

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Determinación de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en las ranas altoandinas: *Telmatobius macrostomus* y *Telmatobius brachydactylus*, en la Reserva Nacional de Junín, Perú

“Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista”

Anja Karola Petermann Razetto

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA-PERU

2021

RESUMEN

Batrachochytrium dendrobatidis (*Bd*) es el hongo responsable de la enfermedad conocida como quitridiomycosis. En la actualidad dicha enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial y afecta a diversas poblaciones silvestres de anfibios. En el departamento de Junín, Perú, existen dos especies de ranas del género *Telmatobius*: *T. macrostomus* y *T. brachydactylus*. Estas dos especies se encuentran amenazadas y en los últimos años ha habido una notable disminución de la población. Las principales amenazas son antropogénicas, ya sea por sobreexplotación de las especies para consumo humano, introducción de trucha arcoíris, pérdida de hábitat, contaminación, actividades ganaderas, etc. Este estudio ha trabajado con muestras de hisopados cutáneos de ambas especies de ranas y PCR a tiempo real para detectar a *Bd*. De esta forma se podrá evaluar cuál de las dos especies se encuentra más afectada, establecer en qué áreas de la Reserva Nacional de Junín existen ranas infectadas y determinar si existe una asociación entre los factores de riesgo en cada área de muestreo y los casos positivos. De las 161 muestras colectadas de ambas especies 35.4% (57) fueron positivas a *Bd*. En la especie *T. macrostomus* 38.39% (43) fueron positivas y en *T. brachydactylus* 28.57% (14) fueron positivas. Esto confirma que el hongo se encuentra en la Reserva Nacional de Junín y que ambas especies se han infectado.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, PCR, *Telmatobius*, Junín

ABSTRACT

Batrachochytrium dendrobatidis (*Bd*) is the fungus responsible for the disease known as chytridiomycosis. Currently, the disease is distributed worldwide, affecting various wild populations of amphibians. In the department of Junín, Peru, there are two species of frogs of the genus *Telmatobius*: *T. macrostomus* and *T. brachydactylus*. These two species are threatened and in recent years there has been a notable decline in population. The main threats are anthropogenic: overexploitation of the species for human consumption, introduction of rainbow trout, loss of habitat, pollution, livestock activities, etc. This study has worked with skin swab samples from both frog species and real-time PCR to detect *Bd*. In this way, it will be possible to evaluate which of the two species is most affected, establish in which areas of the Junín National Reserve infected frogs exist and also determine if there is an association between the risk factors in each sampling area and the positive cases. From the 161 samples collected, 35.4% (57) were positive for *Bd*. In the species *T. macrostomus* 38.39% (43) were positive and in *T. brachydactylus* 28.57% (14) were positive. This confirms that the fungus is found in the Junín National Reserve and that both species have been infected.

Key words: *Batrachochytrium dendrobatidis*, PCR, *Telmatobius*, Junín

INTRODUCCIÓN

La palabra anfibio deriva del griego *amphibios* que significa “ambas vidas”, esto refleja una estrategia de vida dual (Duellman & Zug, 2021). Son ectotermos, es decir, que dependen de fuentes de calor externas y su temperatura corporal cambia con la ayuda de la temperatura del ambiente (Burnie, 2001). Esta clase de animal se encuentra distribuida por todo el mundo, solo están ausentes en la Antártida, la mayoría de las islas oceánicas remotas y los desiertos extremadamente secos (Duellman & Zug, 2021). Existen tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones), y Gymnophiona (cecilias) y actualmente se han reportado 8273 especies, de las cuales 7299 son ranas y sapos, 760 son salamandras y tritones, y 214 son cecilias (AmphibiaWeb, 2021).

La importancia de los anfibios radica en diversos aspectos, tanto ambientales como económicos e incluso de salud. Algunas especies se caracterizan por excavar, ya que de esta forma se protegen de condiciones climáticas adversas, tales como temperaturas elevadas o sequías, como también para la brumación (estado de dormancia en el cual el metabolismo se vuelve más lento por condiciones adversas) (Wells, 2007). Al realizar dichas excavaciones la tierra es removida y permite que esta se ventile, añada nutrientes, materia orgánica, humedad y mejora la productividad de esta (West, 2018).

La mayoría en su estado adulto se alimenta de invertebrados, particularmente insectos (Wells, 2007), por lo que son económicamente útiles, ya que reducen el número de insectos que destruyen cultivos o transmiten enfermedades (Duellman & Zug, 2021). No solo se alimentan de insectos adultos sino también de las fases larvarias, sobre todo de mosquitos, zancudos, tábanos, e insectos fitófagos, que muchas veces son vectores de enfermedades (Wells, 2007).

De igual manera, pueden servir como una fuente sostenible de alimento para humanos, siempre y cuando sean criadas de forma correcta y no se trate de especies protegidas. Los anfibios son una excelente fuente proteica, contienen más proteínas por gramo que los mamíferos y aves, siendo una excelente fuente de vitaminas y nutrientes (West, 2018). Además, son excelentes

bioindicadores sobre la calidad del hábitat y salud del ecosistema. Esto se debe a que este grupo de animales tiene una piel delgada, vascularizada y permeable, que no solo permite el intercambio gaseoso, sino que también permite que los contaminantes (químicos, toxinas, metales pesados) ingresen con mayor facilidad al torrente sanguíneo (Quaranta *et al.*, 2009).

El género *Telmatobius*, un grupo de ranas acuáticas endémicas que viven en bofedales, riachuelos, ríos u orillas de las partes altas de los Andes, desde los 1500 msnm hasta los 5200-5400 msnm, es uno de los más amenazados dentro del orden Anura en el Perú (Aguilar & Valencia, 2009); 17 de las 28 especies de este género se encuentran amenazadas debido a la contaminación de cuerpos de agua, ganadería intensiva, quitridiomycosis y uso para alimentos (SERFOR, 2018). Un estudio realizado por el Ministerio del Ambiente (MINAM) (2018) indica que los impactos más frecuentemente registrados se encuentran relacionados a actividades agrícolas, tala o deforestación y ganadería.

