



# Achados patológicos e incidentais em anuros do Ceará, nordeste brasileiro

## Pathological and incidental findings in anurans from Ceará, northeastern Brazil

Roberta da Rocha Braga\*<sup>1</sup> , Deborah Praciano de Castro<sup>2</sup> , Daniel Cassiano Lima<sup>3</sup> , Cícero Ricardo de Oliveira<sup>1</sup> , Robson Waldemar Ávila<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Oriximiná, Pará, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil.

\*Autor correspondente: roberta\_vet@yahoo.com.br

**Resumo:** Anfíbios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados globalmente, e os anuros são sua ordem mais representativa. Doenças infecciosas emergentes têm sido associadas ao declínio global das espécies de anfíbios, fenômeno relatado em todo o mundo. Na região Nordeste, o Ceará tem uma abundante anurofauna, com cerca de 5% de suas espécies sendo consideradas criticamente ameaçadas. Em projetos de pesquisa, várias patologias são observadas em anuros silvestres locais, contudo, poucos casos têm sido publicados. O objetivo deste trabalho foi reunir achados patológicos e incidentais em anuros nativos do estado do Ceará, nordeste do Brasil. Os achados foram registrados durante necrópsias e exames clínicos. A amostra incluiu 38 espécimes, distribuídos em 13 espécies, originários de 13 localidades, examinados entre 2010 e 2022. A maioria das lesões (71%, n = 38) apontou para fisiopatologia inflamatória, incluindo infecções parasitárias com agentes lesionais - lesões granulomatosas e necrotizantes com inclusões intracitoplasmáticas, compatíveis com *Mycobacteria* e Ranavírus, respectivamente. Fibrolipoma e carcinoma hepatocelular se apresentaram como nódulos únicos, estando o último associado a uma infecção helmíntica cística. Calcinose hepática difusa representou doença de etiologia tóxico/metabólica. Catarata bilateral foi a alteração ocular mais frequente (60%, n=5), mas sem diagnóstico etiológico conclusivo. Índícios de doenças infecciosas foram detectados e necessitam de técnicas complementares de diagnóstico etiológico. A falta de laboratórios locais ou parceiros com técnicas diagnósticas específicas limitou alguns diagnósticos definitivos. Os achados aqui apresentados colocam o estado do Ceará no mapa de doenças preocupantes da anurofauna, que necessitam ser monitoradas.

**Palavras-chave:** anfíbios; catarata; doenças infecciosas; necropsia; neoplasmas.

**Abstract:** Amphibians are one of the most threatened animal groups in the Earth, and the anurans are their most representative order. Emerging infectious diseases are associated with the global decline of amphibian species, reported worldwide. In northeastern Brazil, Ceará has a rich and abundant anurofauna, with almost 5% of the species considered critically endangered. Several pathologies are

Recebido: 17 de novembro, 2023. Aceito: 15 de julho, 2024. Publicado: 30 de setembro, 2024.

observed in local anuran from research projects, however, there are only a few cases published. The objective of this work was to gather pathological and incidental findings in native anurans from Ceará, northeastern Brazil. Pathological or incidental findings came from necropsies and clinical examination. The sample included 38 specimens distributed among 13 species, coming from 13 localities, examined from 2010 to 2022. The most of lesions (71%, n = 38) pointed to inflammatory pathophysiology, observing parasitic infections with the intralesional agents, a granulomatous or necrotic lesions with intracytoplasmic inclusions, compatible with Mycobacteria and Ranavirus infections respectively. Fibrolipoma and hepatocellular carcinoma presented as single solid nodules, the latter associated with a cystic helminth infection. Diffuse hepatic calcinosis represented a toxic/metabolic etiology disease. Bilateral cataract was the most frequent ocular alteration (60%, n=5) but could not have a conclusive etiologic diagnosis. Infectious diseases were evidenced, and complementary etiological diagnosis are necessary. Lack of specific etiological techniques limited some definitive diagnosis. The current findings included Ceará on the distribution map of concerning diseases of anurofauna, which must be monitored.

**Keywords:** amphibians; cataract; infectious diseases; necropsy; neoplasms.

## 1. Introdução

A ordem Anura é a de maior diversidade e representatividade entre os anfíbios, com aproximadamente 7568 espécies<sup>(1)</sup> distribuídas em praticamente todos os continentes, com exceção das regiões congeladas<sup>(2)</sup>. Suas populações são altamente vulneráveis às variações do ambiente<sup>(3)</sup>, devido a sua fisiologia metabólica e reprodutiva, com grande diversidade de modos reprodutivos, cada um dependente de condições ambientais ótimas e específicas<sup>(4,5)</sup>. Por conta das condições previamente citadas, esses animais representam um dos grupos mais ameaçados do planeta<sup>(6)</sup>.

Dentre as doenças de maior importância em anfíbios estão as infecções por *Batrachochytrium dendrobatitis* (chamado frequentemente de 'quitrídio') e Ranavirus, doenças emergentes relacionadas com o declínio global das espécies<sup>(7,8,9)</sup>. Enquanto a infecção por quitrídio tem sido registrada em diversas espécies no Brasil por pelo menos 15 anos<sup>(10,11)</sup>, apenas recentemente infecções por Ranavírus foram registradas em populações silvestres<sup>(12)</sup>. As doenças infecciosas e parasitárias podem causar efeitos extremamente negativos nas populações e comunidades de anfíbios, que podem ser aumentados sinergicamente por múltiplos fatores, tais como, mudanças climáticas, fragmentação de habitat, poluição e depressão endogâmica em pequenas populações<sup>(13)</sup>. Além disso, *Mycobacterium* sp. e infecções fúngicas podem atingir anfíbios e constituem questões de saúde pública<sup>(14,15,16)</sup>.

O estado do Ceará possui atualmente 57 espécies registradas de anfíbios<sup>(17,18)</sup>, sendo que quatro destas são endêmicas e três são consideradas criticamente ameaçadas de extinção<sup>(19)</sup>. Infecções por Ranavírus e quitrídio causam preocupação no tocante às espécies endêmicas e ameaçadas de extinção<sup>(20)</sup>. Embora essas doenças ainda não tenham sido formalmente reportadas no Ceará, já foram registradas em estados vizinhos<sup>(21,22)</sup>. No entanto, algumas patologias menores têm sido observadas em anuros nativos, mas não têm sido formalmente publicadas, ou são apenas citadas sem muito destaque em

estudos ecológicos. Micobacterioses têm sido relatadas pontualmente (Braga, dados não publicados) e mais recentemente levantadas por estudos de biologia molecular em anuros<sup>(23)</sup>. Além disso, as infecções por helmintos e ácaros estão inseridas em estudos de descrição taxonômica e ecologia parasitária<sup>(24,25,26,27)</sup>, mas nem sempre têm sua consequência patogênica descrita. Alterações metabólicas, como mineralizações orgânicas, consideradas restritas aos indivíduos *in situ*, podem ser enzoóticas em animais de produção<sup>(28)</sup>, mas raramente são descritas em animais silvestres<sup>(29)</sup> e apenas um relato em anfíbios (Braga, dados não publicados).

O objetivo deste trabalho foi reunir os achados patológicos incidentais em anuros coletados em diferentes localidades do estado no Ceará, nordeste do Brasil, examinados por mais de uma década.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Área de estudo, amostragem e aspectos éticos

De 2010 a 2022, foram examinadas diferentes espécies de anuros, coletados em diferentes municípios do estado do Ceará (nordeste do Brasil), por ocasião de projetos de pesquisa para pós-graduação e monitoramento local. A coleta dos indivíduos foi autorizada por diferentes licenças (DCL #22909-1; DPC # 39073-4; PMG # 58724-1; RWA #29613, RRB #82318) expedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por ocasião da vigência de cada projeto de pesquisa. A amostragem foi por conveniência.

Os indivíduos foram coletados por busca ativa ou captura em armadilhas de queda (*pitfalls*), em horários crepusculares e noturnos. Depois de coletados, foram identificados e submetidos à biometria (medição do comprimento rostro-cloacal [CRC] e da massa corpórea). Dependendo do objetivo de cada projeto, ora foram submetidos a exame clínico, coleta de sangue para patologia clínica, marcação por microchip subcutâneo e soltura; ora seguiram para eutanásia por sobredose de cloridrato de lidocaína injetada no forame magno, de acordo com dose preconizada por Chatigny *et al.*<sup>(30)</sup>, dentro das resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária<sup>(31)</sup> e posteriormente das diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)<sup>(32)</sup>. Procedimentos em amostra parcial foram autorizados pela CEUA-USP nº4387250118.

