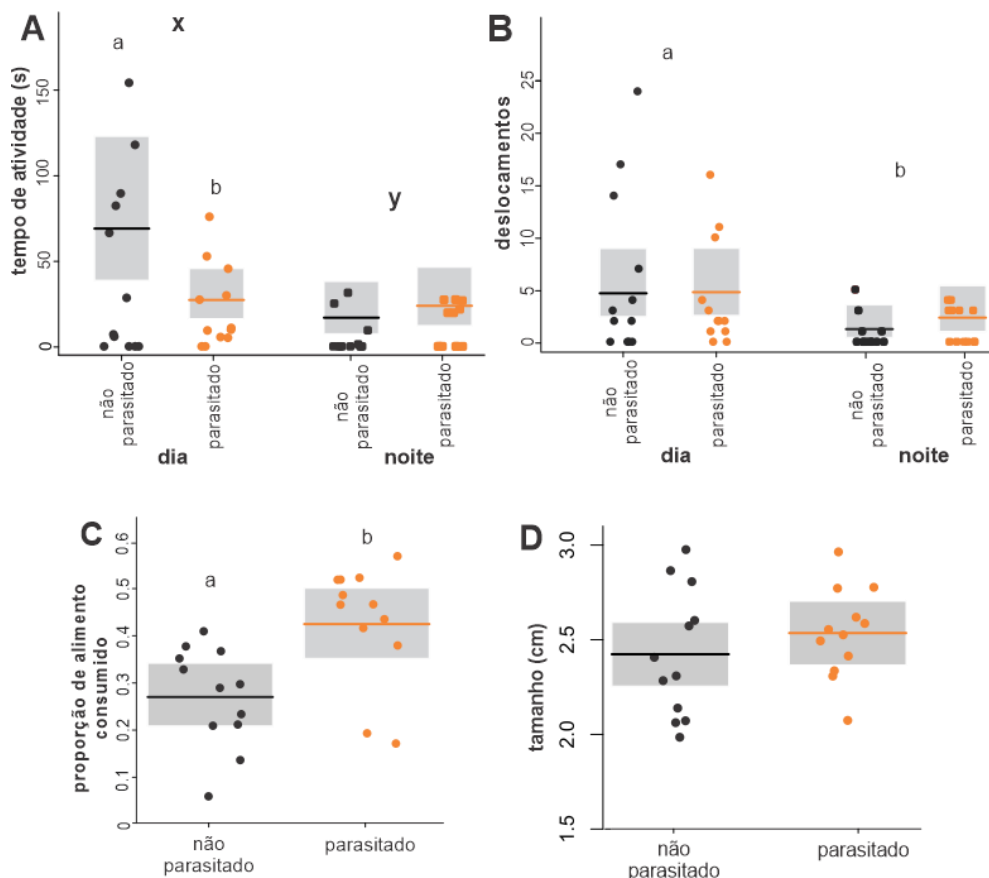
O número de deslocamentos seguiu esse mesmo padrão. De modo geral, girinos parasitados e não parasitados se deslocaram mais vezes durante o dia em comparação com o período noturno (Tabela 2, Fig. 5B). Entretanto, o número de

deslocamentos efetuados pelos girinos não foi influenciado pelo parasito (Tabela 2, Fig. 5B).

Além disso, houve interação entre a carga parasitária de *Lophosicyadiplostomum* sp. e o período do dia tanto para o tempo de atividade quanto para o número de deslocamentos (Tabela 2). Observamos que quanto maior o número de parasitos menor o tempo de atividade dos girinos, porém, apenas durante o dia (Fig. 6A). De forma similar, observamos que o número de deslocamentos é maior durante o dia, mas apenas em girinos com baixa carga parasitária (Fig. 6B).

Girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. consumiram mais alimento do que os não parasitados (Fig. 5C), mas isso não resultou em aumento do tamanho dos girinos (Tabela 2, Figura 5D).

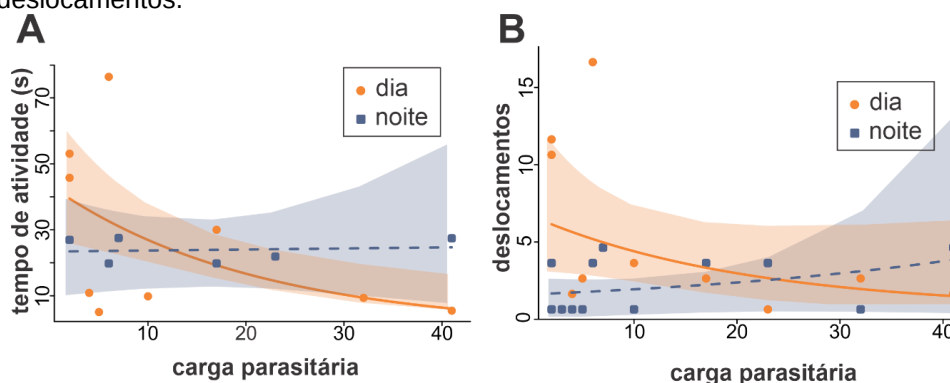
Figura 5. (A) Tempo de atividade (em segundos) nos períodos dia e noite (B); número de deslocamentos nos períodos do dia e da noite; (C) proporção de alimento consumido por; e (D) tamanho (em centímetros) dos girinos de *Physalaemus cuvieri* infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp. (parasitado) e girinos não infectados (não parasitado).