Telmatobius macrostomus es comúnmente conocida como rana gigante del Lago Junín y se encuentra en peligro de extinción (EN). Está presente en la Reserva Nacional de Junín, Santuario Histórico de Chacamarca y Santuario Nacional de Huayllay (SERNANP *et al.*, 2020). Se trata de un animal exclusivamente acuático que se distribuye en un rango altitudinal de 3200-4300 msnm (SERFOR, 2018). Por lo general habita en lagos pantanosos (como el lago Junín), arroyos, ríos, humedales y canales (IUCN, 2018) con alta vegetación acuática (SERNANP *et al.*, 2020). Los ejemplares adultos se caracterizan por el tamaño de su cuerpo, alcanzando los 18cm, sus dedos son alargados y el ancho de la cabeza es dos veces más grande que el largo. Es importante mencionar que los renacuajos pueden llegar a medir 20cm, por lo que se les considera los renacuajos más grandes del género *Telmatobius* (SERNANP *et al.*, 2020). A pesar de que no existen muchos estudios sobre esta especie, se cree que la población ha disminuido en los últimos años. El estudio realizado por Loza y Mendoza (2017) indica que de 65 lugares evaluados la rana solo fue observada en 7 lugares por lo que su distribución es muy limitada. Por otro lado, el estudio realizado por Watson *et al.* 2017a determinó que solo había ranas en 8 de los 20 lugares observados, siendo mayor la presencia de renacuajos que de adultos.

Otra especie del género *Telmatobius* es *Telmatobius brachydactylus* llamada rana ribereña o wanchas. Se trata de una especie semiacuática que se distribuye en un rango altitudinal de 4000-4600 msnm (Watson *et al.*, 2016). Dicha especie es endémica de las regiones de Junín y Pasco en Perú, se encuentra presente en la Reserva Nacional de Junín y Santuario Nacional de Huayllay (SERNANP *et al.*, 2020). Es importante mencionar que también se encuentra en peligro de extinción (EN) y se distribuye en pequeños afluentes del lago Junín como también en el altiplano de las regiones de Junín y Pasco en los Andes centrales del Perú. Se cree que la población ha disminuido, ya que diversas encuestas realizadas reflejan que no se ha observado muchos individuos de esta especie en los últimos años (IUCN 2018). Los ejemplares adultos se caracterizan por tener manchas que van desde una tonalidad marrón a negra por todo el cuerpo. Pueden llegar a medir 8cm, los dedos son cortos y el ancho de la cabeza es similar al largo. Los renacuajos se alimentan de algas, principalmente diatomeas (SERNANP *et al.*, 2020).

La Reserva Nacional de Junín es un área natural protegida (ANP) creada en el año 1974, se encuentra ubicada en los Andes Centrales de Perú y se caracteriza por tener un paisaje montañoso asociado con áreas de planicie dispersas, moldeado por acción aluvial, derrames volcánicos, deshielos y procesos de glaciación y desglaciación. Presenta un rango altitudinal que varía entre los 3000 a 4500 msnm aproximadamente. Se identifican dos tipos de ecosistemas: pajonal de puna húmeda y bofedales. Esta ANP se encuentra establecida alrededor del lago Junín, también conocido como lago Chinchaycocha, el segundo más grande del Perú. Se extiende entre las regiones de Junín y Pasco, entre los distritos de Carhuamayo, Ondores y Junín en la Región Junín; Vicco y Ninacaca en la Región Pasco; en la zona conocida como Pampa de Junín o Altiplano de Bombón sobre los 4100 msnm (SERNANP *et al.*, 2020). Al contar con diversos tipos de hábitat es un sitio óptimo para el descanso y alimentación de numerosas especies de fauna silvestre. En la reserva se protegen 134 especies de aves, 19 de mamíferos, 5 de anfibios, 2 de reptiles, 4 de peces y 109 de plantas (SERNANP *et al.*, 2020).

Hasta la fecha se estima que el Perú cuenta con 622 especies de anfibios, siendo el orden Anura la que posee el mayor número de especies con un total de 604 que representan el 97.1%, el orden

Gymnophiona cuenta con 3 especies que representan el 0.48%, por último, el orden Caudata cuenta con 15 especies que representan el 2.42% (MINAM, 2018), aunque se sabe muy poco sobre el estado de conservación de la mayoría. Esta falta de conocimiento sería de poco interés si el contexto regional de conservación de los anfibios no fuera tan alarmante. Desafortunadamente las disminuciones poblacionales y eventos de mortandad masiva en algunos países vecinos, especialmente Ecuador, enfatizan la necesidad de una evaluación urgente del estado de conservación de la batracofauna peruana (SERFOR,2018).

Con relación a las amenazas que enfrentan las especies *T.macrostomus* y *T.brachydactylus* se pueden mencionar la sobreexplotación de la especie principalmente para consumo humano (IUCN 2018), pérdida de hábitat, degradación y fragmentación a través de la extracción de recursos (Watson *et al* 2017 a,b), pastoreo excesivo (ovejas, vacas y camélidos) (Watson *et al* 2016), introducción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a lagos, ríos y arroyos en los Andes debido a que se genera un situación de depredación y competencia, cambios climáticos, contaminación de los cuerpos de agua, enfermedades infecciosas emergentes, eutrofización (IUCN, 2018), y fluctuaciones de los niveles de agua controlados por la represa de Upamayo (Watson *et al.* 2017 a,b).

Una de las amenazas más importante para los anfibios del mundo es el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), el agente que ocasiona quitridiomycosis, ha sido implicado en la disminución de poblaciones a nivel mundial y actualmente es considerado como la mayor amenaza a la biodiversidad (Kilpatrick *et al.*, 2009). Este hongo fue descrito por primera vez en el año 1998 en anfibios de América Central, América del Norte, Europa y Australia (Kilpatrick *et al.*, 2009), gracias a estudios histológicos realizados en individuos hallados muertos (Voyles *et al.*,2010). Existen regiones donde *Bd* se considera endémico y las tasas de mortalidad en las poblaciones de anfibios infectadas son elevadas (Kilpatrick *et al.*, 2009). En Latinoamérica ha sido relacionado a la posible extinción de 30 de las 113 especies de sapo arlequín (Mendelson *et al.*, 2006). No se ha logrado determinar si se trata de un patógeno introducido recientemente o si tal vez ha sido endémico y los cambios en la susceptibilidad del hospedero, virulencia del patógeno, cambios

ambientales o una combinación de los factores mencionados ha permitido la colonización de los hospederos (Morgan *et al.*, 2007).

