

# Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios

Microflora, skin secretions and microclimate: implications for amphibians

**Ananda Brito de Assis**

*Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*

**Resumo.** O significado das mudanças climáticas para os anfíbios, em sinergismo com outros impactos antropogênicos, está atrelado às possíveis mudanças dos microclimas nos habitats ocupados. Nesse contexto, os eventos de epidemias merecem destaque, uma vez que, é provável que as modificações no meio ambiente contribuam para a crescente disseminação de doenças. A primeira proteção dos anfíbios contra muitas doenças é a pele, junto com as suas secreções e microbiota, e são primordiais porque muitos dos agentes infecciosos envolvidos atuam nesse tecido. As principais barreiras são a microbiota residente e as secreções cutâneas, que possuem efeito antibiótico contra organismos patogênicos conhecidos. O ambiente modula as características inerentes a esses componentes, e por meio desses, mudanças nos padrões microclimáticos poderiam determinar os níveis de vulnerabilidade das populações de anfíbios aos patógenos.

**Palavras-chave.** *Anfíbios, microclima, microbiota, secreções cutâneas.*

**Abstract.** The meaning of climate change for amphibians, in synergy with other anthropogenic impacts, is linked to possible changes in the microclimate in the habitats occupied. In this context, the events of epidemics are highlighted, since it is likely that changes in the environment contribute to the increasing spread of diseases. The first protection of amphibians, against several diseases, is the skin with its associated secretions and microbiota, all of them essential because many infectious agents operate through the skin. The main barriers are the resident microflora and skin secretions, which have an antibiotic effect against pathogenic organisms known. The environment modulates the inherent characteristics of these components and at the same time, changes in climatic patterns may dictate significant changes in these components and, consequently, make amphibians more susceptible to pathogens.

**Keywords.** *Amphibians, microclimate, cutaneous microflora, skin secretions.*

A perda da biodiversidade é uma consequência dos impactos ambientais provocados pela atividade humana nas áreas naturais (Keisecker e Blaustein, 2001; Pinto e Assis, 2005; Myers e col. 2000). Individualmente, os fatores apontados são bem conhecidos, destacando-se as mudanças climáticas, o aumento da incidência de radiação ultravioleta (UV-B), a introdução de espécies exóticas, a contaminação por agentes tóxicos e o desmatamento (Blaustein e Keisecker, 2002). Adicionalmente, é provável que a ocorrência desses impactos contribua para a crescente disseminação de doenças nas populações selvagens (Lips e col., 2006), na medida em que os indivíduos tornam-se mais susceptíveis e os patógenos mais distribuídos. Isso porque, muitas vezes, alterações em variáveis físico-químicas do ambiente estão relacionadas com uma maior vulnerabilidade fisiológica dos indivíduos (Christin e col., 2004; Raffel e col., 2006).

Anfíbios são vulneráveis às mudanças no ambiente e, para estes, a ocorrência de epidemias tem sido mencionada como causa de declínio e extinção de populações (Carey e col., 1999; Schumacher, 2006). Uma maior vulnerabilidade dos anfíbios às modificações ambientais provavelmente está relacionada às características de pele, pois, sendo esse um substrato muito permeável, permite a livre passagem de elementos disponíveis no ambiente e está mais sujeito às infecções por microrganismos (Wells, 2007).

Apesar das ameaças à sobrevivência, os anfíbios possuem alguns mecanismos que lhes conferem resistência e permanência em seus habitats naturais. Esses animais contam, por exemplo, com um sofisticado sistema imune e é na pele que estão as defesas primárias contra microrganismos patogênicos (Zaslouff 2002). Essas barreiras de proteção são importantes no cenário atual porque as

Contato do autor:

ananda\_wu@yahoo.com.br

Recebido 10abr11

Aceito 28fev12

Publicado 21jun12

principais epidemias mencionadas como causas de perda de populações de anfíbios afetam esses hospedeiros por meio de infecções na pele (Mouriño e col., 2006; Carey e col., 1999). Além disso, a resposta às infecções nesse tecido mediada por células do sistema imune, neutrófilos, linfócitos e macrófagos, é fraca (Carey, 2000) o que torna ainda mais importante a presença de outros mecanismos de primeira proteção.

