

NÓDULOS COM DEPÓSITO DE CÁLCIO EM GIRINOS E IMAGOS DE RÃ TOURO
(*Rana catesbeiana* SHAW, 1802)*

[Nodules with calcium deposit in bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802)
tadpole and imago]

Março HIPOLITO ^{1,4}
Lucia BALDASSI ²
Ercilia Maria Borgheresi CALIL ²
Aurélia Archanja Procaci MOULIN ²
Romeu MACRUZ ³

RESUMO

É relatada a ocorrência de nódulos subcutâneos em girinos e imagos de rã touro, *Rana catesbeiana*, no Estado de São Paulo, Brasil. Inicialmente foi observada alta mortalidade de girinos nas primeiras fases da metamorfose e posteriormente em imagos e rãs jovens. Os girinos apresentavam formações nodulares subcutâneas na cauda e na porção inferior da cabeça e as rãs jovens o mesmo tipo de formação na cabeça. Os nódulos eram esféricos, amarelados, capsulados, únicos ou agrupados, medindo de 2 a 3mm de diâmetro com conteúdo denso. O exame histopatológico evidenciou na formação nodular um grande depósito de sais de cálcio. Não se observou comprometimento do tecido muscular periférico e não se caracterizou a constituição de abscessos, face à ausência de células inflamatórias. O exame bacteriológico do conteúdo nodular e do fígado revelou a presença de *Streptococcus* spp; *Corynebacterium* spp, *Citrobacter freundii* e *Aeromonas hydrophila*. A pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes foi negativa. É aventada origem metabólica irritativa, conseqüente a um processo infeccioso.

PALAVRAS-CHAVE: rã touro, *Rana catesbeiana*, nódulos subcutâneos, patologia

ABSTRACT

It's described the occurrence of nodule in tadpole and imago of bullfrog *Rana catesbeiana* in São Paulo State, Brazil. Initially it was observed a great mortality of tadpole in metamorphosis phases and after that the mortality was also observed in imago and young frogs. For tadpoles this pathology was noted in subcutaneous tissue of on the tail and posterior portion of head. The nodules were round, with 2-3.0mm of diameter with a dense content. The hystopathological examination showed a calcium deposit inside the nodulation without abscess characteristic because of the lack of inflammatory cells. The bacteriological examination of the same material revealed the presence of *Streptococcus* spp; *Corynebacterium* spp; *Citrobacter freundii* and *Aeromonas hydrophila*. The search of alcohol-acid-resistant rods was negative. The principal hypothesis formulated for this occurrence was by metabolic cause, subsequently a infective process.

KEY WORDS: bullfrog, *Rana catesbeiana*, subcutaneous nodules, pathology

1. INTRODUÇÃO

Muito embora a atividade de criação comercial de rãs touro, *Rana catesbeiana*, em nosso meio seja relativamente recente, grande número de criações já estão instaladas e em franca produção.

Assim, devido a este rápido crescimento, quadros patológicos começam a surgir e alguns destes processos já foram relatados em nosso meio, como é o caso da já bem definida "red leg disease", doença da perna

* Nota Científica - aprovado para publicação em 06/10/95

** Trabalho apresentado na 1ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 1988, São Paulo, SP

(1) Pesquisador Científico - Seção de Meios de Cultura - Instituto Biológico - CPA/SAA

(2) Pesquisador Científico - Seção de Bacteriologia Animal - Instituto Biológico - CPA/SAA

(3) Médico Veterinário - Seção de Anatomia Patológica - Instituto Biológico - CPA/SAA

(4) Endereço/Address - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252 - CEP 04014-002 - São Paulo - SP

vermelha (HIPOLITO et alii, 1987). Casos de doenças até então não verificadas a nível internacional, como processos nutricional-metabólicos e tóxicos com lesão cutânea de cabeça (HIPOLITO et alii, 1990; SOUZA et alii, 1990); encefalites (HIPOLITO; SOUZA; SOUZA Jr., 1988), mífase bucal (SOUZA Jr. et alii, 1989), além de processos septicêmicos também terem sido notificados (AMBORSKI et alii, 1983; BARROS; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1990; SOUZA et alii, 1984).