En relación a las características de *Bd*, se trata de un patógeno generalista que tiene la capacidad de infectar a diferentes tipos de hospederos, de los cuales algunos son reservorios tolerantes a la infección. Este hongo es altamente transmisible a través del agua donde tiene el potencial de interactuar con diversas especies de anfibios (Greenberg *et al.*, 2019). Por este motivo, el riesgo de contraer *Bd* es mucho más elevado en hospederos que tienen hábitats acuáticos (Scheele *et al.*, 2019). De otro lado, este tiene dos etapas de vida. La primera etapa consiste en la dispersión de la zoospora infecciosa, la cual se moviliza a través de un flagelo posterior. Dicha zoospora se enquistada, absorbe el flagelo y desarrolla rizoides. El talo maduro se desarrolla y se convierte en un zoosporangio en el cual el citoplasma se escinde y forma zoosporas flageladas. Luego, a través de un microtúbulo podrá liberar las zoosporas al exterior y así continuar el ciclo de vida (Voyles *et al.*, 2010). Se debe agregar que la patogenicidad inicia en la epidermis de la piel del hospedero. Los talos de *Bd* viven y maduran dentro de las células del estrato córneo y granuloso (Berger *et al.*, 2005). También existe evidencia que indica que la actividad enzimática de *Bd* podría estar involucrada en el proceso de colonización. Es probable que la penetración inicial a las células requiera enzimas digestivas, que también podrían ser responsables de la disolución del citoplasma celular (Berger *et al.*, 2005).

Por lo que se refiere a la fisiopatología y signos clínicos, se sabe que en las fases larvianas *Bd* afecta las estructuras de queratina en la boca por lo que la alimentación se ve alterada (Kilpatrick *et al.*, 2009), lo que ocasiona un pobre desarrollo larval y un tamaño de cuerpo pequeño que conlleva a la mortalidad durante o poco tiempo después de la metamorfosis (Garner *et al.*, 2008). Dentro de las principales anomalías patológicas se puede mencionar la hiperplasia epidérmica, como también hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo). Otros cambios patológicos en la epidermis incluyen degeneración citoplasmática y vacuolización en células de capas más profundas. El daño epidérmico ocasionado por *Bd* parece interrumpir con funciones cutáneas críticas (Voyles *et al.*, 2010). Voyles *et al.* (2009) demostró a través de muestras cutáneas aisladas

del área ventral que en ranas clínicamente enfermas había una marcada inhibición en el transporte de electrolitos. Dichas alteraciones a nivel cutáneo también coinciden con dos cambios fisiopatológicos críticos: reducción de las concentraciones de electrolitos en plasma y deterioro de la actividad eléctrica del corazón, ocasionando un paro cardíaco. Además, muestras sanguíneas indicaron una disminución significativa de las concentraciones de potasio y sodio plasmático. En cuanto a los signos clínicos de quitridiomycosis severa se incluye: letargia, inapetencia, eritema cutáneo, postura anormal (abducción de miembros traseros), desprendimiento anormal de la piel y pérdida del reflejo de enderezamiento (Voyles *et al.*, 2010).

De otro lado, no hay muchos estudios con respecto a la respuesta inmune. Sin embargo, recientes investigaciones indican que *Bd* podría inhibir la producción de linfocitos e incluso inducirlos a una apoptosis. Dicho efecto impide la habilidad del anfibio infectado para erradicar el patógeno antes de que los daños epiteliales aparezcan (Fites *et al.*, 2013). A su vez Rollins-Smith (2009) habla sobre la inmunidad del hospedero, mencionando que existe una respuesta inmune innata. Esta proviene de los péptidos antimicrobianos producidos por las glándulas epidermales granulares, siendo una primera línea de defensa frente a *Bd*.

En Perú, existen pocos trabajos de investigación sobre la presencia de quitridiomycosis en especies de anfibios endémicos. En el caso de las especies *T. macrostomus* y *T. brachydactylus* no existe ningún trabajo que evalúe la presencia de *Bd*. Asimismo, al tratarse de dos especies endémicas que se encuentran en la categoría en peligro de extinción (EN), esto constituye un dato importante para saber su estado de salud. De igual manera, se sabe que este patógeno es una enfermedad infecciosa emergente de reporte obligatorio para la OIE. Catenazzi *et al* (2010) realizó un trabajo en el mercado de San Pedro, Cusco, donde determinó una frecuencia del 100% de *Bd* mediante el uso de métodos moleculares y muestras de hisopados cutáneos. Al año siguiente, Catenazzi *et al* (2011) realizó otra investigación en el Parque Nacional del Manu, donde mediante pruebas moleculares e hisopados de piel, pudo determinar que hubo una disminución de especies endémicas debido a la presencia de *Bd*. De igual manera, Berenguel *et al* (2016) trabajó con PCR a tiempo real e hisopados de piel y estimó una frecuencia de infección del 18.4% en poblaciones

silvestres de ranas del Titicaca (*Telmatobius culeus*). Finalmente, Zevallos *et al* (2016) también trabajó con PCR a tiempo real y analizó 62 ranas del género *Telmatobius*, confiscadas del mercado de La Parada, determinando una frecuencia de *Bd* del 60%. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *Bd* en dos especies de ranas de Junín, *T. macrostomus* y *T. brachydactylus*, en la Reserva Nacional de Junín, Perú; utilizando el método de PCR a tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1. Lugar de Estudio:** Las muestras fueron obtenidas en la Reserva Nacional de Junín, ubicada en los Andes centrales, en los distritos de Carhuamayo, Ondores y Junín en la provincia y departamento de Junín, y los distritos de Ninacaca y Vicco en la provincia y departamento de Pasco. Estas fueron analizadas en el Laboratorio de Salud de Ecosistemas de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad Andrés Bello en Santiago de Chile.
- 2. Consideraciones éticas:** Este trabajo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, siendo el código de inscripción del proyecto el 201698. De igual manera el proyecto global de toma de muestras fue previamente autorizado por SERNANP (Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado) a través de la Resolución Jefatural N°006-2018-SERNANP-RNJ-JEF.
- 3. Tipo de Estudio:** Observacional descriptivo.
- 4. Población objetivo y tamaño de muestra:** Se muestreó a todos los individuos de *T. macrostomus* y *T. brachydactylus* hallados en veinte riachuelos dentro del área de estudio. Se pudo muestrear a 161 ranas, 112 fueron *T. macrostomus* y 49 *T. brachydactylus*. Todos los individuos muestreados se encontraron en buen estado, es decir, no se evidenció lesiones en el epitelio, pesos por debajo del percentil, alteraciones neurológicas, ni ningún otro signo clínico.
- 5. Criterios de inclusión y exclusión:** Se trabajó con ranas de la especie *T. macrostomus* y *T. brachydactylus* en todas las etapas de desarrollo (renacuajos, metamorfos, juveniles y adultos) y de ambos sexos, dentro de la Reserva Nacional de Junín. Asimismo, no se realizó distinción de la condición clínica.
- 6. Muestras:** Las muestras tomadas fueron hisopados cutáneos, en renacuajos, metamorfos, juveniles y adultos. Los animales fueron capturados con redes de inmersión y se colocaron en baldes con agua para luego tomar las muestras. Se utilizaron hisopos