Além de componentes mecânicos, a proteção na pele inclui mecanismos bioquímicos e biológicos derivados tanto da secreção de moléculas bioativas a partir das glândulas dérmicas quanto da comunidade microbiana ali residente, respectivamente. Entre os mecanismos bioquímicos é conhecido o potencial antimicrobiano dos peptídeos secretados das glândulas dérmicas contra importantes patógenos como o fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (Woodhams e col., 2006). Este fungo é mencionado como uma das principais ameaças às populações selvagens de anfíbios, sendo considerado, por alguns autores, como causa de declínio e extinção de algumas populações, em diferentes regiões do mundo (Daszak e col., 2011; Lips e col., 2006; Carey, 1999).

Os mecanismos biológicos de proteção incluem a microbiota residente na pele que é composta por espécies de fungos e bactérias produtoras de antibióticos. Ensaios *in vitro* demonstram que espécies bacterianas isoladas de comunidades cutâneas de anfíbios podem apresentar ação potente contra patógenos que afetam populações selvagens de anfíbios, inclusive o fungo quitrídio acima mencionado (Harris e col., 2006; Woodhams e col., 2007; Lauer e col., 2008; Brucker, 2008).

Podemos sugerir que, com base nas discussões das seções seguintes, os atributos inerentes à pele dos anfíbios podem ser afetados pelas condições ambientais às quais os animais são expostos e de que pode haver relação entre as secreções cutâneas e o perfil de microbiota residente. Se isso de fato ocorrer, haveria então uma relação complexa na qual o ambiente pode afetar os mecanismos de proteção da pele – secreções e microbiota – e essas mudanças, por sua vez, podem afetar a susceptibilidade dos indivíduos à ação de agentes patogênicos.

### Secreções cutâneas

Fatores externos e internos parecem modular ou afetar a secreção de moléculas bioativas na pele dos anfíbios. Alguns exemplos mostram que o ambiente no qual o animal está inserido têm relação com as características das secreções dérmicas. Em pelo menos algumas espécies de anuros a dieta parece ser um fator externo essencial na modulação das secreções cutâneas. Por exemplo, a produção de Tetrodotoxina (TTX), uma potente toxina, encontrada na pele de anfíbios – quatro famílias da ordem Anura e duas famílias da ordem Caudata (Hanifin, 2010) – parece ser produzida mediante o seqüestro de moléculas da dieta desses animais, embora as relações simbióticas com micro-organismos possam ter um papel importante (Daly e col., 1996). Modificações na dieta podem estar relacionadas com variações interpopulacionais de perfis moleculares das secreções glandulares e autores

afirmam que tais variações ditam mudanças na susceptibilidade dos indivíduos ao fungo quitrídio (Woodhams e col., 2006). Poluentes podem também afetar a produção de peptídeos em anuros. Por exemplo, o inseticida comercializado como carbaril (1-naftil metilcarbamato), mimetiza o neurotransmissor norepinefrina no sistema nervoso simpático, interferindo na via de liberação de moléculas através das glândulas dérmicas, havendo, portanto uma diminuição na eficiência desse componente do sistema imune inato, o que torna os indivíduos mais susceptíveis à ação de agentes infecciosos (Davidson, 2007). De modo geral, alguns poluentes favorecem o estresse fisiológico em anuros (Christin e col., 2004) e tal condição também pode afetar a secreção cutânea, como demonstrado em uma espécie da família Ranidae. Também nessa espécie, a exposição à glicocorticóides, hormônios relacionados ao estresse, inibem a transcrição dos genes codificantes para peptídeos antimicrobianos (Simmaco e col., 1997). Por fim, há indícios de que as variações encontradas para os peptídeos antimicrobianos sejam determinadas pelas comunidades microbianas do ambiente, havendo inclusive, especificidade de peptídeos para com os tipos de microrganismos (Simmaco e col., 1998; Wells, 2007).

A partir dessas propriedades é possível indicar as alterações nos padrões microclimáticos dos microhabitats como moduladores dos perfis de secreções glandulares da pele dos anfíbios, e prever consequências. Por exemplo, se mudanças na temperatura e disponibilidade de água ditam mudanças no tipo e disponibilidade de presas (Connor, 2008), o que determinaria uma diferenciação na produção dos peptídeos antimicrobianos e, portanto, maior susceptibilidade a agentes infecciosos na pele. A mesmo se aplica aos demais moduladores.

### Microbiota cutânea

Os microrganismos são vulneráveis às alterações de variáveis físico-químicas no substrato onde vivem, tais como temperatura, pH, disponibilidade de água, radiação, nutrientes e outros (Madigan e col., 2004). É possível que características da história natural, por exemplo, o microhabitat ocupado pelos indivíduos contribua para a determinação dos perfis das comunidades microbianas da pele, assim como as próprias condições fisiológicas do hospedeiro.