### 2.2. Necrópsias e procedimentos laboratoriais

Os achados de patologia clínica decorreram de esfregaços sanguíneos e avaliações citopatológicas por punção aspirativa/impressão de lesões externas, conforme Campbell<sup>(33)</sup>. Os achados patológicos ocorreram essencialmente durante necrópsias, segundo técnicas de Pessier e Pinkerton<sup>(34)</sup>, ou incidentalmente, durante avaliações clínicas/biométricas e disseções para coleta de tecidos (taxonomia molecular e status reprodutivo), dieta e parasitos. Os órgãos e tecidos alterados foram macroscopicamente descritos e amostrados

para avaliação histopatológica de acordo com Tadrous<sup>(35)</sup>. As lesões granulomatosas foram coradas por Ziehl-Neelsen (ZN) e Wade-Fite (WF) de acordo com Azulay & Andrade<sup>(36)</sup> e Greenwood & Fox<sup>(37)</sup>. Depois de examinados e terem os dados de interesse coletados, os indivíduos foram fixados em formaldeído 10%, conservados em etanol 70% e tombados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Ceará (CHUFC).

### 2.3. Análise de dados

As alterações foram classificadas em infectoparasitária/inflamatórias, tóxico-metabólicas, traumáticas e neoplásicas. Os dados foram dispostos em tabelas de contingência com a identificação dos indivíduos e respectivas espécies, as categorias de procedência (Capital, Região Metropolitana e Interior do Estado), o N amostral e as categorias de alterações com suas frequências. As prevalências dos achados, classificações e sítios de ocorrência foram expressos em porcentagem. Um teste de proporções comparou as prevalências dos principais achados entre as categorias de procedência, supondo prevalência mais baixas em locais menos antropizados. As análises estatísticas e os mapas foram produzidos no software R v. 4.2.2<sup>(38)</sup>.

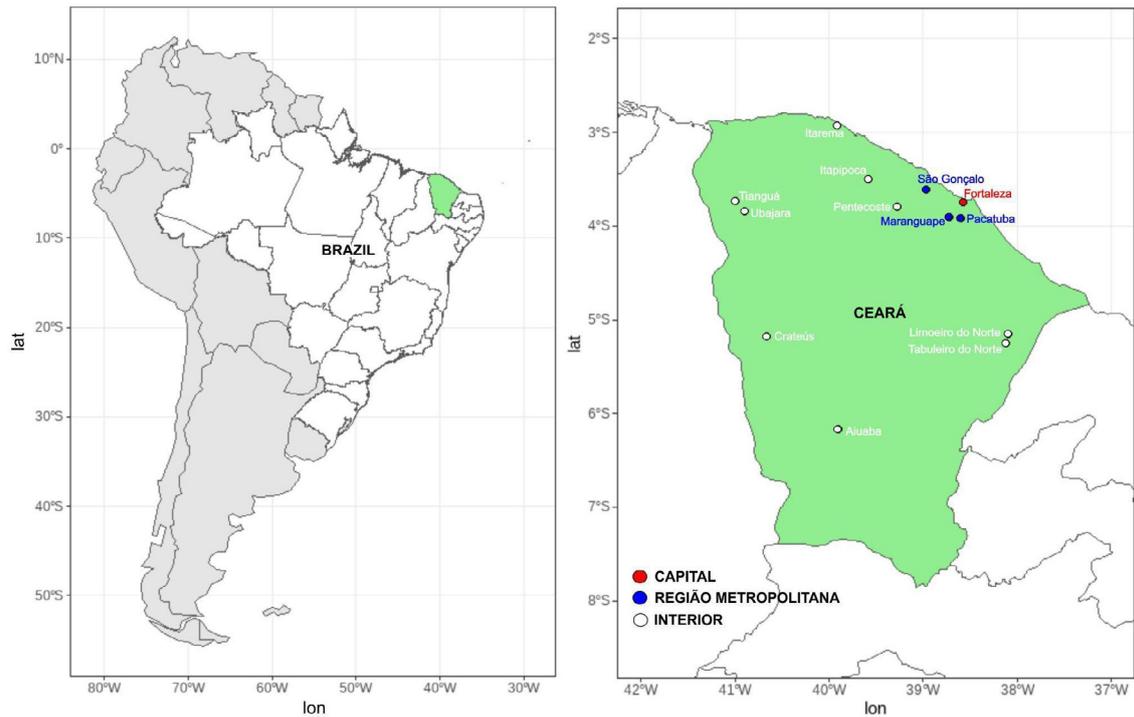
## 3. Resultados

### 3.1. Espécimes incluídos e procedências

De 2010 a 2022, foram examinados 44 espécimes de anuros, distribuídos em 13 espécies (Tabela 1), procedentes de 13 localidades (Figura 1). Seis desses 44 foram excluídos por terem sido apresentados em conferências científicas. A amostra final conteve 38 espécimes.

**Tabela 1.** Achados patológicos e incidentais em anuros no estado do Ceará. Espécies e tamanho de amostra por localidade

ESPÉCIES	PROCEDÊNCIA (QUANTIDADE)	SUBTOTAL
<i>Adelophryne maranguapensis</i>	Maranguape (n=4)	4
<i>Boana raniceps</i>	Maranguape (n=1)	1
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Fortaleza (n=1)	1
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Aiuaba (n=5), Fortaleza (n=2), Itarema (n=1), Limoeiro do Norte (n=2), Pacatuba (n=1), Tabuleiro do Norte (n=3)	14
<i>Leptodactylus troglodytes</i>	Pacatuba (n=1)	1
<i>Leptodactylus vastus</i>	Fortaleza (n=2), Maranguape (n=1), Pacatuba (n=1), Tianguá (n=2)	6
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Pentecoste (n=1), Ubajara (n=1)	2
<i>Pleurodema diplolister</i>	Maranguape (n=1)	1
<i>Pristimantis relictus</i>	Maranguape (n=1)	1
<i>Proceratophrys cristiceps</i>	Crateús (n=1), Itapipoca (n=1), Pecém (n=1)	3
<i>Rhinella diptycha</i>	Fortaleza (n=2), Ubajara (n=1)	3
<i>Trachycephalus typhonius</i>	Maranguape (n=1)	1
<b>TOTAL</b>		<b>38</b>



**Figura 1.** Achados patológicos e incidentais em anuros no estado do Ceará. Procedência dos indivíduos examinados

Por categoria de localidade, foram examinados sete indivíduos da capital Fortaleza; 13 da região metropolitana e 18 do interior do estado.

### 3.2. Achados patológicos e etiologia

Os achados patológicos segundo classificação e sítio de localização estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Achados patológicos e incidentais em anuros no estado do Ceará. Contagem e distribuição das lesões observadas