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: As letras "a" e "b" representam diferenças significativas entre girinos parasitados e não parasitados, e as letras "x" e "y" diferenças significativas entre os períodos diurno e noturno. Os limites inferiores e superiores das caixas em cinza representam o intervalo de confiança de 95% das estimativas para cada grupo (barra no centro das caixas).

Figura 6. Relação da carga parasitária de cercárias de *Lophosicyadiplostomum* sp. na atividade dos girinos de *Physalaemus cuvieri*. (A) Tempo de atividade (em segundos) e (B) número de deslocamentos.



Fonte: elaborado pela autora.

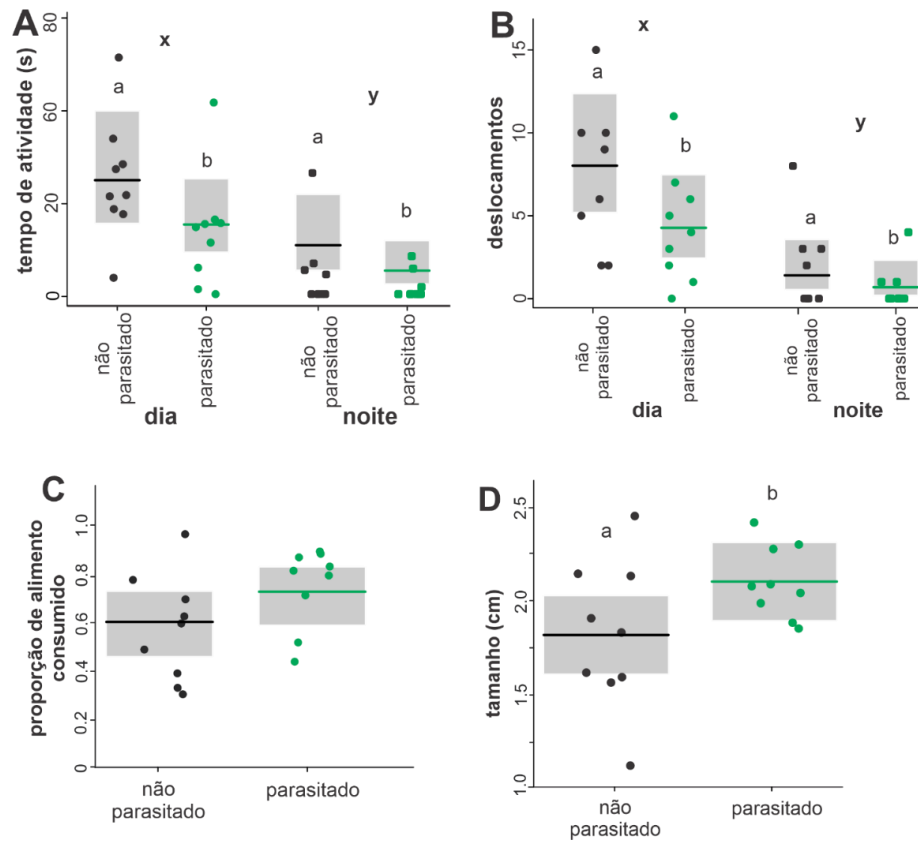
Legenda: A região sombreada por trás das curvas representa o intervalo de confiança de 95% das curvas.

Considerando a infecção por trematódeos da família Echinostomatidae, o tempo de atividade diferiu entre os girinos dos grupos parasitado e não parasitado (Tabela 2, Fig. 7A), e entre os períodos do dia (Tabela 2, Fig. 7A). O tempo de atividade dos girinos não parasitados foi maior do que os do grupo parasitado tanto no período do dia quanto a noite. No entanto, ao contrário do observado para os girinos infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp, os girinos parasitados se deslocaram por menor período de tempo que os girinos não parasitados nos dois períodos do dia, sem nenhuma interação com a carga (Tabela 2).

O número de deslocamentos efetuados pelos girinos também diferiu entre os girinos dos grupos parasitado e não parasitado (Tabela 2, Fig. 7B) e entre os períodos do dia (Tabela 2, Fig. 7B). Os girinos parasitados por Echinostomatidae se deslocaram menos que os não parasitados em ambos os períodos, sendo que à noite o número de deslocamentos efetuados pelos girinos dos dois grupos foi ainda menor que durante o dia. Considerando apenas os girinos parasitados, o número de deslocamentos foi maior durante o dia que à noite (fig. 8B), e houve influência marginalmente significativa da carga parasitária (Tabela 2), sugerindo que quanto maior a carga parasitária maior é o número de deslocamentos efetuados pelos girinos.

Girinos parasitados e não parasitados por Echinostomatidae apresentaram a mesma taxa de consumo (Tabela 2, Fig. 7C), porém diferiram no tamanho (Tabela 2, Fig. 7D), sendo que os girinos parasitados apresentaram maior tamanho.