Quadros diversos dos já citados como edema generalizado em girinos e adultos; problemas de desenvolvimento com interrupção das fases de metamorfose; obstrução total do reto por corpo estranho; intussuscepção intestinal e prolapso da cloaca em adultos; mortalidade por necrose de cauda em

girinos e imagos e conjuntivite em rãs jovens e adultas já foram observados pelos autores.

A bibliografia consultada descreve inúmeros processos patológicos para os anfíbios, tais como: doenças nutricionais, carenciais, metabólicas, parasitárias, bacterianas, fúngicas e neoplásicas (ANVER & POND, 1984; COOPER, 1987; ELKAN, 1976; FOWLER, 1978; GRINER, 1983; REICHENBACH-KLINKE & ELKAN, 1965). Especificamente para as rãs touro, são descritos processos septicêmicos por *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* (GLORIOSO et alii, 1974a) e por *Streptococcus* do Grupo B não hemolítico (AMBORSKI et alii, 1983).

A presente comunicação relata um quadro patológico, de graves consequências, até então não assinalado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais doentes eram provenientes de criação comercial recém-instalada no Município de Rancharia, Estado de São Paulo, que recebera 10000 animais, entre girinos e imagos. A anamnese informou sobre um estado de inapetência e letargia e, em poucos dias observou-se alta mortalidade, atingindo 2000 animais, entre girinos, imagos e rãs jovens.

Dos animais doentes, foram trazidos para exames 100 exemplares que, entretanto, chegaram mortos. Dos animais que apresentavam melhor estado de conservação foram separados 20 para coleta de material destinado a exames laboratoriais. Externamente apresentavam manchas amareladas, situadas na cauda e na porção inferior da cabeça (FIGURA 1) e, após debridação da pele, observou-se que estas correspondiam a nódulos. Fragmentos destes nódulos e do fígado foram triturados, separadamente,

para exame bacteriológico e cultivados em meio líquido, caldo infuso cérebro-coração (BHI) para enriquecimento, repicando-se em ágar sangue e ágar MacConkey. Os meios de cultura foram incubados a 37°C por 24-48h. Colônias obtidas nos meios sólidos foram submetidas à observação pela coloração de Gram e à identificação bioquímica (GLORIOSO et alii, 1974b). Do triturado foi ainda realizada bacterioscopia direta para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, segundo a técnica de Ziehl-Nielsen.

Nódulos e fragmentos de tecidos adjacentes, além de fígado, rins e porções do intestino foram fixados em formol neutro a 10% para exame histopatológico segundo as técnicas rotineiras e submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina. Macroscopicamente não se observou qualquer outra anormalidade além dos nódulos.



FIGURA 1 - Girinos, apresentando manchas amareladas na parte inferior da cabeça e na cauda

3. RESULTADOS

Foram observados nódulos esféricos, localizados subcutaneamente, únicos ou agrupados, medindo 2 a 3mm de diâmetro, e por vezes aderentes ao tecido muscular (FIGURA 2). Estes nódulos apresentaram, ao corte, um conteúdo sólido e consistente.

A partir da caracterização morfológica pela coloração de Gram e do perfil bioquímico apresentado, as colônias isoladas foram identificadas como: *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus* sp alfa hemolítico e *Corynebacterium* sp. A pesquisa para bacilos álcool-ácido resistentes foi negativa.

A histopatologia dos nódulos revelou a presença de depósito de sais de cálcio. Ao redor desta área calcificada, observou-se a presença de uma delicada membrana de fibras conjuntivas, sem qualquer alteração da estrutura do tecido muscular esquelético

adjacente e sem a presença de células inflamatórias (FIGURA 3).

Observou-se ainda depósitos de sais de cálcio no fígado, sem reação inflamatória e presença de depósitos de pigmentos enegrecidos, comumente observados nestes animais jovens, semelhantes aos melanomacrófagos, que são estruturas celulares presentes nos vertebrados inferiores, associados ao tecido hematopoético e às defesas celulares (ROBERTS, 1978).

Nos rins os depósitos de sais de cálcio mostraram-se envolvidos por uma delicada membrana de uma única camada de células também sem reação inflamatória. No intestino não foi notada qualquer alteração histopatológica, observando-se na sua luz a presença de endoparasitas.