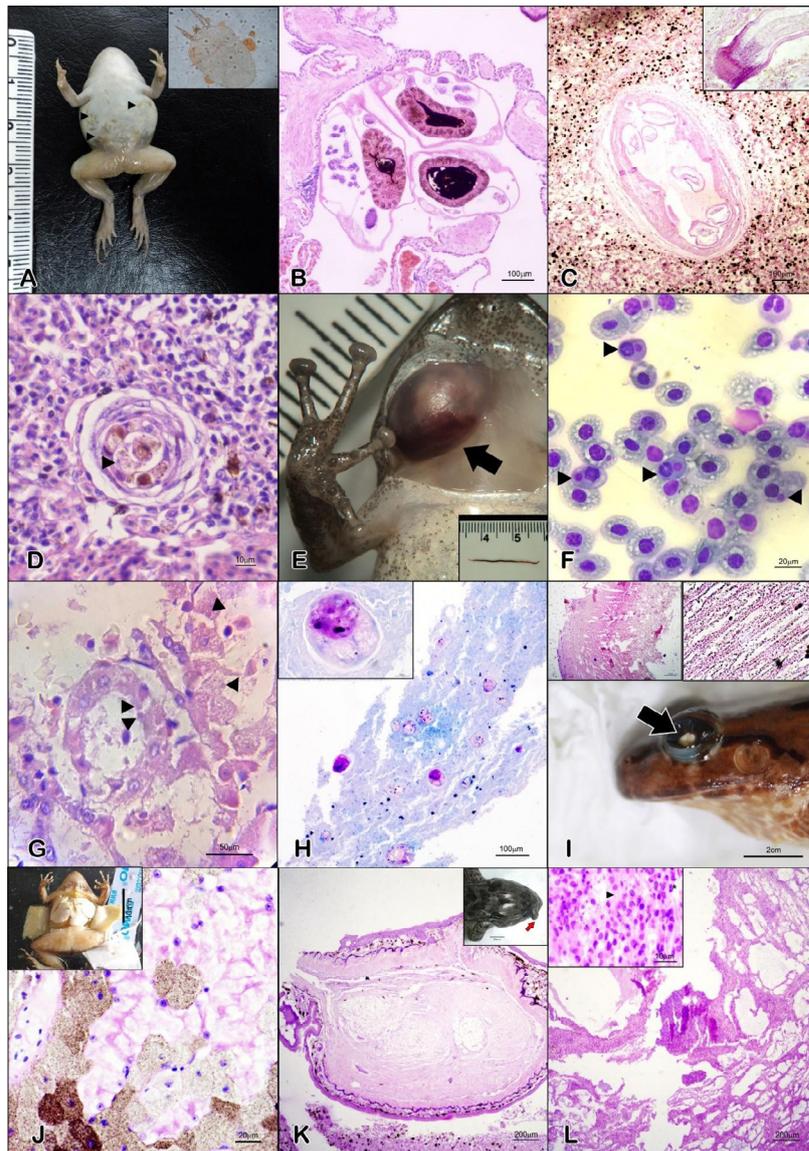
Classificação etiológica	Sítio de localização das lesões									TOTAL
	Baço	Cavidade	Estômago	Fígado	Músculo-Esquelético	Olhos	Rins	Sistêmico	Tegumento	
Infectoparasitária / Inflamatória	3	2	1	2	2	1	2	11	3	27
Neoplasia benigna									1	1
Neoplasia maligna				1						1
Tóxico/Metabólica				1		1				1
Traumática					3					3
Não classificada						5				5
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>38</b>

Mais de 60% (22/38) dos diagnósticos decorreram de necropsia, seguida de avaliação histopatológica. Os demais compreenderam apenas a necropsia (10/38), acompanhamento clínico com posterior necropsia e histopatológico (2/38), apenas patologia clínica (2/38) e apenas observação clínica (2/38). Dentre as avaliações histopatológicas, 15/22 tiveram todos os órgãos celomáticos avaliados, enquanto no restante somente foi examinado o órgão com a lesão de interesse. Mais de 70,0% (27/38) foram achados únicos, seguidos de 11/38 com achados múltiplos (dois a quatro) em diferentes órgãos. Cerca de 45,5% (5/11) de achados múltiplos podem ter decorrido da mesma etiologia, tóxica ou infectoparasitária.

Dentre as lesões observadas, 71% (27/38) apontavam para fisiopatologia inflamatória, provavelmente de etiologia infectoparasitária. Dessas, 40,7% (11/27) foram classificadas como alterações sistêmicas, por envolverem mais de um órgão simultaneamente ou alterações sanguíneas. Embora não tenha sido possível confirmar a principal etiologia ligada às alterações observadas, foram observadas 10/27 infecções parasitárias, com agente intralesional, 5/27 possíveis causas bacterianas, e 5/27 possíveis causas virais, e 5/27 agentes inconclusivos. Em 4/27 foram detectados indícios de mais de uma etiologia. Os achados estão apresentados na Figura 2.

Nas infecções parasitárias (Figura 2A-E), foram observadas dermatite parasitária multifocal leve por Trombiculidae (1/10); pneumonia parasitária granulocítica multifocal leve subaguda com Nematoda intralesional (*Rhabdias* sp.) (1/10); hepatite cística multifocal moderada com Acanthocephala intralesional (1/10); esplenite granulomatosa multifocal crônica leve por merontes de Haemogregarinidae (2/10); gastrite subserosa cística multifocal moderada crônica por larvas de Acanthocephala (*Centrorrynchus* sp.) (1/10), e miosites celomáticas murais/cavitárias císticas piogranulomatosas ou hemorrágicas focais com Nematoda intralesional (2/10), submandibular esquerda (1/10) e femoral ventral esquerda (1/10), além de um neoplasma com Nematoda intralesional, que será discutido em detalhes mais adiante. Um indivíduo com nefrite parasitária cística intersticial multifocal crônica moderada com Nematodas intralesionais também apresentou granulomas específicos, sendo contabilizado nas etiologias bacterianas (comentado a seguir).

Dentre as 5/27 lesões com prováveis etiologias virais, 1/4 indivíduos, sem sinais clínicos detectáveis, apresentou inclusões intraeritrocitárias basofílicas ao esfregaço sanguíneo, compatíveis com *Frog Erythrocytic Virus* (FEV, Iridoviridae, Figura 2F). Os demais achados (4/5) compreenderam inclusões intracitoplasmáticas anfófilicas nos tecidos (Figura 2G), sugerindo Ranavirus. Dentre as prováveis etiologias bacterianas, os achados mais frequentes foram hepatites (3/5), esplenites (2/5) e nefrites (2/5) granulomatosas. Os granulomas se apresentaram multifocais a coalescentes, capsulados, multiloculares, medindo 30 a 550µm de diâmetro, contendo macrófagos e melanomacrófagos com material fagocitado, mas inconclusivos às colorações de ZN e WF, com coloração magenta difusa no interior dos granulomas sem, no entanto, mostrar bacilos ou glóbulos bacilares individualmente corados (Figura 2H). Além disso, um indivíduo com nódulos cutâneos apresentou inflamação piogranulomatosa ao diagnóstico citológico, revelando macrófagos espumosos com material bacilar negativo no citoplasma, sugestivo de micobacteriose cutânea. Por fim, 1/27 apresentaram blefarite fibrosante com cataratas maduras, descritas macroscopicamente, supondo-se ser consequência de uma doença infecciosa, provavelmente de etiologia viral.



**Figura 2.** Achados patológicos e incidentais macro e microscópicos em anuros do Ceará. (A) *P. diplolister*, dermatite parasitária multifocal (cabeças de seta) devido à ácaros Trombiculidae (topright, 10% NaOH). (B) *R. diptycha*, pneumonia parasitária com Nematoda intralesional (*Rhabdias* sp., HE, 100x). (C) *L. vastus*, hepatite cística multifocal (HE, 100x), com *Acanthocephala* intralesional (topright, HE, 400x), e proliferação difusa de melanomacrófagos. (D) *L. macrosternum*, esplenite granulomatosa multifocal, por merontes de Haemogregarinidae (arrowhead, HE, 1000x). (E) *P. relictus*, miosite cística hemorrágica focal submandibular esquerda (seta) com Nematoda intralesional (canto inferior direito). (F) *L. macrosternum*, inclusões eosinofílicas intraeritrocitárias, compatíveis com FEV (Panótico, 400x). (G) *L. macrosternum*, inclusões intracitoplasmáticas anofílicas (cabeças de seta) em células tubulorrenais degeneradas, sugerindo infecção por Ranavirus (HE, 400x). (H) *L. macrosternum*, hepatite granulomatosa multifocal, contend macrófagos e melanomatórfagos contendo partículas fagocitadas (WF, 40x), com estruturas tipo granuloma coradas difusamente em magenta (canto superior esquerdo, WF, 1000x). (I) *L. vastus*, catarata madura bilateral (seta), com degeneração moderada das fibras secundárias da lente (canto superior esquerdo, HE, 40x), sugestivo de glóbulos Morganianos nas fibras primárias da lente (canto superior direito, HE, 1000x). (J) *P. cuvieri*, fígado difusamente aumentado e mineralizado (canto superior esquerdo), calcinose/silicose hepática difusa, mostrado hepatócitos difusamente degenerados e células de Kupffer balonzadas contendo partículas acastanhadas (HE, 400x). (K) *L. fuscus*, nódulo subcutâneo na região anteorbital direita (canto superior direito) classificado com um fibrolipoma focal (HE, 40x). (L) *B. raniceps*, carcinoma hepatocelular (HE, 40x), tipo trabecular com cinco a dez células de altura, contendo pelo menos dois *Physaloptera* sp. Nematoda (não mostrados); hepatócitos pleomórficos, com relação núcleo: citoplasma aumentada, vacuolizações esporádicas (cabeça de seta) e células binucleadas (asterisco), e padrão de distribuição de cromatina irregular de periférica fina até grosseira (HE, 1000x).