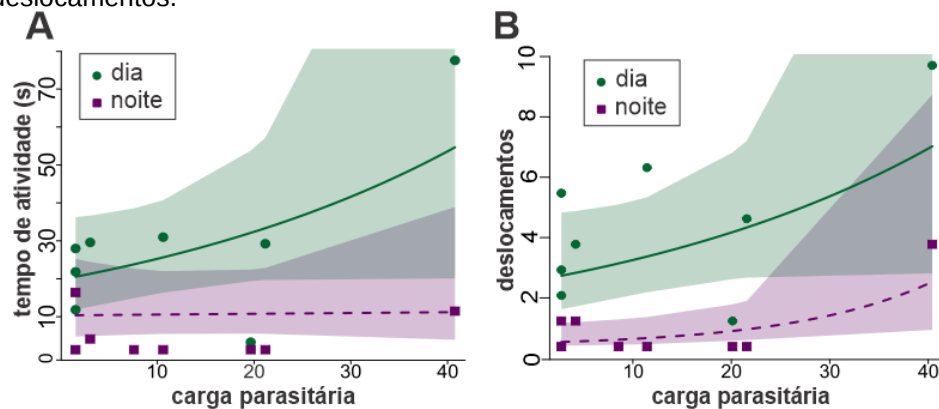
Figura 7. (A) Tempo de atividade (em segundos) nos períodos do dia e da noite (B); número de deslocamentos nos períodos do dia e da noite (C); proporção de alimento consumido (D) e tamanho (em centímetros) ao final do experimento dos girinos de *Physalaemus cuvieri* infectados por Echinostomatidae (parasitado) e girinos não infectados (não parasitado).



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: As letras “a” e “b” representam diferenças entre girinos parasitados e não parasitados, e as letras “x” e “y” entre dia e noite. Os limites inferiores e superiores das caixas em cinza representam o intervalo de confiança de 95% das estimativas para cada grupo (barra no centro das caixas).

Figura 8. Relação entre a carga parasitária de cistos da família Echinostomatidae e a atividade dos girinos de *Physalaemus cuvieri*. (A) Tempo de atividade (em segundos) e (B) número de deslocamentos.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: A região sombreada atrás das curvas representa o intervalo de confiança de 95% das curvas.

3.2. Influência do parasito na natação de escape dos girinos

Girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. não diferiram dos girinos não parasitados na natação de arranque (cm/s), no tempo de resposta (s) e na distância percorrida (cm) em resposta a simulação de tentativa de predação (Tabela 3). Além disso, não houve relação entre essas variáveis e a carga parasitária (Tabela 3). Apenas a largura do músculo caudal influenciou a resposta de arranque nos grupos parasitados e não parasitados (Tabela 3). Além disso, a natação de arranque dos girinos parasitados foi relacionada com o comprimento e com a largura do músculo da cauda (Tabela 3).

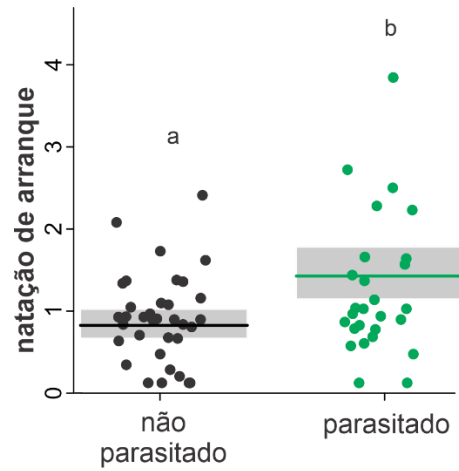
Tabela 3. Variáveis resposta, preditoras e os valores de Qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (df) e o valor de p (p-valor) para os dois parasitos que empregamos na realização do experimento 2.

variáveis resposta	variáveis preditoras	<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.			Echinostomatidae		
		χ^2	df	p-valor	χ^2	df	p-valor
arranque (cm/s)	tratamento	0,439	1	0,507	7,091	1	0,007*
	comprimento do músculo	0,967	1	0,325	0	1	0,978
	largura do músculo	4,536	1	0,033*	2,454	1	0,117
	carga parasitária	1,71	1	0,19	1,71	1	0,104
	comp. músculo	5,646	1	0,017*	5,646	1	0,168
	larg. músculo	8,97	1	0,002*	8,97	1	0,481
distância (cm)	tratamento	0,64	1	0,423	1,236	1	0,266
	comp. músculo	2,685	1	0,101	1,148	1	0,276
	larg. músculo	2,368	1	0,123	2,186	1	0,139
	carga parasitária	0,263	1	0,607	0,241	1	0,622
	comp. músculo	3,688	1	0,054**	1,235	1	0,266
	larg. músculo	2,932	1	0,086	0,055	1	0,813
tempo (s)	tratamento	1,921	1	0,165	0,033	1	0,854
	comp. músculo	1,066	1	0,301	0,409	1	0,522
	larg. músculo	0,008	1	0,972	0,123	1	0,725
	carga parasitária	0,339	1	0,559	0,077	1	0,781
	comp. músculo	0,002	1	0,957	0,007	1	0,913
	larg. músculo	0,188	1	0,664	0,039	1	0,842

Fonte: elaborado pela autora.