O quadro bacteriológico e histopatológico observado foi semelhante na grande maioria dos espécimens examinados.

HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; MOULIN, A. A. P.; MACRUZ, R. 1995 Nódulos com depósito de cálcio em girinos e imagos de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(2): 121- 127, jul./dez.



FIGURA 2 - Aspecto das formações nodulares, única ou agrupadas, após o debridamento da pele

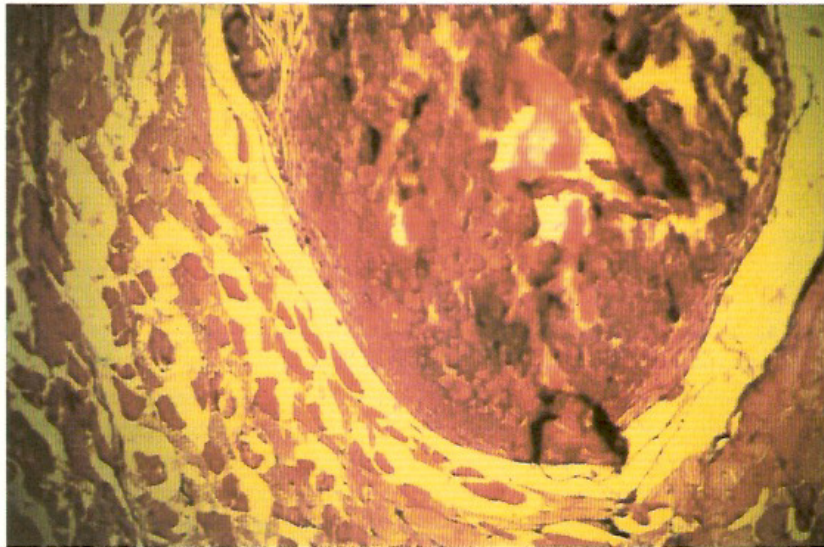


FIGURA 3 - Corte histológico dos nódulos mostrando depósito de cálcio e ausência de alterações inflamatórias no tecido muscular periférico. Coloração pela hematoxilina-eosina. Aumento de 150 vezes

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na presente situação, a expectativa era de se observar uma reação inflamatória acompanhando o processo e/ou a visualização do seu agente causal. Diferentes autores, comentam, que no hospedeiro anfíbio pode haver uma reação incipiente ou inexistente (ANVER & POND, 1984). O tecido pode não mostrar reações defensivas detectáveis contra a invasão e nem sinais de infiltração celular no tecido periférico (ELKAN, 1976).

A nível da luz intestinal foi observada a presença de parasitas cuja alta infestação pode ter contribuído potencialmente para a ocorrência dos distúrbios metabólicos nos hospedeiros, levando-os também à morte (ELKAN, 1976; GRINER, 1983).

A presença dos agentes *Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter freundii*, ubiqüitários e patógenos oportunistas para anfíbios (GLORIOSO et alii, 1974a; HIPOLITO et alii, 1987), além de *Streptococcus* sp, gênero já responsabilizado por mortalidade em rãs touro (AMBORSKI et alii, 1983) e por manifestações nervosas (HIPOLITO; SOUZA; SOUZA Jr., 1988), é significativa como fator complicador de um quadro estressante, podendo, entretanto, não estarem relacionados diretamente com as lesões encontradas. O gênero *Corynebacterium*, embora considerado patogênico para peixes (ROBERTS, 1978), ainda não teve sua participação definida para a espécie em foco.

A situação estressante causada pela presença dos nódulos, associada a falhas do manejo, criou condições para tais agentes bacterianos oportunistas se manifestarem, e causar o quadro septicêmico. A falta de manejo adequado foi decorrente da inexperiência do criador, conforme sua informação, pois tratava-se de criação recém instalada. A procedência destes animais e o histórico anterior à sua chegada ao ranário, poderia auxiliar na elucidação da situação. Entretanto, o criador não possuía tais informações, o que prejudicou a anamnese.

Uma das hipóteses aventadas para a presente ocorrência foi metabólica, não excluindo outras possíveis causas, como mecânico-irritativa ou conseqüentes a um processo infeccioso decorrente de irritação local (MILLER & WEST, 1955).