A prevalência global de etiologias infectoparasitárias/inflamatórias variou de 61,5 (região metropolitana) a 77,7% (interior); entretanto, o teste de proporções não apontou diferença significativa entre as categorias de procedências dos espécimes ( $X^2 = 0.15124$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.9272$ ). Aproximadamente 8% (3/38) dos diagnósticos foram classificados como tóxico-metabólicos e incluíram calcinose e silicose hepática difusas marcantes (Figura 2J). Outros 8% (3/38) compreenderam lesões traumáticas, como amputações de membros e/ou dígitos (2/3), luxação de quadril (1/3), e erosões ou ulcerações cutâneas (1/3). Além disso, outras duas lesões tegumentares fibrinonecróticas em região dorsal foram registradas, porém estavam associadas com alterações internas que indicaram possível doença infecciosa sistêmica. Aproximadamente 5% (2/38) incluíram neoplasias, sendo um deles fibrolipoma focal em região supra-orbital direita, e um carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado, com pelo menos dois cistos de *Physaloptera* sp. intralesionais (Figura 2K-L). Por fim, outros 13% (5/38) foram lesões oculares agrupadas como “não classificadas”. Essas incluíram catarata bilateral (3/5, Figura 1I), exoftalmia unilateral (1/5) e possível descolamento de retina unilateral (1/5), que podem ter etiologias senescência, infecciosas, traumáticas, neoplásicas ou tóxico-metabólicas.

#### 4. Discussão

Ao todo foram registrados achados histopatológicos em 13 espécies de anfíbios anuros provenientes de 13 diferentes localidades do estado do Ceará. As espécies amostradas fazem parte do *pool* regional de espécies do estado<sup>(39)</sup> e ocorrem em diferentes unidades fitoecológicas, tais como Caatinga, Brejos-de-Altitude e Matas de Tabuleiro, o que as tornam sujeitas à diferentes pressões ambientais<sup>(40,41,42,43)</sup>. A espécie mais abundante da amostra foi *L. macrosternum* ( $n=8$ ), amplamente distribuída pela América do Sul<sup>(44)</sup>, sendo encontrada em diferentes habitats ao longo da sua distribuição, incluindo aqueles com elevado nível de antropização<sup>(45)</sup>. Recentemente, esta espécie foi avaliada como bioindicadora de contaminação química por metais pesados em uma região de agrossistemas no estado do Ceará, encontrando uma probabilidade significativa de ocorrência de alterações endócrinas e linfoides na amostra examinada<sup>(46,47)</sup>.

As lesões observadas neste trabalho resultaram de diferentes processos patológicos, que sugeriram etiologias específicas. Em relação às doenças infecciosas virais e bacterianas, a não disponibilidade de laboratórios microbiológicos específicos foi um fator limitante; entretanto, os marcadores histopatológicos alertaram para a necessidade de monitoramento e implementação de projetos de pesquisa com parcerias visando conclusões diagnósticas.

Sobre os achados parasitários apresentados, sabe-se que dermatomiosite granulomatosa por ácaros Trombiculidae em anuros foi documentada em uma espécie nativa ameaçada na floresta litorânea do Chile central. Frequência de infecção de 70% (35/50) foi observada, com larvas encistadas predominantemente no *stratum spongiosum* da derme ventral e dorsal, e na musculatura dos membros posteriores, sem, no entanto, haver conclusão quanto aos efeitos negativos da carga parasitária no fitness dos hospedeiros<sup>(48)</sup>. Diferentes helmintos podem ser encontrados em intestinos de vertebrados adultos, mas quando em fase larval, Cestodas

podem provocar hemorragia e reação inflamatória, enquanto Nematodas podem se encistar em cavidade visceral<sup>(49)</sup> ou musculatura<sup>(50)</sup>. Em geral, helmintos encistados correspondem a fases larvais infectantes em hospedeiros acidentais ou paratênicos<sup>(51,52,53)</sup>. Cistos de Physalopteridae em estômagos com mínima reação inflamatória já foram relatados<sup>(54)</sup>. A infecção de sistema respiratório por *Rhabdias* spp. pode estar associada com pneumonia supurativa, infecção bacteriana secundária e necrose<sup>(55)</sup>, redução de performance, dispersão, forrageamento e evitação de predadores<sup>(56,57)</sup>. Por outro lado, as miosites apresentaram hemorragia e infiltrado granulocítico leves, hipotrofia muscular compressiva e formação de edema cavitário, com larvas de Ascarididae encistadas em parede celomática.

Considerando Acanthocephala, há pouca informação sobre patologia associada em vertebrados ectotérmicos, exceto pelos danos erosivos a órgãos e tecidos em outros ectotérmicos e espécies experimentais<sup>(58,59)</sup>. Anfíbios anuros são infectados por muitos parasitas ao longo de suas vidas<sup>(60)</sup>, especialmente em estágios larvais, provavelmente devido às suas posições críticas nas cadeias alimentares ecossistêmicas<sup>(61)</sup>. Os parasitas interferem no fitness individual, capacidades de forrageamento e reprodução, aumentando o impacto de doenças como a quitridiomiose e contribuindo para o declínio das populações de várias espécies<sup>(56,57,58,59,60,61,62)</sup>. Os três espécimes de *A. maranguapensis*, espécie local criticamente ameaçada, aqui examinados, sofriam os efeitos da miosite mural e cavitária por larvas de Nematoda. Além do exposto, os danos à espécie são ainda mais preocupantes devido ao seu tamanho corporal reduzido, no qual os parasitas podem ocupar mais de 50% do volume corporal ou cavitário, potencializando ainda mais os efeitos negativos ao desempenho físico e sobrevivência dos indivíduos afetados e contribuindo para aumentar a velocidade de redução de suas populações.

Há relativamente poucas doenças virais descritas e reportadas em anfíbios. Ranavirus (Iridoviridae) são patógenos emergentes, associados com eventos de mortalidade em massa tanto em indivíduos selvagens quanto em cativeiro<sup>(63)</sup>. A Organização Mundial de Saúde Animal incluiu os Ranavirus na lista de doenças de notificação obrigatória, devido à sua contribuição ao crescente declínio de populações de anfíbios ao redor do mundo<sup>(64)</sup>. Os surtos de mortalidade aguda acometem principalmente larvas e metamorfos, que apresentam clinicamente letargia, fraqueza, natação errática, anorexia, alterações tegumentares, edema e hemorragias externas; entretanto, dependendo da imunocompetência individual e da virulência do agente, adultos também podem ser acometidos, apresentando sinais semelhantes ou mais brandos<sup>(65)</sup>. O mecanismo de ação dos Ranavirus é a invasão preferencial de células endoteliais e morte celular, por inibição do DNA, RNA e síntese proteica<sup>(66)</sup>. Os achados patológicos são amplamente descritos e incluem hemorragias difusas e necrose tecidual, especialmente em fígado, baço e rins (incluindo seus componentes hematopoiéticos e linfóides), e ulcerações cutâneas<sup>(65)</sup>.

As inclusões intracitoplasmáticas basofílicas ou anfófilas são altamente sugestivas de infecção por Ranavirus; contudo, podem ser de difícil visualização nas amostras de tecido necrosado ao exame histopatológico convencional<sup>(65)</sup>. Os achados deste trabalho sugeriram infecção por Ranavirus e levantam a necessidade urgente da realização de inquérito

epizootiológico com métodos padrão-ouro para o diagnóstico definitivo. Um caso recente<sup>(67)</sup> descreveu um *L. vastus* macho adulto de uma reserva urbana da cidade de Fortaleza mostrando múltiplos tecidos necrosados com inclusões anfófilas intracitoplasmáticas em hepatócitos, esplenócitos, e células tubulares renais muito sugestivas<sup>(65)</sup> de infecção crônica por Ranavirus. Os 5/27 casos com diagnóstico etiológico inconclusivos vieram da reserva de Aiuaba o mostraram lesões inflamatórias e vasculares similares: fígados com moderada à difusa hiperplasia de melanomacrófagos, múltiplos sinusoides e veias centrais moderadamente congestionadas, leve à moderada balonização multifocal, hematopoiese multifocal moderada; esplenite granulomatosa multifocal moderada à marcante, com possíveis reflexos hipertensivos causando hepatopatias e nefropatias congestivas. Um dos cinco indivíduos apresentou linfócitos difusamente apoptóticos, juntamente com as alterações hepáticas e esplênicas já citadas. Devido à morfologia e à frequência dentro da amostra de uma mesma localidade, tais achados sugerem infecção viral<sup>(65)</sup>, embora inclusões intracelulares não tenham sido observadas. A micobacteriose em anfíbios tem registros consistentes na literatura, com uma frequência de 0,76% a 100% de detecção em indivíduos com lesões granulomatosas cutâneas ou viscerais evidenciadas macroscopicamente<sup>(23,68,69)</sup>. Em relação aos granulomas examinados, eventuais macrófagos epitelioides e linfócitos foram observados, mas não células gigantes.