Os girinos parasitados por cercárias da família Echinostomatidae apresentaram melhor desempenho na natação de arranque (distância percorrida nos primeiros 20ms) quando comparados aos do grupo não parasitado (fig. 9). As demais variáveis da natação de escape não diferiram entre os girinos dos grupos parasitado e não parasitado (Tabela 3).

Figura 9. Desempenho na natação de arranque em girinos de *Physalaemus cuvieri* infectados por trematódeos da família Echinostomatidae (parasitados) e não infectados.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: As letras "a" e "b" representam diferenças significativas entre girinos parasitados e não parasitados.

4. DISCUSSÃO

A intensidade e abundância média foram maiores para os girinos de *Physalaemus cuvieri* infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp., mesmo com apenas um caramujo liberando cercárias no mesmo período de exposição. Essa variação pode ocorrer pelo tempo que o caramujo está infectado e emitindo cercarias, uma vez que quando coletados eles podem já ter passado pelo período de maior liberação ou de atividade das cercárias (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 1999).

Os dois parasitos influenciaram de modo semelhante a redução do tempo de atividade e do número de deslocamentos efetuados pelos girinos, comportamentos reconhecidos como resposta de defesa a predadores (VAN BUSKIRK *et al.*, 2011). Por outro lado, várias diferenças que podem refletir distintas estratégias de transmissão entre os dois parasitos foram observadas, como o consumo de alimento e o tamanho dos girinos.

Girinos infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp. foram menos ativos que os não parasitados em ambos os períodos do dia, mas o maior tempo de atividade dos girinos infectados ocorreu no período diurno. Parasitos podem reduzir a atividade do animal parasitado, tornando mais fácil sua captura e predação pelo hospedeiro definitivo, o que pode ser entendido como uma estratégia de transmissão (MOORE, 2002; POULIN, 2010). É importante considerar que os hospedeiros definitivos desse trematódeo são aves de hábito diurno, com eventos de predação de girinos por passeriformes foram registrados em vários estudos (MARTINS *et al.*, 2021; SILVA; GIARETTA, 2008). No Brasil há apenas o registro do bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*) como hospedeiro de *Lophosicyadiplostomum* sp. (FERNANDES *et al.*, 2015; PINTO; DE MELO, 2013). Entretanto, a diminuição da atividade dos girinos infectados, em comparação com os não infectados, provavelmente dificulta sua localização pelas aves hospedeiras definitivas de *Lophosicyadiplostomum* sp., especialmente se considerarmos a coloração críptica dos girinos de *P. cuvieri* (NOMURA *et al.*, 2013). Por outro lado, o comportamento críptico, que é a associação entre imobilidade e coloração críptica (HEYER; MCDIARMID; WEIGMANN, 1975; NOMURA *et al.*, 2013), também dificulta sua localização por outros predadores importantes de girinos, como peixes e náíades de Odonata (D'HEURSEL; HADDAD, 1999; NOMURA *et al.*, 2011). A redução da atividade e a imobilidade são conhecidas estratégias de defesa contra predação (VAN BUSKIRK *et al.*, 2011), incrementadas pela coloração críptica dos

girinos (HEYER; MCDIARMID; WEIGMANN, 1975; NOMURA *et al.*, 2013). A sobrevivência dos girinos parasitados aumenta as chances de conclusão da metamorfose, com os indivíduos metamorfoseados passando para o ambiente terrestre, onde também podem ser predados pelas aves, hospedeiros definitivos (D'HEURSEL; HADDAD, 1999; FITZPATRICK, 1980; MARTINS *et al.*, 2021).

A infecção por Echinostomatidae também alterou o padrão de atividade, deixando os girinos menos ativos em ambos os períodos do dia, mas com menor número de deslocamentos durante a noite. Esse resultado, semelhante ao obtido para os girinos testados com *Lophosicyadiplostomum* sp., pode indicar que entre os hospedeiros definitivos dessa espécie de Echinostomatidae estejam aves diurnas que se alimentam de peixes e anfíbios, porém o ciclo de vida desse parasito permanece desconhecido. Por outro lado, considerando apenas os girinos parasitados, observamos que estes foram mais ativos durante o dia.

O número de cistos de Echinostomatidae foi positivamente relacionado com o número de deslocamentos dos girinos, resultado oposto ao obtido para a infecção por *Lophosicyadiplostomum* sp. Considerando que girinos de *Physalaemus cuvieri* ocorrem na região marginal rasa dos corpos d'água (PRADO *et al.*, 2009; QUEIROZ, C. DE S.; SILVA; ROSSA-FERES, 2015), uma hipótese que pode ser aventada é que a maior mobilidade durante o dia, facilitaria sua visualização e predação por aves diurnas (D'HEURSEL; HADDAD, 1999), que localizam a presa visualmente (MARTINS *et al.*, 2021). Essa diferença na influência dos dois parasitos na atividade dos girinos pode representar estratégias diferentes de transmissão indicando que, ao contrário do sugerido anteriormente, os trematódeos digenéticos testados não compartilham o mesmo hospedeiro definitivo. A lacuna de conhecimento a respeito do ciclo de vida de trematódeos digenéticos, especialmente na região Neotropical, impossibilita definir como a influência dos parasitos no comportamento dos girinos facilita sua transmissão para o hospedeiro definitivo.