A partir de estudos prévios, não publicados, realizados por método DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – observamos que o perfil das comunidades microbianas presentes sobre a pele de anfíbios sobrepuja parcialmente aquele das comunidades microbianas dos microhabitats ocupados pelos animais (Assis e col., não publicado). Culp e col., 2007 também detectaram a presença de entidades microbianas típicas de ambientes, como componentes das microbiotas cutâneas de três espécies de anfíbios. Dessa forma, podemos apontar o ambiente como um componente importante na colonização e composição das comunidades que se estabelecem sobre a pele dos anfíbios.

Microrganismos presentes nos ambientes estão sujeitos às alterações das variáveis físico-químicas ali pre-

sentes, assim, uma vez que, substratos dentro das florestas, o solo, por exemplo, experimenta alterações profundas nos componentes abióticos a partir de impactos antropogênicos, e que essas alterações determinam mudanças na composição das comunidades microbianas de solo (Zilli e col., 2003), as alterações nos microambientes ocupados por esses animais poderiam guardar relação com a estrutura das comunidades microbianas cutâneas em anuros.

A pele também é importante de ser considerada como um substrato e, como tal, também está passível de sofrer alterações em suas características físico-químicas conforme o ambiente. As condições microclimáticas dos habitats ocupados, assim como a temperatura e outras variáveis como intensidade e tipo de radiação solar, pH e umidade ou ainda concentração de diversos produtos químicos externos, podem afetar o substrato pele e, conseqüentemente, a composição da microbiota ali residente (Pelczar e col., 1981; Madigan e col., 2004; Kennedy e Smith, 1995). Mesmo em condições naturais, a pele dos animais não é um substrato constante e pode variar conforme as condições ambientais, por exemplo, durante a termorregulação ou secreção de ceras e muco para diminuir a perda de água, além de venenos para defesa (Daly, 1995).

O significado das mudanças climáticas, em sinergismo com outros impactos antropogênicos, para a microbiota e secreções cutâneas, está atrelado às mudanças nos microclimas dos habitats ocupados pelos anfíbios. Em decorrência das mudanças climáticas é esperado que ocorram mudanças na distribuição das espécies, como possíveis migrações e colonização de novos sítios (Haddad e col., 2008; Costa e col., 2012), o que proporcionaria o contato com novas comunidades microbianas e uma conseqüente modulação das comunidades residentes na pele. Porém, independentemente disso, na microbiota cutânea dos anfíbios estão presentes patógenos oportunistas (Assis e col., não publicado), que podem provocar infecções quando o hospedeiro é submetido a condições ambientais subótimas. Por exemplo, *Aeromonas hydrophila*, espécie bacteriana presente na microbiota cutânea residente, é agente causador da doença-das-pernas-vermelhas, que infecciona órgãos internos e pele (Mouriño e col., 2006; Carey e col., 1999).

Em alguns casos, alterações nos regimes climáticos poderiam, inclusive, favorecer a proliferação dos microrganismos patogênicos. A temperatura de fato tem efeito sobre a microbiota residente e os patógenos na pele do hospedeiro. Foi observado, por exemplo, que o progresso da infecção por *Bd* é afetado pelos regimes termiais aos quais os animais são expostos, sendo que, algumas temperaturas diminuem os níveis de infecção causada pelo fungo (Woodhams e col., 2003).

Por serem animais ectotérmicos, não só o ambiente de forma direta, mas as temperaturas corpóreas adquiridas durante a termorregulação podem afetar as comunidades microbianas da pele e, mesmo nesse caso, os microclimas têm papel fundamental uma vez que as temperaturas corpóreas são determinadas pela troca de calor com o ar, água e solo (Feder e Burggren, 1992).

Assim, novos padrões microclimáticos dos habitats

terão influência direta sobre a biologia dos anfíbios, microbiota cutânea residente e eventos de doenças provocadas pelo desequilíbrio na relação patógeno-hospedeiro.

## Agradecimentos

Agradeço aos coordenadores da Revista da Biologia pela iniciativa de elaborar este número especial e aos revisores Luís Felipe Toledo e Carlos Arturo Navas Iannini (editor) pelas ótimas sugestões, que enriqueceram a produção deste texto. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo é a financiadora dessa pesquisa.