A morfologia geral era compatível com granulomas imunes “em fase de cura”, caracterizada por material granuloso, capsulado por tecido fibroso, com caseificação variável e eventual calcificação ao centro. Ackerman<sup>(70)</sup> ressalta que as micobactérias e seus antígenos são esparsos no interior dos granulomas e que raramente são marcadas em ZN clássico ou modificado. Além disso, podem também perder as características tintoriais da parede bacteriana em infecções persistentes ou latentes<sup>(71)</sup>, e o processamento histológico (fixação em formaldeído e diafanização em xilol) reduz a sensibilidade da coloração, corando apenas 3 a 10% dos bacilos nas amostras<sup>(72)</sup>. Especula-se se a marcação magenta difusa dentro dos granulomas corresponderia à expansão de antígenos micobacterianos em macrófagos e tecido necrosado, uma vez que tal achado foi observado e quantificado experimentalmente<sup>(73)</sup>.

Considerando a morfologia semelhante dos granulomas nos demais indivíduos e o histórico epidemiológico de *M. gordonae* detectado por PCR em anuros do sul do Ceará<sup>(23)</sup>, e resultado negativo de várias amostras para coloração de PAS e Grocott (excluindo-se granulomas fúngicos), presume-se que esses cinco casos também tenham diagnóstico etiológico de micobacteriose visceral. A micobacteriose visceral em anfíbios vem sendo relatada há mais de um século na Europa<sup>(74,75,76,77)</sup>, e há várias décadas no Brasil<sup>(78,79,80)</sup>; além disso, a morfologia já descrita tem sido concordante os atuais achados. As micobactérias atípicas nem sempre têm potencial zoonótico conhecido. A espécie *M. gordonae*, já detectada em anfíbios do Ceará<sup>(23)</sup>, e dentre várias outras micobactérias não-tuberculosas, costuma ser considerada uma bactéria ubíqua não-patogênica; entretanto, existem registros de causar infecção oportunista em humanos imunocomprometidos<sup>(81)</sup>. Em animais colonizados, o aumento do estresse pelas condições adversas no cativeiro pode produzir surtos com lesões exuberantes<sup>(82)</sup>. Por outro lado, um caso anteriormente descrito de granulomatose multifocal

marcante, com bacilos álcool-ácido positivos para ZN provavelmente indicaram uma infecção por bactéria do grupo *M. tuberculosis* (Braga, dados não publicados), o que é considerado um achado zoonótico preocupante.

Interação com predadores é considerada a maior causa de lesões traumáticas em anuros<sup>(83,84)</sup>. Pesquisadores no Panamá descobriram que a lesão mais frequente em uma amostra de *Dendrobates auratus* foi a amputação de dígitos, registrada em 89,9% (532/592), e com menor frequência fratura e amputação de membros, e enucleação ocular<sup>(85)</sup>. Os presentes dados mostraram alterações músculo-esqueléticas em indivíduos depositados na CHUFC, com amputação de mão, pé e perna completa, deixando extremidades ósseas de rádio-ulna e tíbia expostas com tecido moles adjacentes cicatrizados. Acredita-se que tais alterações possam ter deixado os indivíduos em questão mais suscetíveis à captura manual nas expedições de pesquisa relacionadas.

Animais ectotérmicos terrestres podem desenvolver distúrbios metabólicos que culminem com a mineralização de articulações, órgãos e tecidos moles por deposição de cristais nitrogenados (gota úrica) ou de cálcio (pseudogota ou calcinose)<sup>(86)</sup>. Raros relatos estão disponíveis em ectotérmicos terrestres silvestres, exceto em tartarugas marinhas<sup>(51)</sup>. Geralmente tais achados estão associados a desequilíbrios dietéticos em animais de cativeiro. *Calcinosis circumscripta* foi observada em larvas de *Lithobates* (sin. *Rana*) *catesbeianus* em áreas próximas a estação de tratamento de esgotos<sup>(87)</sup>. Em achados de necropsia sem histórico clínico, se faz necessário uso de exames complementares para fazer o diagnóstico diferencial entre a gota e a calcinose. Previamente apresentados em conferência científica, 3/4 registros de calcinose hepática foram relatados (Braga, dados não publicados), utilizando microscopia eletrônica e polarizada para confirmar o diagnóstico de calcinose/silicose, e a fisiopatologia sugerida foi ingestão crônica de aditivos agrícolas à base de silicatos, produzindo hipomagnesemia e hipercalcemia, levando à insuficiência renal crônica, com deposição de cálcio em órgãos e tecidos moles (Braga, dados não publicados). Mais um caso semelhante e oriundo do mesmo local foi incluído no presente estudo.

Tumores de crescimento espontâneo têm sido relatados em anfíbios desde 1868<sup>(88)</sup>. Em revisão recente, foram listados 24 relatos de tumores benignos e 26 de malignos distribuídos em 28 espécies de anfíbios (18 anuros e 10 caudados), dentre os quais os cromatoforomas (18%), os linfomas e leucemias (12%) e os papilomas (10%)<sup>(89)</sup>. Vinte e quatro por cento dos casos levantados foram tratados com cirurgia e tiveram sobrevida de 0,8 a 46 meses. Dois casos de lipomas foram relatados, que se diferenciam do fibrolipoma descrito neste trabalho pela ausência das bandas fibrosas que envolvem o nódulo de tecido adiposo. Nenhum hepatocarcinoma espontâneo foi listado, o que indica que este é um neoplasma raro ou nunca antes registrado em anfíbios; contudo, a injeção subcutânea experimental de dietilestilbestrol em *Rana temporaria* produziu 7/38 casos de neoplasia hematopoiética e 2/38 de hepatocarcinoma indiferenciado<sup>(90)</sup>, o que pode indicar ação de xenobiótico ambiental como gatilho do caso aqui observado. Os Nematodas encistados no interior do tumor aqui observado podem estar relacionados com inflamação crônica e consequente carcinogênese. Já é estabelecida a participação de helmintos Trematodas na carcinogênese hepática<sup>(91)</sup>;

quanto aos Nematodas, foi proposto recentemente que o fato desses helmintos produzirem TGF- $\beta$  para modular a resposta imune do hospedeiro a favor de sua sobrevivência pode favorecer também a proliferação de células neoplásicas, através da regulação negativa da imunidade antitumoral<sup>(92)</sup>.

A alteração ocular unilateral observada em um *L. vastus* não foi classificada, devido à incerteza de sua etiologia. Inicialmente, foi classificada como “traumática”; no entanto, oculopatias infecciosas em animais podem cursar com descolamento e atrofia da retina, atribuídas a infecções virais<sup>(93)</sup>. Nos EUA, um espécime metamorfo silvestre de *L. catesbeianus* apresentou má formação ocular unilateral, com redução de volume do globo, fibrose da esclerótica e granulomas, que foram associados a partículas virais de Ranavirus (FV-3)<sup>(94)</sup>. As retinopatias são raras, embora haja relatos pontuais de descolamento de retina por necrose aguda associada à dermatossepticemia por bactérias gram-negativas em indivíduos *ex situ*<sup>(95,96)</sup>. Em humanos, retinopatias virais são bem descritas, com fisiopatologia derivada de danos teciduais diretos e por deposição de imunocomplexos por antígenos de Herpesvirus e Rubivirus<sup>(97)</sup>. Tais mecanismos também podem ser atribuídos a Ranavirus e seus congêneres, cuja replicação tem preferência por células epiteliais, endoteliais e linfoides, causando vasculites fibrinóides potencialmente em qualquer órgão<sup>(98)</sup>. Incluindo membros da família Iridoviridae, várias espécies de vírus podem produzir deposição de imunocomplexos, agravando a morbidade<sup>(99)</sup>. Além disso, podem também causar autoimunidade retinal<sup>(100)</sup>.