Outra diferença na influência dos dois parasitos sobre os girinos foi verificada na taxa de consumo de alimento e no crescimento dos girinos. O maior consumo de alimento pelos girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp. não levou a um maior crescimento, a despeito dos girinos gastarem menos energia pois se deslocaram menos que os girinos não parasitados. Dessa forma, esse resultado pode refletir uma maior taxa metabólica, uma vez que os parasitos utilizam recursos do hospedeiro (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007), que pode se dar pelo aumento

a taxa metabólica de repouso, criando um déficit energético (ROBAR; MURRAY; BURNES, 2011). Resultado exatamente oposto foi verificado para os girinos parasitados por Echinostomatidae, cuja taxa de consumo de alimento não diferiu, mas os girinos parasitados alcançaram maior tamanho. Além dos girinos parasitados terem sido menos ativos e, portanto, terem gasto menos energia com deslocamentos, uma outra possível explicação é que pelos cistos possuírem baixa demanda energética, já não se reproduzem, isso também não seria refletido em gasto energético (KOPRIVNIKAR *et al.*, 2019). No entanto, a relação negativa entre consumo de alimento e crescimento dos girinos parasitados por Echinostomatidae, oposta a relação positiva encontrada para os girinos parasitados por *Lophosicyadiplostomum* sp., não permite desconsiderar que o local de encistamento possa afetar o crescimento dos girinos. O fato de cercarias de *Lophosicyadiplostomum* sp. terem os rins como sítio de infecção pode produzir maior efeito no metabolismo que cistos na derme ou na musculatura dos girinos, como os de Echinostomatidae.

Considerando que o consumo de alimento não sofreu alteração, mas os girinos parasitados por Echinostomatidae cresceram mais que os não parasitados, não podemos desconsiderar a possibilidade que o maior tamanho tenha sido induzido pelo parasito, uma vez que existe uma correlação positiva entre o tamanho do hospedeiro e o tamanho dos parasitos, já que hospedeiros maiores possuem parasitos maiores, associação frequentemente ligada ao sucesso da conclusão do ciclo do parasito (MORAND *et al.*, 1996). Se isso ocorre, o parasito da família Echinostomatidae pode estar interferindo no tamanho do hospedeiro intermediário, que sendo maior pode ser mais facilmente visualizado e predado pelo hospedeiro definitivo (RODGERS; DOWNING; MORRELL, 2015). Nesse caso, essa estratégia pode ser fundamentada pela teoria de forrageamento ótimo, a qual propõe que o consumo de uma presa maior implica em um menor número de eventos de predação, o que está diretamente relacionado ao balanço entre o gasto energético para obter a presa e a quantidade de energia obtida da presa (MACARTHUR; PIANKA, 1966). Por outro lado, um maior tamanho está relacionado com maior chance de escape de predadores (GILL, 2003), o que aumenta o sucesso do girino em concluir a metamorfose (BRANNELLY *et al.*, 2019) e passar para o ambiente terrestre, onde poderá ser consumido pelo hospedeiro definitivo do parasito. Ainda, uma outra interpretação possível é que, apesar de não observarmos diferença no consumo de alimento entre os grupos experimentais, o gráfico mostra que existe uma “tendência” maior de consumo pelos girinos do grupo

parasitado. Com isso, podemos supor que o efeito do parasito sobre o consumo é fraco, uma vez que, ao longo do tempo esse efeito pode acumular e resultar no tamanho maior dos girinos. Essa é uma hipótese que precisa ser explorada futuramente, já que aqui não conseguimos demonstrar com clareza esse efeito. Adicionalmente, o maior crescimento pode acelerar o desenvolvimento e metamorfose dos girinos, o que interromperia o ciclo do parasito. Entretanto, como não foi possível identificar a espécie de Echinostomatidae, e os hospedeiros definitivos dos trematódeos dessa família incluem aves, répteis e mamíferos, não sabemos se a transmissão depende exclusivamente do meio aquático. Dessa forma, não conseguimos interpretar como essa modificação no tamanho influencia na transmissão do parasito para o hospedeiro definitivo.

Ainda, a redução no número de deslocamentos diurnos dos girinos parasitados por Echinostomatidae com o aumento da carga parasitária pode indicar uma interferência do parasito no nível de atividade dos girinos. Porém, podemos notar que essa diferença no número de deslocamentos pelos girinos parasitados por Echinostomatidae entre os períodos diurno e noturno é importante para cargas parasitárias baixas, uma vez que essa relação desaparece para cargas parasitárias altas. Isso se dá, possivelmente, pelos girinos já se moverem mais durante o dia, e cargas parasitárias baixas pouco afetam esse padrão. Por outro lado, quando a carga parasitária é alta, observamos redução na atividade do girino, sendo esse efeito mais perceptível durante o dia, que é quando ele se movimenta mais, naturalmente. Como essa movimentação é baixa a noite, a redução não é tão significativa.