estériles de madera, estos fueron deslizados 30 veces en las siguientes partes del cuerpo del anfibio: superficie inferior o vientre, ingle, piernas y membranas interdigitales de los miembros posteriores; en renacuajos el hisopo solo se deslizó por el disco oral, ya que es la única zona queratinizada del anfibio en este estadio. Estas fueron recolectadas entre los meses de octubre y diciembre del 2018 por miembros de la ONG GRUPO RANA. Cabe resaltar que en cada individuo se realizó un registro de especie, pesaje, toma de medidas para determinar la etapa de desarrollo (ancho de la cabeza, longitud hocico-cloaca, longitud del antebrazo, longitud del pie, longitud del fémur y longitud de la tibia) y también se registró cualquier tipo de alteración y/o lesión.

La metodología para la captura de los individuos se basó en el estudio realizado por Watson *et al* (2017b) donde se plantea trabajar en transectos de 100 metros, en los cuales dos o cuatro investigadores se dirigen río arriba con redes de inmersión. Los transectos del área de estudio fueron seleccionados en base a su accesibilidad y el tipo de hábitat. Los hisopos fueron colocados en crioviales con etanol al 96%, estos se mantuvieron a temperatura ambiente en Junín (5°C-10°C). Posteriormente se transportaron a Lima en cajas térmicas con una temperatura de 5°C para luego conservarse en una refrigeradora a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento.

- 7. Procesamiento de muestras o datos:** La presencia del hongo fue evaluada mediante PCR cuantitativa (qPCR) previa extracción del ADN de las muestras. En primer lugar, se cortó la punta del algodón de cada hisopo y se colocó en tubos Eppendorf que contenían el reactivo PrepMan® Ultra de la marca ThermoFisher y 30-40mg de bolitas de silica de 0.05mm. El ADN se extrajo de cada muestra utilizando la metodología descrita por Boyle *et al* (2004). Luego, el ADN extraído se diluyó con agua destilada (1:10) y se almacenó a -80°C hasta el procesamiento.

Todas las muestras fueron procesadas en un termociclador de la marca Applied Biosystems™. Asimismo, se utilizaron primers específicos para las regiones ITS-1/5.8S de ADN ribosomal de *Bd*, en base al estudio realizado por Soto-Azat *et al* (2013).

A continuación, se elaboró el Master Mix (reactivos de la marca ThermoFisher), que se encontraba conformado por Taqman, Probe, BSA, primer forward y reverse, y agua libre de nucleasas. Todos los componentes se colocaron en un criovial estéril.

De forma paralela se sacaron las muestras de ADN para que se descongelen. Luego se colocó el Master Mix en cada pocillo de la placa de PCR, se agitó las muestras de ADN y colocó en los pocillos (cada muestra se corrió en duplicado). De igual manera se tuvo listos los controles positivos de *Bd* y los negativos. Los últimos mencionados fueron preparados realizando diferentes diluciones de zoosporas de aislados en el Laboratorio de Salud de Ecosistemas de la Universidad Andrés Bello; para los controles negativos se utilizó agua libre de nucleasas. Finalmente se colocó una lámina adhesiva de plástico para sellar la placa, se centrifugó a 4000rpm y 12°C por tres minutos para homogenizar y se colocó la placa en el termociclador durante 60 ciclos.

Por último, para poder determinar si un resultado fue positivo se tuvo en cuenta lo siguiente: curva de amplificación en el estudio de PCR, valores obtenidos mayores a 0.1 equivalentes genómicos en la muestra y el duplicado; y equivalente genómico promedio más elevado que la desviación estándar tanto en la muestra como en el duplicado (Soto-Azat *et al.*, 2013).

- 8. Plan de análisis de datos:** El análisis se realizó utilizando estadística descriptiva y tablas de frecuencia. Para ello se trabajó con el software estadístico Stata versión 17. Primero se evaluó la prevalencia del hongo por especie. Además, se evaluó la asociación entre la especie de anfibio y la presencia del hongo *Bd* utilizando la prueba de Chi cuadrado.

RESULTADOS

Se tomó muestras de hisopados cutáneos en individuos de las especies *T. macrostomus* y *T. brachydactylus*. En el caso de *T. macrostomus* se hallaron 112 ranas de las cuales 12 fueron adultos, siendo 5 machos y 7 hembras; y 100 renacuajos. De otro lado, en el caso de *T. brachydactylus* se pudo muestrear 49 ranas, de las cuales 6 fueron adultos, siendo 4 machos y 2 hembras; y 43 renacuajos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de individuos en base a la especie, sexo y estadio de desarrollo

		Especie	
		<i>T. macrostomus</i>	<i>T. brachydactylus</i>
Total		112	49
Sexo	Machos	5	4
	Hembras	7	2
Estadio	Adultos	12	6
	Renacuajos	100	43

Del total de las muestras analizadas, se encontró una frecuencia del 35.4% (57/161) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de individuos de ambas especies positivos a *Bd*

Resultado <i>Bd</i>	Número de individuos	Frecuencia
Negativo	104	64.60%
Positivo	57	35.40%
Total	161	100%

Para la especie *T. brachydactylus* se halló una frecuencia del 28.57% (14/49); y para la especie *T. macrostomus*, se halló una frecuencia del 38.39% (43/112). La diferencia entre ambas especies no fue estadísticamente representativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de individuos de *T. brachydactylus* y *T. macrostomus* positivos a *Bd*.

Especies	Resultado <i>Bd</i>	
	Positivo	Total
<i>T. brachydactylus</i>	14	49
<i>T. macrostomus</i>	43	112
Total	57	161

Con respecto al estadio de desarrollo y sexo, en *T. macrostomus*, ocho individuos adultos (5 hembras y 3 machos) y 35 renacuajos fueron positivos. En *T. brachydactylus*, cinco adultos (1 hembra y 4 machos) y 9 renacuajos resultaron positivos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de individuos según el estadio de desarrollo y sexo positivos a *Bd*.