## Referências

- Assis, A.B., Navas, C.A. e Barreto, C.C. (In prep.). Perfis de microbiotas cutâneas em quatro espécies de anfíbios da Floresta Atlântica.
- Blaustein, A.R. & Kiesecker, J.M. (2002) Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597-608.
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N. e Flaherty, D.C., Lam, B.A., Minbiole, K.P.C. (2008). Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1422-1429.
- Carey, C., Cohen, N. e Rollins-Smith, L. (1999). Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 459-472.
- Carey, C. (2000). Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and humans. *Environmental Health Perspectives* 108, 143-150.
- Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L. e Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* e *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology* 67, 33-43.
- Connor, S. (2008) Insects' will be climate change's first victims. *The independent Journal. Science*.
- Costa, T.R.N., Carnaval, A.C.O.Q., Toledo, L.F. (2012) Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. *Revista da Biologia* 8, 33-37.
- Culp, C.E., Falkinham III, J.O. e Belden, L.K. (2007). Identification of the natural bacterial microflora on the skin of Eastern newts, Bullfrog tadpoles e Redbacked salamanders. *Herpetologica* 63, 66-71.
- Daly, J.W. (1995). The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9-13.
- Daly, J., Padgett, W.L., Saunders, R.L. e Cover, J.F. (1997). Absence of tetrodotoxins in a captive-raised riparian frog, *Atelopus varius*. *Toxicon* 35, 705-709.
- Daszak, P.; Cunningham, A.; Hyatt, A.D. (2001) Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78: 103-116.
- Davidson, C., Benard, M.F., Shaffer, H.B., Parker, J.M., O'Leary, C., Conlon, J.M. e Rollins-Smith, L.A. (2007). Effects of chytrid e carbaryl exposure on survival, growth e skin peptide defenses in Foothill Yellow-legged frogs. *Environmental Science & Technology* 41, 1771-1776.
- Feder, M.E. e Burggren, W.W. (1992) *Environmental Physiology of the Amphibians*. Chicago: The University Chicago Press.
- Haddad, C.F., Giovanelli, J.G.R. e Alexerino, J. (2008). O

- aquecimento global e seis efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. Em: *Biologia & Mudanças Climáticas no Brasil*. São Carlos: RiMa Editora. Marcos J. Buckeridge Ed. 195-206.
- Harris, R.N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A. e Patel, A. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3, 53-56.
- Kennedy, A.C. e Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity e the sustainability of agricultural soils. *Plant e Soil* 170, 75-86.
- Kiesecker, J.M.; Blaustein. A.R.; Belden, L.K.(2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681-684.
- Lauer, A., Simon, M.A., Banning, J.L, Lam ,B.A. e Harris, R.N. (2008). Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal. Multidisciplinary Journal of Microbial ecology*, 2, 145-157.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P. e Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *PNAS*, 103, 3165-3170.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M. e Parker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 10ª Ed.
- Mourinho, J.L.P., Martins, M.L., Yamashita. M.M., Batista, C.R.V. e Pereira, M.A. (2006). Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1325-1327.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Pelczar, M. e Reid, R.(1981). *Microbiologia Vol II*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil.
- Pinto, L.P. e Assis, C.W. Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução (2005). In: *State of the Hotspots. Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Galindo-Leal, C. e Câmara, I.G. Fundação SOS Mata Atlântica e Conservação Internacional. Belo Horizonte.
- Raffel, T.R., Rohr, J.R., Kieseckers, J.M. e Hudson, P.J. (2006). Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology* 20, 819-828.
- Schumacher, J. (2006). Selected infectious diseases of wild reptiles e amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* 15, 18-24.
- Simmaco, M., Boman, A., Mangoni, M.L., Mignogna, G., Miele, R., Barra, D. e Boman, H.G. (1997). Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. *Federation of European Biochemical Society – FEBS – Letters* 416, 273-275.
- Simmaco, M., Mignogna, G. e Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.
- Wells, K.D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. The Chicago University Press.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. e Maranteli, G. (2003). Emerging disease of amphibian cured by elevated body temperature. *Diseases of aquatic* 55, 65-67.
- Woodhams, D.C., Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Reinert, L., Tyler, M.J. e Alford, R.A. (2006). Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia* 146, 531-540.
- Woodhams, D.C., Vredenburg, V.T., Simon, M.A., Bilheimer, D.B., Shakhmouradian, B.S., Shyr, Y., Briggs, C.J., Rollins-Smith, L. A. e Harris, R.N. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana mucosa*. *Biological Conservation* 138, 390-398.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zilli, J.E., Rumjanek, N.G., Xavier, G.R., Coutinho, H.L.C. e Neves, M.C.P. (2003). Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* 20, 391-411.