Girinos parasitados por Echinostomatidae apresentaram melhor desempenho na resposta a tentativa de predação que os girinos não parasitados. Esse resultado não era esperado, pois supomos que os cistos presentes na nadadeira dos girinos poderiam prejudicar seu desempenho na natação, como registrado para *Anaxyrus boreas* e *Lithobates catesbeianus* parasitados por *Ribeiroia ondatrae*, outro trematódeo que também encista na base da cauda de seus hospedeiros, causando más-formações nos membros, além de aumentar as taxas de mortalidade em indivíduos recém-metamorfosados (JOHNSON; LUNDE, 2005; SCHOTTHOEFER *et al.*, 2003). Interessantemente, a melhor resposta na natação de arranque corrobora a teoria de que o parasito dessa família pode aumentar o sucesso da conclusão da metamorfose, já que o arranque é o principal comportamento que pode evitar a predação (BADETS; MORRISON; VERNEAU, 2010; DAYTON *et al.*, 2005).

5. CONCLUSÃO

As cercárias de ambos os parasitos diminuíram o tempo de atividade e o número de deslocamentos dos girinos de *Physalaemus cuvieri* o que, considerando sua coloração críptica, pode dificultar sua captura por aves, que são o hospedeiro definitivo de *Lophosicyadiplostomum* sp, bem como por outros predadores. Dessa forma, é possível que a transmissão para o hospedeiro definitivo ocorra pelo consumo dos anuros adultos. O hospedeiro definitivo e o ciclo de vida de Echinostomatidae permanecem desconhecidos para grande parte dos representantes dessa família na região neotropical, o que limita a interpretação dos resultados obtidos.

O aumento na taxa de consumo de alimento pelos girinos parasitados por cercárias de *Lophosicyadiplostomum* sp. não resultou em maior crescimento, contrastando com o maior tamanho observado nos girinos parasitados por cercárias de Echinostomatidae, a despeito de não ter ocorrido alteração na taxa de consumo de alimento. É possível que essa diferença resulte dos diferentes órgãos de encistamento das cercárias e/ou de diferentes estratégias de transmissão dos parasitos.

O maior tamanho dos girinos parasitados por Echinostomatidae e seu melhor desempenho na resposta de escape a simulação de predação, em comparação com os girinos infectados por *Lophosicyadiplostomum* sp., sugerem que o ciclo de vida de Echinostomatidae, sua transmissão para e as espécies de hospedeiro definitivo seja diferente dos de *Lophosicyadiplostomum* sp.

REFERÊNCIAS

- ANNIBALE, Fabiane S. *et al.* Influence of substrate orientation on tadpoles feeding efficiency. *Biology Open*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2019.
- AUDO, M. C. *et al.* Food deprivation during different periods of tadpole (*Hyla chrysoscelis*) ontogeny affects metamorphic performance differently. *Oecologia*, v. 103, n. 4, p. 518–522, 1995.
- BADETS, M.; MORRISON, C.; VERNEAU, O. Alternative parasite development in transmission strategies: How time flies! *Journal of Evolutionary Biology*, v. 23, n. 10, p. 2151–2162, 2010.
- BAKER, Robert L.; SMITH, Bruce P. Conflict between antipredator and antiparasite behaviour in larval damselflies. *Oecologia*, v. 109, n. 4, p. 622–628, 1997.
- BEGON; TOWNSEND; HARPER. *Ecologia de indivíduos a ecossistemas*. 4^a ed. [S.l.]: Artmed, 2007.
- BELDEN, Lisa K.; WOJDAK, Jeremy M. The combined influence of trematode parasites and predatory salamanders on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Oecologia*, v. 166, n. 4, p. 1077–1086, 2011.
- BRADBURY, Ray. *Fahrenheit 451*. 2. ed. São Paulo: Globo, 2003.
- BRANNELLY, Laura A. *et al.* Effects of hydroperiod on growth, development, survival and immune defences in a temperate amphibian. [S.l.: s.n.], 2019. v. 33.
- BRASIL. *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica*. 2^a ed. Brasília: [s.n.], 2008.
- BRIDGES, Christine M. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 1935–1939, 1997.
- BUSH, Albert O. *et al.* Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 4, p. 575–583, 1997.
- CAMPBELL GRANT, Evan H.; MILLER, David A.W.; MUTHS, Erin. A Synthesis of evidence of drivers of amphibian declines. *Herpetologica*, v. 76, n. 2, p. 101–107, 2020.
- CHAPPELL, L. H. The biology of diplostomatid eyeflukes of fishes. *Journal of Helminthology*, v. 69, n. 2, p. 97–101, 1995.

CRIBB, Thomas H. *et al.* Life Cycle Evolution in the Digenea: A New Perspective from Phylogeny. *Advances in Parasitology*, v. 54, p. 197–254, 2003.

D'HEURSEL, A.; HADDAD, C.F.B. Unpalatability of *Hyla semilineata* tadpoles (anura) to captive and free-ranging vertebrate predators. *Ethology Ecology and Evolution*, v. 11, n. 4, p. 339–348, 1999.

DALY, Elizabeth W.; JOHNSON, Pieter T.J. Beyond immunity: Quantifying the effects of host anti-parasite behavior on parasite transmission. *Oecologia*, v. 165, n. 4, p. 1043–1050, 2011.

DAYTON, Gage H. *et al.* Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos*, v. 111, n. 3, p. 582–591, 2005.