Especie	Estadio de desarrollo			Total
	Adultos			
	Hembras	Machos	Renacuajos	
<i>T. macrostomus</i>	5	3	35	43
<i>T. brachydactylus</i>	1	4	9	14
Total	6	7	44	57

Por último, el muestreo de las ranas se realizó en veinte locaciones (ríos y riachuelos) dentro de la Reserva Nacional de Junín y solo en catorce de estas hubo individuos positivos a *Bd* (Cuadro 5). De igual manera, en la sección de Anexos (Figura 1) se puede observar un mapa con los puntos ubicados, aquellos que tienen una marca amarilla fueron positivos a *Bd* y aquellos que tienen una marca blanca fueron negativos a *Bd*.

Cuadro 5. Zonas de muestreo, presencia de *Bd* y número de muestras por especie.

Locaciones	Resultado <i>Bd</i>		Especies	
	Positivo	Muestras tomadas	<i>T. macrostomus</i>	<i>T. brachydactylus</i>
Río Paccha	10	11	6	5
Río Calcalcocha	1	6	6	0
Río Huarmipuquio	6	13	13	0
Río Palomayo	3	7	7	0
Río Chacachimpa	10	28	28	0
Río Ishlapuquio	3	5	5	0
Río Amarillo	2	7	6	1
Río Ayac	8	32	0	32
Río Yanacocha	7	10	10	0
Río Chacacancha	1	4	4	0
Río Huayricucho	1	10	10	0
Río Lulicocha	1	5	5	0
Riachuelo Pampaniuc	1	1	1	0
Ninacaca	3	5	1	4
Río Llachshamaray	0	3	3	0
Riachuelo Uco	0	6	0	6
Río Jacacancha	0	3	3	0
Río Huagron	0	1	1	0
Río Conoc	0	2	1	1
Río Bagres	0	2	2	0
Total	57	161	112	49

DISCUSIÓN

El PCR a tiempo real es la prueba Gold Standard para diagnosticar *Bd*, ya que es rápida, específica y sensible. Luego de realizar el PCR se pudo determinar que la diferencia en la frecuencia de *Bd* entre ambas especies no fue relevante según la prueba de Chi cuadrado y podría estar relacionada al tamaño muestral, ya que se tomó más muestras de *T. macrostomus*, debido a que dicha especie se encontró en mayor cantidad. También podría estar relacionada al estilo de vida de *T. macrostomus*, ya que se trata una especie completamente acuática. Se ha reportado que la mayoría de los anfibios positivos a *Bd* tienen un ciclo de vida que los asocia de forma permanente a cuerpos de agua, característica que se ha visto asociada a una tasa elevada de transmisión y prevalencia de quitridiomycosis (Kosch *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Kriger *et al.* (2007) se determinó que, de 519 ranas muestreadas, 157 fueron positivas a *Bd* y sólo una de ellas pertenecía a una especie terrestre, confirmando que los anfibios que se encuentran de forma permanente en cuerpos de agua tienen mayores probabilidades de infectarse con este hongo, ya que dicho patógeno tiene ciertas limitaciones fisiológicas y no tolera la desecación después de una hora o más (Johnson *et al.*, 2003).

Bd se diferencia de otros hongos porque sus zoosporas cuentan con flagelos y por ende son móviles, dicha característica les permite nadar e infectar con mayor facilidad a sus hospederos (Rollins-Smith, 2009). También es importante mencionar que en el estudio de Burrowes *et al.* (2017) se halló *Bd* en el 42% en muestras tomadas de las membranas interdigitales de aves andinas acuáticas preservadas en un museo de Bolivia; por lo que estas podrían actuar como vehículo para dispersar dicho hongo, debido a que pueden trasladarse con facilidad a diferentes cuerpos de agua, llevando el hongo a diversos lugares (Burrowes *et al.*, 2017). Algunos de estos especímenes (aves) fueron colectados en los años 1980's, lo que indicaría que el hongo ya se encontraba en los Andes bolivianos desde esa década.

De otro lado, en otros estudios similares realizados en Perú, se encontraron diferentes frecuencias para *Bd*. Berenguel *et al.* (2016) halló una frecuencia del 18.4% en una población de ranas del

Titicaca (*Telmabobius culeus*), en dicho estudio fueron muestreados 38 individuos de vida libre. Asimismo, Zevallos *et al* (2016) halló una frecuencia del 60% donde muestrearon 62 ranas del género *Telmatobius* que habían sido confiscadas en un mercado. La diferencia de los porcentajes podría estar relacionada al tamaño muestral que no fue tan significativo, sin embargo, en ambos se encontró el hongo quitridio. En el caso del reporte de Zevallos *et al.* (2016), la alta frecuencia podría estar relacionada al estrés al que fueron sometidos los animales, por el hacinamiento y falta de higiene, factores que favorecerían a la transmisión del hongo.

Otro detalle que hay que mencionar es que en este estudio ninguno de los individuos positivos presentó lesiones ni signos clínicos, por eso muchas veces la quitridiomycosis es difícil de diagnosticar con sólo un examen físico. La infección a veces no llega a un estado avanzado debido a la inmunidad en el hospedero o una baja virulencia, en caso *Bd* haya estado suficiente tiempo en el Perú como para generar una adaptación de los animales (Kosch *et al.*, 2012).

Se sabe que los anfibios tienen péptidos antimicrobianos que forman parte de la inmunidad innata, siendo la primera línea de defensa frente a *Bd*, dichos péptidos han sido estudiados *in vitro* y han demostrado ser muy eficientes, pero no se conoce cuán efectivos son *in vivo*, ya que estos varían en base a la especie (Rollins-Smith. 2009). Algunos han sugerido que la potencia de dichos péptidos es específica para cada especie y podría generar diferentes tipos de resistencia frente a *Bd* en las poblaciones silvestres de anfibios (Woodhams *et al.*, 2007). Es por ello que sería bueno evaluar los péptidos antimicrobianos presentes en las dos especies estudiadas, ya que se podría determinar los factores que estimulan la producción y liberación de estos péptidos en las diferentes poblaciones silvestres, y el rol que cumplen frente a *Bd*. Además, es importante tener en cuenta que los renacuajos no cuentan con dichos péptidos, es por ello que en este estadio los individuos podrían ser más propensos a infectarse, teniendo en cuenta que pasan todo el tiempo sumergidos en medios acuáticos.

En lo que respecta a las zonas de muestreo, se trabajó en veinte locaciones que fueron principalmente ríos y riachuelos, donde sólo se hallaron individuos positivos en 14 de estas: río Paccha, río Calcalcocha, Ninacaca, río Huarmipuquio, río Palomayo, río Chacachimpa, río

Ishlapuquio, río Amarillo, río Ayac, río Yanacocha, río Chacacancha, río Huayricucho, río Lulicocha y riachuelo Pampaniuc.