## 5. Conclusão

A necropsia demonstrou ser uma ferramenta fundamental na vigilância em saúde de anuros no Ceará. A avaliação pós-morte foi capaz de identificar diversas doenças em espécimes sem sinais clínicos externos. A análise de indivíduos de coleções científicas foi fundamental uma vez que são um repositório de informações sanitárias da fauna local. Lesões sugestivas de infecções por Ranavirus foram detectadas, e diagnóstico etiológico complementar se faz necessário. Como possíveis etiologias, Micobactérias atípicas são preocupantes devido ao potencial zoonótico ainda desconhecido. Lesões parasitárias acentuadas foram observadas e preocupam devido a possíveis efeitos em capacidade fisiológica individual e ecológica. Esses achados incluem o Ceará no mapa de distribuição de importantes doenças da anurofauna que precisam ser monitoradas.

## Conflito de Interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses.

## Contribuições dos autores

*Conceituação:* RR Braga. *Curadoria de dados:* RR Braga, DP de Castro, DC Lima e CR Oliveira. *Análise formal:* RR Braga. *Aquisição de Financiamento:* DC Lima e RW Ávila. *Investigação:* RR Braga, DP de Castro e DC Lima. *Metodologia:* RR Braga. *Administração do projeto:* RR Braga. *Redação (esboço original):* RR Braga. *Redação (revisão e edição):* RR Braga, DP de Castro, DC Lima, CR Oliveira e RW Ávila.

## Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer à Dra Diva Maria Borges-Nojosa e Dr. Paulo Cascon (UFC); Dr. Daniel Viana de Araújo (Laboratório Pathovet); estudantes de pós-graduação do PPGERN e PPGSis-UFC, e toda a equipe do NUROF-UFC. Também gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código Financeiro nº001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos 12 anos de financiamento aos nossos projetos de pesquisa (Processos nº 304929/2012-3; 401800/2013-0; 402241/2016-9; 305988/2018-2; 307722/2021-0).

## Referências

1. Frost D. Amphibian species of the world [Internet]. Amphibian Species of the World 6.1, an Online Reference. [cited 2023 Mar 12]. Available from: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
2. Wells KD. The Ecology & Behavior of Amphibians. Chicago: The University of Chicago Press; 2007.
3. Duellman WE, Trueb L. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill; 1986.
4. Nunes-de-Almeida CHL, Haddad CFB, Toledo LF. A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*. 2021;57(3):413-427. Available from: <https://www.salamandra-journal.com/index.php/contents/2021-vol-57/2054-nunes-de-almeida-c-h-l-c-f-b-haddad-l-f-toledo-1/file>
5. Thibaudeau G, Altig R. Endotrophic Anurans. In: McDiarmic R, Altig R, editors. Tadpoles: the biology of anuran larvae. Chicago: The University of Chicago Press; 1999. p. 170-80.
6. Harfoot MJB, Johnston A, Balmford A, Burgess ND, Butchart SHM, Dias MP, et al. Using the IUCN Red List to map threats to terrestrial vertebrates at global scale. *Nature Ecology & Evolution*. 2021;5:1510-1519. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01542-9>
7. Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases*. 1999;5(6):735-748. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid0506.990601>
8. Densmore CL, Green DE. Diseases of amphibians. *ILAR Journal*. 2007;48(3):235-54. Available from: <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.235>
9. Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*. 2019;363(6434):1459-1463. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
10. Carvalho T, Becker CG, Toledo LF. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017;284(1848):20162254. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.2254>
11. Toledo LF, Britto FB, Araújo O, Giasson L, Haddad C. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*. 2006;1(3):185-91. Available from: [https://doi.org/10.2994/1808-9798\(2006\)1\[185:TOOBDI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2994/1808-9798(2006)1[185:TOOBDI]2.0.CO;2)
12. Ruggeri J, Ribeiro LP, Pontes MR, Toffolo C, Candido M, Carriero MM, et al. Discovery of Wild Amphibians Infected with Ranavirus in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 2019;55(4):897-902. Available from: <https://doi.org/10.7589/2018-09-224>
13. Herczeg D, Ujszegi J, Kásler A, Holly D, Hettyey A. Host–multiparasite interactions in amphibians: a review. *Parasites & Vectors*. 2021;14(1):296. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04796-1>
14. Pessier AP. Amphibia. In: McAloose D, Leger JS, Terio KA, editors. Pathology of wildlife and zoo animals. London: Academic Press an imprint of Elsevier; 2018. p.919-950.
15. Darzins E. The epizootic of tuberculosis among the Gias in Bahia. *Acta Tuberculosea Scandinavica*. 1952;26(1-2):170-174. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14952353/>
16. Bartralot R, Pujol RM, García-Patos V, Sitjas D, Martín-Casabona N, Coll P, et al. Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2000;27(3):124-129. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2000.027003124.x>

17. Cassiano-Lima D, Ávila RW, Castro DP, Roberto IJ, Borges-Nojosa DM. Lista de anfíbios do Ceará [Internet]. SEMA-CE. 2021 [cited 2023 Mar 10]. Available from: <https://www.sema.ce.gov.br/fauna-do-ceara/vertebrados/anfibios/>
18. Roberto IJ, Loebmann D. Composition, distribution patterns, and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. *Salamandra*. 2016;52(2):134-152. Available from: <https://www.salamandra-journal.com/index.php/contents/2016-vol-52/569-roberto-i-j-d-loebmann/file>
19. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete do Ministro. Portaria no 148. Atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção Brasília, DF; 2022. Portuguese. Available from: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_ameacadas\\_extincao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf)
20. Preuss JF, Lambertini C, Leite D da S, Toledo LF, Lucas EM. *Batrachochytrium dendrobatidis* in near threatened and endangered amphibians in the southern Brazilian Atlantic Forest. *North Western Journal of Zoology*. 2015;11(2):360-362. Available from: [https://biozoojournals.ro/nwjz/content/v11n2/nwjz\\_142504\\_Preuss.pdf](https://biozoojournals.ro/nwjz/content/v11n2/nwjz_142504_Preuss.pdf)
21. Benício RA, Carvalho T, Barbosa MD, Costa J de, da Silva FC, Fonseca MG. Worrying news for Brazilian Caatinga: Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibians. *Tropical Conservation Science*. 2019;12:194008291989262. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1940082919892626>
22. Carnaval AC, Puschendorf R, Peixoto OL, Verdade VK, Rodrigues MT. Amphibian Chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth*. 2006;3(1):41-48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-005-0008-2>
23. Morais D, Rodrigues M, Ávila R, da Silva R. Visceral mycobacteriosis in amphibians from the Brazilian Caatinga region. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2021;145(34):139-144. Available from: <https://doi.org/10.3354/dao03604>
24. Bassini-Silva R, Huang-Bastos M, Morais DH, Alcantara EP, Ávila RW, Welbourn C, et al. A new species of *Hannemania* oudemans, 1911 (Trombidiformes: Leeuwenhoekiiidae) from Brazil. *Journal of Natural History*. 2021;55(19-20):1277-1287. Available from: <https://doi.org/10.1080/00222933.2021.1944687>
25. Lins AGS, Aguiar A, Morais DH, Firmino da Silva LA, Ávila RW, Silva RJ. Helminth fauna of *Leptodactylus syphax* (Anura: Leptodactylidae) from Caatinga biome, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017;(1):74-80. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017013>
26. Mascarenhas W, Oliveira CR, Benício RA, Ávila RW, Ribeiro SC. Nematodes of *Proceratophrys ararype* (Anura: Odontophrynidae), an endemic frog from the Araripe Plateau, northeastern Brazil. *Biota Neotropica*. 2021;21(3):e20201164. Available from: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1164>
27. Oliveira CR, Ávila RW, Morais DH. Helminths Associated with Three Physalaemus Species (Anura: Leptodactylidae) from Caatinga Biome, Brazil. *Acta Parasitologica*. 2019;64(1):205-212. Available from: <https://doi.org/10.2478/s11686-018-00022-8>
28. Machado M, Castro MB, Gimeno EJ, Barros SS, Riet-Correa F. Enzootic calcosinosis in ruminants: A review. *Toxicon*. 2020 Nov;187:1-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.009>
29. Wagener MG, Lehmecker A, Bühler M, Wilkens M, Punsmann T, Ganter M. Calcosinosis in a roe deer fawn (*Capreolus capreolus*) in Northern Germany. *BMC Veterinary Research*. 2020;16(1):406. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02615-w>
30. Chatigny F, Kamunde C, Creighton CM, Stevens ED. Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2017;56(3):244-253. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378704>
31. Brasil. Resolução nº1000 de 11 de Maio de 2012. [Internet]. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária, [Cited 2022 Set 18]. Portuguese. Available from: <http://ts.cfmv.gov.br/manual/arquivos/resolucao/1000.pdf>
32. Brasil. Resolução No 55, de 5 de Outubro de 2022. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica. [Internet]. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, [Cited 2022 Dec 15]. Portuguese. Available from: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>
33. Campbell TC. *Exotic Animal Hematology and Cytology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. 402 p.