EGEA-SERRANO, A.; TEJEDO, M. Contrasting effects of nitrogenous pollution on fitness and swimming performance of Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), larvae in mesocosms and field enclosures. *Aquatic Toxicology*, v. 146, p. 144–153, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.003>>.

ESCH, Gerald W.; BARGER, Michael A.; FELLIS, K. Joel. The transmission of digenetic trematodes: Style, elegance, complexity. *Integrative and Comparative Biology*, v. 42, n. 2, p. 304–312, 2002.

FERNANDES, Berenice M. M. *et al.* *South American Trematodes Parasites of Birds and Mammals*. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2015.

FITZPATRICK, John W. Foraging Behavior of Neotropical Tyrant Flycatchers. *The Condor*, v. 82, n. 1, p. 43–57, 1980.

GILL, A. B. The dynamics of prey choice in fish: The importance of prey size and satiation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, n. SUPPL. A, p. 105–116, 2003.

GOODMAN, Brett A.; JOHNSON, Pieter T.J. Disease and the extended phenotype: Parasites control host performance and survival through induced changes in body plan. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2011.

GOSNER, Kenneth L. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, v. 16, n. 3, p. 183–190, 1960.

GREEN, David M. *et al.* Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. *Herpetologica*, v. 76, n. 2, p. 97–100, 2020.

HAAS, Wilfried. Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology*, v. 106, n. 4, p. 349–364, 2003.

HAMANN, M. I.; GONZÁLEZ, C. E. Larval digenetic trematodes in tadpoles of six amphibian species from northeastern Argentina. *Journal of Parasitology*, v. 95, n. 3, p. 623–628, 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1738.1>>.

HARTIG, Florian. *DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models*. . [S.l.]: R package version 0.4.1. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=DHARMA>>. , 2021

HARTIG, Sean M. Basic image analysis and manipulation in imageJ. *Current Protocols in Molecular Biology*, n. SUPPL.102, p. 1–12, 2013.

HEYER, W. Ronald; MCDIARMID, Roy W.; WEIGMANN, Diana L. Tadpoles, Predation and Pond Habitats in the Tropics. *Biotropica*, v. 7, n. 2, p. 100, 1975.

JOHNSON, Pieter Tj; LUNDE, Kevin B. Parasite infection and limb malformations : a growing problem in amphibian conservation. *Amphibian Declines: the Conservation Status of United States Species*, n. 1, p. 124–138, 2005.

KEARNEY, Michael; PORTER, Warren. Mechanistic niche modelling: Combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecology Letters*, v. 12, n. 4, p. 334–350, 2009.

KOPRIVNIKAR, Janet *et al.* Endocrine and immune responses of larval amphibians to trematode exposure. *Parasitology Research*, v. 118, n. 1, p. 275–288, 2019.

KOPRIVNIKAR, Janet; FORBES, Mark R.; BAKER, Robert L. On the efficacy of anti-parasite behaviour: A case study of tadpole susceptibility to cercariae of *Echinostoma trivolvis*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 84, n. 11, p. 1623–1629, 2006.

KOPRIVNIKAR, Janet; GIBSON, Chris H; REDFERN, Julia C. Infectious personalities: Behavioural syndromes and disease risk in larval amphibians. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 279, n. 1733, p. 1544–1550, 2012.

KOPRIVNIKAR, Janet; REDFERN, Julia C.; MAZIER, Hannah L. Variation in anti-parasite behaviour and infection among larval amphibian species. *Oecologia*, v. 174, n. 4, p. 1179–1185, 2013.

KURIS, Armand M. Evolutionary Ecology of Trophically Transmitted Parasites. *Journal of Parasitology*, v. 89, p. S96–S100, 2003.

KURIS, Armand M. Trophic transmission of parasites and host behavior modification. *Behavioural Processes*, v. 68, n. 3 SPEC. ISS., p. 215–217, 2004.

MACARTHUR, R. H.; PIANKA, E. R. On optimal use of a patchy environment. *American Naturalist*, v. 100, p. 603–609, 1966.

MARINO, John A.; HOLLAND, Manja P.; MAHER, Jessica M. Predators and trematode parasites jointly affect larval anuran functional traits and corticosterone levels. *Oikos*, v. 123, p. 451–460, 2014.

MARTINS, Ítalo Moreira *et al.* Detectability is in the eye of the beholder—the role of UV reflectance on tadpole detection and predation by a passerine bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 75, n. 3, 2021.

MOORE, Janice. *Parasites and the behaviour of animals*. [S.l: s.n.], 2002.

MORAND, Serge *et al.* Body size evolution of oxyurid (nematoda) parasites: The role of hosts. *Oecologia*, v. 107, n. 2, p. 274–282, 1996.

NOMURA, F. *et al.* Are you experienced? Predator type and predator experience trade-offs in relation to tadpole mortality rates. *Journal of Zoology*, v. 289, p. 144–150, 2011.

NOMURA, F. *et al.* Does background colouration affect the behaviour of tadpoles? An experimental approach with an odonate predator. *Ethology Ecology and Evolution*, v. 25, n. 2, p. 185–198, 2013.

OLSON, P. D. *et al.* Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 7, p. 733–755, 2003.