En todos los lugares muestreados se observó que se llevaban a cabo algunas actividades como ganadería, limpieza de canal, lavado de ropa, minería, fabricación de chuño y caza con barbasco, así como también presencia de residuos sólidos y aguas servidas. Sin embargo, al tratarse de un ANP las actividades antropogénicas deberían ser controladas, ya que dentro de estas se permiten alternativas de desarrollo sostenible y sustentable que mejore la calidad de vida de los pobladores locales, siempre y cuando se garantice la protección de la biodiversidad. Estos eventos indicarían que se debe realizar un mejor control por medio de las autoridades pertinentes o realizar charlas que capaciten mejor a los pobladores para que continúen llevando a cabo sus actividades sin perjudicar la flora y fauna de dicha Reserva Nacional. De otro lado, la toma de muestras por cada lugar fue variable, ya que dependía de la cantidad de ranas presentes en ese momento, éstas variaron desde 32 muestras por lugar hasta una por lugar y coincide que en la mayoría de los lugares donde no se hallaron casos positivos se recolectaron pocas muestras.

Jarvis *et al.* (2015) realizaron una reevaluación de los factores que afectan a algunas familias de anfibios, dentro de ellas la Telmatobiidae, y hallaron que las principales amenazas son la pérdida de hábitat (explotación forestal y agricultura), utilización (mascotas, alimentación), contaminación (operaciones mineras), enfermedades (quitridiomycosis), disturbios generados por humanos (turismo, limpieza de canales) y fuego. Cabe resaltar que las interacciones sinérgicas con la quitridiomycosis podrían exacerbar las pérdidas de las poblaciones de anfibios (Jarvis *et al.*, 2015).

De otro lado, el comercio ilegal y su constante desarrollo han derribado las barreras de dispersión, facilitando la propagación pasiva de enfermedades que amenazan la biodiversidad de la Tierra (Scheele *et al.*, 2019). Durante años el comercio internacional de anfibios ha contribuido directamente a la vectorización de *Bd* en todo el mundo e incluso se tiene conocimiento de que la dispersión antropogénica involuntaria podría contribuir también, ya que algunos años atrás anuros asiáticos llegaron dentro de equipos de minería a Madagascar (O'Hanlon *et al.*, 2018). Catenazzi

et al (2010) comenta que el comercio de ranas nativas es común en los Andes peruanos, por lo que el transporte de ranas vivas que se encuentran infectadas podría promover la dispersión del hongo a poblaciones susceptibles de anfibios.

De esta forma, es probable que en las zonas donde se hallaron individuos positivos a *Bd*, las zoosporas hayan sido trasladadas a través de instrumentos contaminados (baldes o bolsas), zapatos o botas, equipo utilizado para atrapar ranas y, por último, otro factor podría ser la liberación de ranas o renacuajos previamente capturados, o incluso individuos adultos que hayan podido escapar (Catenazzi *et al.*, 2010). Asimismo, el tamaño de los cuerpos de agua también podría ser un factor contribuyente al número de casos positivos, ya que es posible que en aquellos riachuelos que son más angostos haya una mayor densidad de animales y por ende mayor contacto directo entre los individuos. Esto podría contribuir a que haya más contagios. De lo contrario, en los cuerpos de agua más grandes los individuos van a estar más separados y también es posible que el caudal sea más fuerte, por ello las zoosporas van a tener menos posibilidades de infectar a las ranas. Sin embargo, para ello sería necesario evaluar el tamaño de cada cuerpo de agua y correlacionarlo con los casos positivos.

Así pues, es importante mencionar que el comercio de ranas también puede promover la dispersión de diferentes genotipos de *Bd*, siendo unos más virulentos que otros (Morgan *et al.*, 2007). Del mismo modo, existen otros estudios que relacionan el cambio climático con la disminución de las poblaciones de anfibios, la hipótesis plantea que el incremento de temperatura puede deprimir la respuesta inmune de los anfibios, volviéndolos más susceptibles a *Bd* u otras infecciones (Rohr *et al.*, 2010). Sin embargo, Catenazzi *et al* (2013) reveló que el cambio de temperatura afecta principalmente a los anfibios que habitan a menor altura, no obstante, el incremento de temperatura sí podría favorecer a la prevalencia y crecimiento del hongo siempre y cuando sea dentro del rango óptimo de crecimiento del patógeno.

No obstante, un estudio más reciente realizado por Russell *et al* (2019) en la parte baja de la Amazonía peruana, reveló una frecuencia de *Bd* del 24-46%. Esta investigación trabajó con 80 especies de ranas de tres diferentes zonas. Ninguno de los individuos positivos presentó signos

clínicos a pesar de que la carga de zoosporas fue elevada. Esto contradice parte de la información que se maneja sobre la patogenicidad de *Bd* y demostraría que sí puede sobrevivir a temperaturas altas y en climas secos. Esto último podría ser crítico, ya que los ecosistemas que se encuentran a menor altura podrían jugar un rol importante en la dispersión y persistencia de *Bd*.

Es importante destacar que este proyecto forma parte de uno global, es por eso que no cuenta con información específica sobre las características de cada zona de muestreo, lo que dificulta correlacionar la ausencia de casos positivos en algunas zonas de muestreo, a pesar de que estas se encuentran muy cerca. No obstante, los resultados son valiosos, ya que se trata de dos especies endémicas amenazadas y la quitridiomycosis es una enfermedad de reporte obligatorio a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). De ahora en adelante con estos conocimientos se podrá tener una base para evaluar la dispersión de este patógeno en la Reserva Nacional de Junín y poder realizar un trabajo de investigación más amplio.

Finalmente, este estudio reporta por primera vez la presencia de *Bd* en *T. macrostomus* y *T. brachydactylus* en la Reserva Nacional de Junín en los Andes centrales de Perú.