34. Pessier AP, Pinkerton M. Practical gross necropsy of amphibians. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2003;12(2):81-88. Available from: <https://doi.org/10.1053/saep.2003.127884>
35. Tadrous PJ. *Diagnostic Criteria Handbook in Histopathology: a surgical pathology vade mecum*. 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. 422 p.
36. Azulay R, Andrade L. Demonstration of *Mycobacterium leprae* in sections in 532 cases of leprosy: comparative study between the Ziehl-Klingmuller and the Wade-Fite techniques. *International Journal of Leprosy*. 1954;22(2):195-199. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13211040/>
37. Greenwood N, Fox H. A comparison of methods for staining tubercle bacilli in histological sections. *Journal of Clinical Pathology*. 1973;26(4):253-257. Available from: <https://doi.org/10.1136/jcp.26.4.253>
38. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; 2022. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org/>.
39. Roberto IJ, Loebmann D. Composition, distribution patterns, and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil. *Salamandra*. 2016;52(2):134-152. Available from: <https://www.salamandra-journal.com/index.php/contents/2016-vol-52/569-roberto-i-j-d-loebmann/file>
40. Borges-Leite MJ, Mota-Rodrigues JF, Borges-Nojosa DM. Herpetofauna of a coastal region of northeastern Brazil. *Herpetology Notes*. 2014;7:405-413. Available from: <https://www.seh-herpetology.org/journals/herpetology-notes/back-issues/volume-7-2014>
41. Castro DP, Mângia S, Magalhães F de M, Röhr DL, Camurugi F, Silveira-Filho RR da, et al. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga VI: the Ubajara National Park, Ceará, Brazil. *Herpetology Notes*. 2019;12:727-742. Available from: <https://www.biotaxa.org/hn/article/view/31446>
42. Castro DP, Mota-Rodrigues JF, Cassiano-Lima D, Borges-Nojosa DM. Composition and diversity of anurans from rock outcrops in the Caatinga Biome, Brazil. *Herpetology Notes*. 2018;11:189-195. Available from: <https://www.biotaxa.org/hn/article/view/23510>
43. Ribeiro SC, Roberto IJ, Sales DL, Ávila RW, Almeida WO. Amphibians and reptiles from the Araripe bioregion, northeastern Brazil. *Salamandra*. 2012;48(3):133-146. Available from: <https://www.salamandra-journal.com/index.php/contents/2012-vol-48/292-ribeiro-s-c-i-j-roberto-d-l-sales-r-w-avila-w-o-almeida/file>
44. Magalhães FM, Lyra ML, Carvalho TR, Baldo D, Brusquetti F, Burella P, et al. Taxonomic Review of South American Butter Frogs: Phylogeny, Geographic Patterns, and Species Delimitation in the *Leptodactylus latrans* Species Group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*. 2020;34(1):131-177. Available from: <https://doi.org/10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-19-00012>
45. Chaves MF, Moura GJB, Baptista JS, Dantas AP, Teixeira VW, Teixeira AAC. Environmental and abiotic factors interfere in *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae) reproduction despite no changes in sexual hormones levels. *Research, Society and Development*. 2021;10(8):e46110817627. Available from: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17627>
46. Braga RR, Gondim PM, Matushima ER. Histopathology of Endocrine Organs of Miranda's White-Lipped Frogs (*Leptodactylus macrosternum*) from Cultivated and Non-Cultivated Regions in Semi-Arid Northeastern Brazil. *Journal of Comparative Pathology*. 2022;192:1-10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.12.002>
47. Braga RR, Gondim PM, Pereira RM, Batista BL, Matushima ER. *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator of potentially toxic chemical elements in irrigated perimeters in northeastern Brazil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 2022;4:124-131. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2022.02.003>
48. Alvarado-Rybak M, Valenzuela-Sánchez A, Cevitanes A, Peñafiel-Ricaurte A, Uribe-Rivera DE, Flores E, et al. High prevalence of chigger mite infection in a forest-specialist frog with evidence of parasite-related granulomatous myositis. *Parasitology Research*. 2018;117(5):1643-1646. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5822-x>
49. Aisien MSO, Uwagbae M, Edo-Taiwo O, Imasuen AA, Ovwah E. Pattern of parasitic infections in anurans from a mangrove community of the Niger Delta, Nigeria. *Zool*. 2015;13(December):50-5. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/tzool/article/view/142143/131882#:~:text=oxyrynchus.,%25%20and%20nematodes%2C%2028.96%25.>

50. Umberger CM, de Buron I, Roumillat WA, McElroy EJ. Effects of a muscle-infecting parasitic nematode on the locomotor performance of their fish host. *J Fish Biol.* 2013 Apr 13;82(4):1250-8. Available from: <https://doi.org/10.1111/jfb.12061>
51. Kölle P, Hoffman R. Incidence of nephropathies in European Tortoises. *Proceedings of the Association of Reptiles and Amphibians Veterinarians.* 2002;33-35.
52. Galindo GM, Rodrigues RA, Marcondes SF, Soares P, Tavares LER, Fernandes CE. Morphological and morphometric features of nematode-cysts in *Gymnotus inaequilabiatus* liver in the Brazilian Pantanal. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2017;26(3):285-291. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017044>
53. Melo FTV, Melo CSB, Nascimento LCS, Giese EG, Furtado AP, Santos JN. Morphological characterization of *Eustrongylides* sp. larvae (Nematoda, Dioctophymatoidea) parasite of *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Eastern Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2016;25(2):235-239. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016024>
54. Jones HI. Pathology associated with Physalopterid larvae (Nematoda: Spiruridae) in the gastric tissues of Australian reptiles. *Journal of Wildlife Diseases.* 1995;31(3):299-306. Available from: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.3.299>
55. Juan-Sallés C, Almagro V, Carbonell L, Valls X, Montesinos A, Fernández-Bellón H. Enfermedades infecciosas y parasitarias en anfibios en cautividad: estudio retrospectivo de 131 pacientes. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales.* 2020;40(1):15-27. Available from: <https://www.clinvetpeqanim.com/img/pdf/2025110247.pdf>
56. Goater CP, Semlitsch RD, Bernasconi MV. Effects of Body Size and Parasite Infection on the Locomotory Performance of Juvenile Toads, *Bufo bufo*. *Oikos.* 1993;66(1):129-136. Available from: <https://doi.org/10.2307/3545205>
57. Wetsch O, Strasburg M, McQuigg J, Boone MD. Is overwintering mortality driving enigmatic declines? Evaluating the impacts of trematodes and the amphibian chytrid fungus on an anuran from hatching through overwintering. *PLOS ONE.* 2022;17(1):e0262561. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262561>
58. Sanil NK, Asokan PK, John L, Vijayan KK. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis* sp. in the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskål, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. *Aquaculture.* 2011;310(3-4):259-266. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.027>
59. Choi C-J, Lee H-J, Go J-H, Park Y-K, Chai J-Y, Seo M. Extraintestinal Migration of *Centrorhynchus* sp. (Acanthocephala: Centrorhynchidae) in Experimentally Infected Rats. *The Korean Journal of Parasitology.* 2010;48(2):139-143. Available from: <https://doi.org/10.3347/kjp.2010.48.2.139>
60. Stutz WE, Blaustein AR, Briggs CJ, Hoverman JT, Rohr JR, Johnson PTJ. Using multi-response models to investigate pathogen coinfections across scales: Insights from emerging diseases of amphibians. *Methods in Ecology and Evolution.* 2017;9(4):1109-1120. Available from: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12938>
61. Campião KM, Ribas AC de A, Morais DH, Silva RJ da, Tavares LER. How Many Parasites Species a Frog Might Have? Determinants of Parasite Diversity in South American Anurans. *PLOS ONE.* 2015;10(10):e0140577. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140577>
62. Szuroczki D, Richardson JML. The role of trematode parasites in larval anuran communities: an aquatic ecologist's guide to the major players. *Oecologia.* 2009;161(2):371-385. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1388-8>
63. Miller D, Gray M, Storfer A. Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians. *Viruses.* 2011 Nov 22;3(11):2351-73.
64. World Organisation for Animal Health. Infection with Ranavirus [Internet]. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.* 2022 [cited 2022 Nov 1]. Available from: <https://www.woah.org/en/disease/ranaviriosis/>
65. Miller DL, Pessier AP, Hick P, Whittington RJ. Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. In: Gray MJ, Chinchar VG, editors. *Ranaviruses lethal pathogens of ectothermic vertebrates.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 171-208.