ORLOFSKE, S. A.; BELDEN, L. K.; HOPKINS, W. A. Larval wood frog (*Rana* [=*Lithobates*] *sylvatica*) development and physiology following infection with the trematode parasite, *Echinostoma trivolvis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 164, n. 3, p. 529–536, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.013>>.

ORLOFSKE, Sarah A. *et al.* Parasite transmission in complex communities: Predators and alternative hosts alter pathogenic infections in amphibians. *Ecology*, v. 93, n. 6, p. 1247–1253, 2012.

PINTO, Hudson A.; DE MELO, Alan Lane. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical*, v. 42, n. 4, p. 369–386, 2013. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/27922>>.

POULIN, Robert. Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. *Advances in the Study of Behavior*, v. 41, p. 151–186, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)>.

POULIN, Robert. The disparity between observed and uniform distributions: A new look at parasite aggregation. *International Journal for Parasitology*, v. 23, n. 7, p. 937–944, 1993.

PRADO, Vitor H. M. Do *et al.* Niche Occupancy and the Relative Role of Micro-Habitat and Diet in Resource Partitioning Among Pond Dwelling Tadpoles. *South American Journal of Herpetology*, v. 4, n. 3, p. 275–285, 2009.

QUEIROZ, C. de S.; SILVA, F. R.; ROSSA-FERES, D. C. The relationship between pond habitat depth and functional tadpole diversity in an agricultural landscape. *Royal Society*, v. 2, p. 150–165, 2015.

QUEIROZ, Murilo S. *et al.* Helminths of eight anuran species from a remnant riparian forest in the cerrado biome, Brazil. *Herpetology Notes*, v. 13, n. June, p. 463–478, 2020.

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. . Vienna, Austria.: Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. , 2021

RAFFEL, Thomas R. *et al.* Parasitism in a community context: Trait-mediated interactions with competition and predation. *Ecology*, v. 91, n. 7, p. 1900–1907, 2010.

REICZIGEL, J.; MAROZZI, M.; FÁBIÁN I, RÓZSA, F. I. *Biostatistics for parasitologists – a primer to Quantitative Parasitology*. . [S.l.]: Trends in Parasitology. Disponível em: <<http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>>. , 2019.

ROBAR, Nicholas; MURRAY, Dennis L.; BURNES, Gary. Effects of parasites on host energy expenditure: The resting metabolic rate stalemate. *Canadian Journal of Zoology*, v. 89, n. 11, p. 1146–1155, 2011.

RODGERS, Gwendolen M.; DOWNING, Beatrice; MORRELL, Lesley J. Prey body size mediates the predation risk associated with being “odd”. *Behavioral Ecology*, v. 26, n. 1, p. 242–246, 2015.

ROHR, Jason R. *et al.* Parasites, info-disruption, and the ecology of fear. *Oecologia*, v. 159, n. 2, p. 447–454, 2009.

SCHOTTHOEFER, Anna M. *et al.* Influence of *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection on limb development and survival of northern leopard frogs (*Rana pipiens*): effects of host stage and parasite-exposure level. *Canadian Journal of Zoology*, v. 81, p. 1144–1153, 2003. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/z03-099>>.

SCHOTTHOEFER, Anna M.; COLE, Rebecca A.; BEASLEY, Val R. Relationship of tadpole stage to location of echinostome cercariae encystment and the consequences for tadpole survival. *The Journal of parasitology*, v. 89, n. 3, p. 475–482, 2003.

SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A. Further notes on the natural history of the South American pepper frog, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 2, p. 403–407, 2008.

SZUROCZKI, Dorina; RICHARDSON, Jean M. L. The behavioral response of larval amphibians (Ranidae) to threats from predators and parasites. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 1–8, 2012.

THIEMANN, Gregory W.; WASSERSUG, Richard J. Patterns and consequences of behavioural responses to predators and parasites in *Rana* tadpoles. *Biological journal of the Linnean society*, v. 71, p. 513–528, 2000.

TOLEDO, Rafael; MUÑOZ-ANTOLI, Carla; ESTEBAN, J. Guillermo. Production and chronobiology of emergence of the cercariae of *Euparyphium albuferensis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 2, p. 263–267, 1999.

TRAVASSOS, Lauro. Introdução ao estudo da helmintologia. *Brazilian Journal of Biology*, p. 86–108, 1950.

VAN BUSKIRK, Josh *et al.* Prey risk assessment depends on conspecific density. *Oikos*, v. 120, n. 8, p. 1235–1239, 2011.

VASCONCELOS, Tiago Da Silveira *et al.* Climatic variables and altitude as predictors of anuran species richness and number of reproductive modes in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 26, n. 4, p. 423–432, 2010.

WATKINS, Timothy B. Predator-mediated selection on burst swimming performance in tadpoles of the pacific tree frog, *Pseudacris regilla*. *Physiological Zoology*, v. 69, n. 1, p. 154–167, 1996.

WILSON, R. S.; JAMES, R. S.; JOHNSTON, I. A. Thermal acclimation of locomotor performance in tadpoles and adults of the aquatic frog *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 170, n. 2, p. 117–124, 2000.

ZUUR, Alain *et al.* *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. New York, NY: Springer, 2009.