CONCLUSIONES

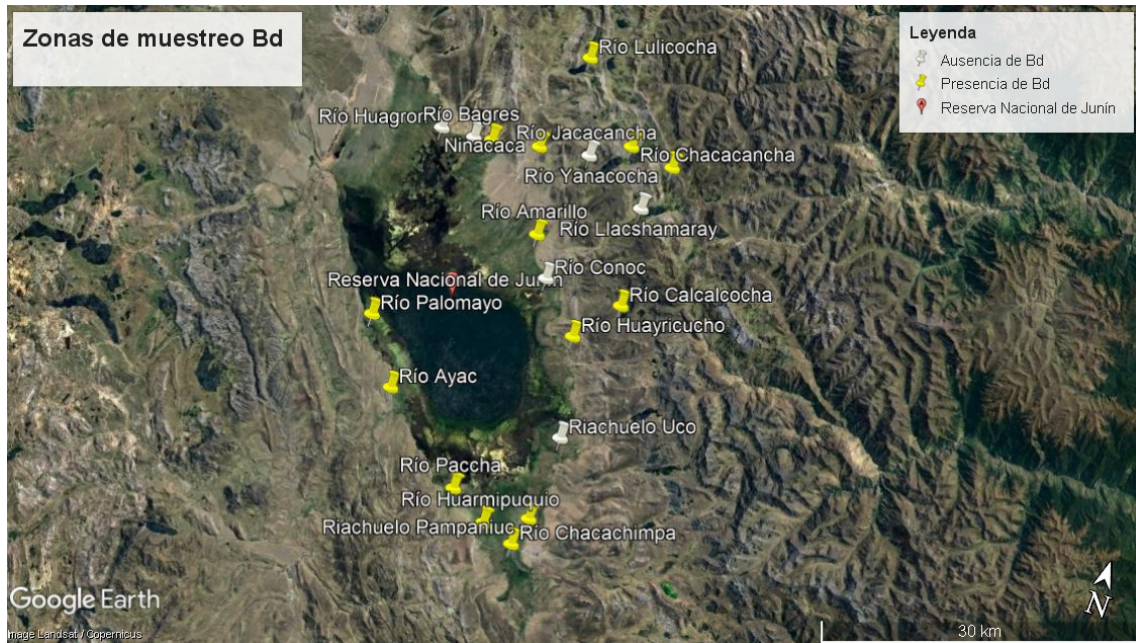
- Se encontró una frecuencia del 35.4% del hongo *Bd* en las dos especies de ranas estudiadas en la Reserva Nacional de Junín, *T. macrostomus* y *T. brachydactylus*.
- La especie *T. macrostomus* tuvo una frecuencia elevada del 38.39%, mientras que la especie *T. brachydactylus* tuvo una frecuencia del 28.57%.
- La especie de las ranas no fue un determinante para la presencia del hongo, ya que ambas tuvieron casos positivos.

RECOMENDACIONES

- Evaluar los factores físico-químicos de cada cuerpo de agua para determinar si estos guardan algún tipo de relación con la presencia de *Bd*.
- Sería ideal utilizar hisopos de plástico para tomar las muestras, ya que durante el procesamiento fue difícil extraer el algodón, ya que este se pegaba y la madera absorbía mucho líquido.
- Realizar un registro sobre las viviendas que existen cerca de cada lugar muestreado para así poder evaluar si las personas pasan más tiempo en ciertos lugares.
- Medir las dimensiones cada río y riachuelo de forma que se pueda determinar si en los cuerpos de agua más pequeños hay mayor prevalencia de *Bd*.
- Tipificar los aislados moleculares para determinar qué linaje de *Bd* se encuentra en la Reserva Nacional de Junín.

ANEXOS

Figura 1. Zonas de muestreo en la Reserva Nacional de Junín.



BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C., & Valencia, N. (2009, abril 10). Relaciones filogenéticas entre telmatobiinidos (Anura, Ceratophryidae, Telmatobiinae) de los Andes centrales basado en la morfología de los estados larval y adultos. *Revista Peruana de Biología*, 16, pp.43-50.
- AmphibiaWeb. (2021). Species by the Numbers. enero 2, 2021, de AmphibiaWeb Sitio web: <https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>
- Berenguel, R; Elías, R; Weaver, T; & Reading, R. (2016). Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in Wild Populations of the Lake Titicaca Frog, *Telmatobius culeus*, in Peru. *Journal of Wildlife Diseases*, 52, pp.973-975.
- Berger, L; Hyatt, A; Speare, R; & Longcore, J. (2005, diciembre 30). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 68, pp.51-63.
- Boyle, D.G; Boyle, D.B; Olsen, V; Morgan, J; & Hyatt, A. (2004, agosto 9). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 60, pp.141-148.
- Burnie, D. (2001). *Animal: The definitive Visual Guide to the World's Wildlife*. Londres: Cosar.
- Burrowes, P., & De La Riva, I. (2017, abril 2). Detection of the Amphibian Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Museum Specimens of Andean Aquatic Birds: Implications for Pathogen Dispersal. *Journal of Wildlife Diseases*, 53, pp.1-7.
- Catenazzi, A; Vredenburg, V; & Lehr, E. (2010, septiembre 23). *Batrachochytrium dendrobatidis* in the live frog trade of *Telmatobius* (Anura: Ceratophryidae) in the tropical Andes. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 92, pp.187-191.
- Catenazzi, A; Leger, E; & Rodriguez, LO. (2011, noviembre 05). *Batrachochytrium dendrobatidis* and the Collapse of Anuran Species Richness and Abundance in the Upper Manu National Park, Southeastern Peru. *Conservation Biology*, 25, pp.382-391.

- Catenazzi, A; Lehr, E; & Vredenburg, V. (2013, julio 12). Thermal Physiology, Disease, and Amphibian Declines on the Eastern Slopes of the Andes. *Conservation Biology*, 28, pp.509-517.
- Duellman, W. E., & Zug, George R. (2021, enero 12). *Amphibian. Encyclopedia*
- Fites, J; Ramsey, J; Holden, W; Collier, S; Sutherland, D; Reinert, L; Gayek, S; Dermody, T; Aune, T; Oswald-Richter, K; & Rollins-Smith, L. (2013, octubre 18). The Invasive Chytrid Fungus of Amphibians Paralyzes Lymphocyte Responses. *SCIENCE*, 342, pp.366-369.
- Garner, T; Walker, S; Bosch, J; Leech, S; Rowcliffe, M; Cunningham, M; & Fisher, M. (2008, noviembre 28). Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos Journal*, 118, pp.783-791.
- Greenberg, D; & Palen, W. (2019, marzo 29). A deadly amphibian disease goes global. *SCIENCE*, 363, pp.1386-1388.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). (2018). *Telmatobius Red List Category*. diciembre 15, 2020, de IUCN Sitio web: <https://www.iucnredlist.org/search?query=Telmatobius&searchType=species>
- Jarvis, L; Angulo, A; Catenazzi, A; von May, R; Brown, J; Lehr, E; & Lewis J. (2015, septiembre 28). A re-assessment of priority amphibian species of Peru. *Tropical Conservation Science*, 8, pp.623-645.
- Johnson, M., Berger, L., Philips, L., & Speare, R. (2003, diciembre 29). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, pp.255-260.
- Kilpatrick, A; Briggs, C; & Daszak, P. (2009, octubre 14). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Cell Press*, 25, pp.109-118.
- Kosch, T., Morales, V., & Summers, K. (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* in Peru. *Herpetological Review*, 43, pp.150-159.