66. Jancovich JK, Qin Q, Zhang Q, Chinchar VG. Ranavirus Replication: Molecular, Cellular, and Immunological Events. In: Gray MJ, Chinchar VG, editors. Ranaviruses lethal pathogens of ectothermic vertebrates. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 105-140.
67. Braga RR, Eleutério BKN, Lima RCS, Quirino TF. Marked systemic necrotizing disease in a *Leptodactylus vastus* (Anura: Leptodactylidae) from an urban reserve in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2023;16(3):203-207. Available from: DOI: <https://10.24070/bjvp.1983-0246.v16i3p203-207>
68. Fremont-Rahl JJ, Ek C, Williamson HR, Small PLC, Fox JG, Muthupalani S. *Mycobacterium liflandii* Outbreak in a Research Colony of *Xenopus* (Silurana) tropicalis Frogs. *Veterinary Pathology*. 2011;48(4):856-867. Available from: <https://doi.org/10.1177/0300985810388520>
69. Milnes EL, Delnatte P, Lentini A, May K, Ma J, Jamieson FB, et al. Mycobacteriosis in a Zoo Population of Chinese Gliding Frogs (*Rhacophorus dennysi*) Due to *Mycobacterium marinum*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 2020;30(1):14-20. Available from: <https://doi.org/10.5818/19-03-186.2>
70. Ackermann M. Inflammation and Healing. In: Zachary JF, editor. *Pathologic basis of veterinary diseases*. 7th ed. Saint Louis: Elsevier; 2022. p. 104-170.
71. Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl L, Jörg S, Krenn V, et al. Cell-Wall Alterations as an Attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in Latent Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003;188(9):1326-1331. Available from: <https://doi.org/10.1086/378563>
72. Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensitivity of Acid-Fast Staining for Mycobacterium tuberculosis in Formalin-fixed Tissue. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;166(7):994-997. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.2111028>
73. Riaz SM, Bjune GA, Wiker HG, Sviland L, Mustafa T. Mycobacterial antigens accumulation in foamy macrophages in murine pulmonary tuberculosis lesions: Association with necrosis and making of cavities. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020;91(4): e12866. Available from: <https://doi.org/10.1111/sji.12866>
74. Elkan E. Some interesting pathological cases in amphibians. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1960;134(2):275-296. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1960.tb05593.x>
75. Griffith A. Tuberculosis in cold-blooded animals. In: *A system of bacteriology*. London: Medical Research Council; 1930. p. 326-332.
76. Küster E. Über Kaltblütertuberkulose. *Munchener medizinische Wochenschrift*. 1905;52:57-59 (cited by Barros et al., 1988).
77. Lichtenstein S. Ein Fall von spontaner Froschtuberkulose. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde*. 1920;85:249-252 (cited by Barros et al., 1988).
78. Barros G, Langenegger C, Langenegger J, Peixoto P. Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbeiana*) causado por *Mycobacterium marinum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1988;8(3/4):75-80. Portuguese.
79. Darzins E. The epizootic of tuberculosis among the Gias in Bahia. *Acta Tuberculosea Scandinavica*. 1952;26(1-2):170-174. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14952353/>
80. Ferreira R, Fonseca L de S, Afonso AM, da Silva MG, Saad MH, Lilenbaum W. A report of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *The Veterinary Journal*. 2006;171(1):177-180. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.08.018>
81. Bartralot R, Pujol RM, García-Patos V, Sitjas D, Martín-Casabona N, Coll P, et al. Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2000;27(3):124-129. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2000.027003124.x>
82. Sánchez-Morgado JM, Gallagher A, Johnson LK. *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Laboratory Animals*. 2009;43(3):300-303. Available from: <https://doi.org/10.1258/la.2008.008035>
83. Dubois A. Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana esculenta* complex (Amphibia, Anura). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin Zoologisches Museum und Institut für Spezielle Zoologie [Berlin]*. 1979;55(1):59-87.

84. Martof B. Factors influencing size and composition of populations of *Rana clamitans*. *American Midland Naturalist*. 1956;56(1):224-245. Available from: <http://dx.doi.org/10.2307/2422457>
85. Gray HM, Ouellet M, Green DM, Rand AS. Traumatic injuries in two neotropical frogs, *Dendrobates auratus* and *Physalaemus pustulosus*. *Journal of Herpetology*. 2002;36(1):117-121. Available from: [http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511\(2002\)036\[0117:tiitnf\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1670/0022-1511(2002)036[0117:tiitnf]2.0.co;2)
86. Orós J. Pseudogout. In: Divers SJ, Stahl SJ, editors. *Mader's reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. St. Louis, MO: Elsevier; 2019. pp.1333-1334.
87. Keel MK, Ruiz AM, Fisk AT, Rumbelha WK, Davis AK, Maerz JC. Soft-tissue mineralization of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) at a wastewater treatment facility. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2010;22:655-660. Available from: <https://doi.org/10.1177/104063871002200430>
88. Balls M. Spontaneous Neoplasms in Amphibia: A Review and Descriptions of Six New Cases. *Cancer Research*. 1962;22(10):1142-1154. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/22/10/1142/474833/Spontaneous-Neoplasms-in-Amphibia-A-Review-and>
89. Hopewell E, Harrison SH, Posey R, Duke EG, Troan B, Harrison T. Analysis of Published Amphibian Neoplasia Case Reports. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 2020;30(3):148-155. Available from: <https://doi.org/10.5818/19-09-212.1>
90. Khudolei V, Ermoshchenkov V. Carcinogenic action of diethylstilbestrol on frogs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1976;81:898-900. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00803017>
91. Abdel-Rahim AY. Parasitic Infections and Hepatic Neoplasia. *Digestive Diseases*. 2001;19(4):288-291. Available from: <https://doi.org/10.1159/000050695>
92. Maruszewska-Cheruiyot M, Stear MJ, Machcińska M, Donskow-Łysoniewska K. Importance of TGFβ in Cancer and Nematode Infection and Their Interaction—Opinion. *Biomolecules*. 2022;12(11):1572. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom12111572>
93. Aroch I, Ofri R, Sutton GA. Ocular Manifestations of Systemic Diseases. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 2008;374-418. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-072160561-6.50021-6>
94. Burton EC, Miller DL, Styer EL, Gray MJ. Amphibian ocular malformation associated with frog virus 3. *The Veterinary Journal*. 2008;177(3):442-444. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.006>
95. Brooks DE, Jacobson ER, Wolf ED, Clubb S, Gaskin JM. Panophthalmitis and otitis interna in fire-bellied toads. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1983;183(11):1198-201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6643232/>
96. Olson ME, Gard S, Brown M, Hampton R, Morck DW. *Flavobacterium indologenes* infection in leopard frogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1992;201(11):1766-1770. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1293124/>
97. Weiter JJ, Roh S. Viral infections of the choroid and Retina. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1992;6(4):875-891. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1460268/>
98. Forzán MJ, Jones KM, Ariel E, Whittington RJ, Wood J, Markham RJ, et al. Pathogenesis of Frog Virus 3 (*Ranavirus*, *Iridoviridae*) infection in wood frogs (*Rana sylvatica*). *Veterinary Pathology*. 2017;54(3):531-548. Available from: <https://doi.org/10.1177/0300985816684929>
99. Monini M, Ruggeri FM. Antigenic peptides of the Epizootic hematopoietic necrosis virus. *Virology*. 2002;297(1):8-18. Available from: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1410>
100. Hooks JJ, Detrick B, Nussenblatt R. Infections associated with retinal autoimmunity. *Infection and Autoimmunity*. 2004:691-700. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-044451271-0.50054-5>