- Loza Del Carpio, A., & Mendoza, W. (2017, junio 10). Evaluación poblacional y estado de conservación de *Telmatobius macrostomus* Peters, 1873 (Anura: Telmatobiidae) en humedales altoandinos, Región Pasco-Perú. *Revista de Investigación altoandina*, 19, pp.145-156.
- Mendelson, J.R; Lips, K; Gagliardo, R; Rabb, G; Collins, J; Diffendorfer, J; Daszak, P; Ibáñez, R; Zippel, K; & Lawson, D. (2006, julio 07). Confronting Amphibian Declines and Extinctions. *Science*, 313, p.48.
- MINAM. (2018). Situación actual de las especies de anfibios y reptiles del Perú. Lima: MINAM.
- Morgan, J; Vredenburg, V; Rachowicz, L; Knapp, R; Stice, M; Tunstall, T; Bingham, R; Parker, J; Longcore, J; Moritz, C; Briggs, C; & Taylor, J. (2007, junio 27). Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PNAS*, 104, pp.13845-138450.
- O'Hanlon, S., Rieux, A., Farrer, R., Rosa, G., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T., Murray, C., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E., Cunningham, A., Doherty-Bone, T., Ghosh, P., Gower, D., Hints, W., Höglund, J., Jenkinson, T., Lin, Ch., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P., Pasmans, F., Schmeller, D., Schmidt, B., Shelton, J., Skerrat, L., Smith, F., Soto-Azat, C., Spagnoletti, M., Tessa, G., Toledo, L., Valenzuela-Sánchez, A., Verster, R., Vörös, J., Webb, R., Wierzbicki, C., Wombwell, E., Zamudio, K., Aanensen, D., James, T., Gilbert, M., Weldon, C., Bosch, J., Balloux, F., Garner, T., & Fisher, M. (2018, mayo 11). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360, pp.621-627.
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., & Lippe, C. (2009, noviembre 4). Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics. *PLoS ONE*, 4, 11.
- Rollins-Smith, L. (2009, marzo 25). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *ELSEVIER, Acta 1788*, pp.1593-1599.

- Rohr, J., & Raffel T. (2010, mayo 4). Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.8268-8274.
- Russell, I; Larson, J; Von May, R; Holmes, I; James, T; & Davis Rabosky, A. (2019, octubre 16). Widespread chytrid infection across frogs in the Peruvian Amazon suggests critical role for low elevation in pathogen spread and persistence. *PLoS ONE*, 14, pp.1-13.
- SERFOR. (2018). Libro Rojo de la Fauna Silvestre Amenazada del Perú. Lima: SERFOR.
- SERNANP, Yunkawasi, Rainforest Partnership, Denver Zoological Foundation. (2020). Reserva Nacional de Junín: un espejo en medio de los Andes. Lima: MINAM.
- Scheele, B; Pasmans, F; Skerratt, L; Berger, L; Martel, A; Beukema, W; Acevedo, A; Burrowes, P; Carvalho, T; Catenazzi, A; De la Riva, I; Fisher, M; Flechas, S; Foster, C; Frías-Álvarez, P; Garner, T; Gratwicke, B; Guayasamin, J; Hirschfeld, M; Kolby, J; Kosch, T; La Marca, E; Lindenmayer, D; Lips, K; Longo, A; Maneyro, R; McDonald, C; Mendelson III, J; Palacios-Rodriguez, P; Parra-Olea, G; Richards-Zawacki, C; Rödel, MO; Rovito, S; Soto-Azat, C; Toledo, LF; Voyles, J; Weldon, C; Whitfield, S; Wilkinson, M; Samudio, K; & Canessa, S. (2019, marzo 29). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *SCIENCE*, 363, pp.1459-1463.
- Soto-Azat, C; Valenzuela-Sánchez, A; Clarke, B; Busse, K; Ortiz, J; Barrientos, C; & Cunningham, A. (2013, noviembre 20). Is Chytridiomycosis Driving Darwin's Frogs to Extinction?. *PLoS ONE*, 8, pp.1-8.
- Voyles, J; Young, S; Berger, L; Campbell, C; Voyles, W; Dinudom, A; Cook, D; Webb, R; Alford, R; Skerratt, L, & Speare, R. (2009, octubre 23). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *SCIENCE*, 326, pp.582-585.
- Voyles, J; Rosenblum, E; & Berger, L. (2010, octubre 14). Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *ELSEVIER*, 13, pp.25-32.

- Watson, A., Fitzgerald, A., Damián-Baldeón, O., Chamorro, A., & Castillo, L. (2016, noviembre 23). Ranas Altoandinas en la Región de Junín: Estado Actual y Plan Estratégico de Conservación *Telmatobius macrostomus* (Peters, 1873) *Telmatobius brachydactylus* (Peters, 1873). *Endangered Species Research*, 16, pp.5-31.
- Watson, A; Fitzgerlad, A; Damián Baldeón, O; & Elías, R. (2017a, mayo 18). Habitat characterization, occupancy and detection probability of the Endangered and endemic Junín giant frog *Telmatobius macrostomus*. *Endangered Species Research*, 32, pp.429-436.
- Watson, A; Fitzgerald, A; & Damián Baldeon, O. (2017b, febrero 7). Diet composition and prey selection of *Telmatobius macrostomus*, the Junín giant frog. *Endangered Species Research*, 32, pp.117-121.
- Wells, Kentwood. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.
- West, J. (2018). Importance of Amphibians: A Synthesis of Their Environmental Functions, Benefits to Humans, and Need for Conservation. In *BSU Honors Program Theses and Projects*. Item 261. Disponible en: https://vc.bridgew.edu/honors_proj/261
- Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R. A., Marantelli, G., Reinert, L. K., & Rollins-Smith, L. A. (2007, julio 11). Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R. A., Marantelli, G., ReinerResistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*, 10(4), pp.409-417.
- Zevallos, S; Elías, R; Berenguel, R; Weaver, T; & Reading, R. (2016). *Batrachochytrium dendrobatidis* in Confiscated *Telmatobius* in Lima, Peru. *Journal of Wildlife Diseases*, 25, pp.949-952.