Segundo GUYTON (1973), a precipitação de cálcio em tecidos não ósseos pode ocorrer sob condições anormais, por exemplo, em tecidos em degeneração ou em coágulos sangüíneos antigos. Alterações dos hormônios da tireóide, mais um aumento dos níveis de cálcio, provocariam estas calcificações metastáticas.

Na bibliografia consultada não há referências de situações semelhantes em anfíbios (ANVER & POND, 1984; COOPER, 1987; ELKAN, 1976; FOWLER, 1978; GRINER, 1983; REICHENBACH-KLINKE & ELKAN, 1965). Em peixes, há citações de formações nodulares causadas pela presença de protozoários ou outros parasitas (ROBERTS, 1978), levando no presente caso, os autores a conjecturar também sobre esta hipótese como possível causa, visto que o habitat e a fisiologia dos girinos guardam certas semelhanças aos dos peixes, embora não se tenha verificado a presença de parasitas nos nódulos das amostras analisadas.

A presente situação constituiu-se em ocorrência única e isolada atingindo os animais nas diferentes fases da metamorfose. Permanece a dúvida quanto a causa primária destes nódulos apesar das hipóteses aventadas, sendo necessária uma ação interinstitucional para efetuar estudos mais completos visando o esclarecimento de situações ainda pouco conhecidas, no que se refere aos problemas patológicos surgidos no âmbito da moderna ranicultura.

Após aproximadamente 3 semanas, o criador informou da morte de todos os animais, impossibilitando observações posteriores que pudessem contribuir para melhor compreensão da ocorrência estudada.

HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; MOULIN, A. A. P.; MACRUZ, R. 1995 Nódulos com depósito de cálcio em girinos e imagos de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(2): 121- 127, jul./dez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBORSKI, R.L.; SNIDER III, T.G.; THUNE, R.L.; CULLEY JR., D.D. 1983 A non-hemolytic, Group B *Streptococcus* infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 19(3): 180-4.
- ANVER, M.R. & POND, C.L. 1984 Biology and Disease of Amphibians. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. *Laboratory Animal Medicine*. Orlando, Academic Press, Inc. p. 427-47.
- BARROS, G.C.; LANGENEGGER, C.H.; LANGENEGGER, J. 1990 Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbeiana*) causada por *Mycobacterium marinum*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 1, 15-19 out., São Paulo, 1990. *Resumos*. São Paulo, ABRAPOA, p.33.
- COOPER, J.E. 1987 Veterinary work with non-domesticated pets. IV. Lower vertebrates. *Br. vet. J.*, 143(3): 193-202.
- ELKAN, E. 1976 Pathology in the Amphibia. In: LOFTS, B. *Physiology of the Amphibia*. London, Academic Press, Inc. p. 273-311.
- FOWLER, M.E. 1978 *Zoo and Wild Animal Medicine*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 951p.
- GLORIOSO, J.C.; AMBORSKI, R.L.; AMBORSKI, G.F.; CULLEY, D.D. 1974a Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Am. J. Vet. Res.*, 35 (9): 1241-5.
- _____; _____; LARKIN, J.M.; AMBORSKI, G.F.; CULLEY, D.D. 1974b Laboratory identification of bacterial pathogens of aquatic animals. *Am. J. Vet. Res.*, 35 (3): 447-50.
- GRINER, L.A. 1983 Amphibians and Reptiles. In: *Pathology of Zoo Animals. A Review of Necropsies Conducted over a Fourteen-Year Period at the San Diego Zoo and San Diego Wild Animal Park*. San Diego, Zoological Society of San Diego. p. 3-17.
- GUYTON, A.C. 1973 *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan S.A..
- HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; MOULIN, A.A.P.; CALIL, E.M.B.; BARBOSA, M.L.; CUNHA, R.M. 1987 Presença de agentes patogênicos bacterianos em rãs touro gigante (*Rana catesbeiana*). In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 12, 5-6 nov., Jaboticabal, 1987. *Resumos*. Jaboticabal, Fac. Cienc. Agrar. Vet., UNESP. p. 48.
- _____; SOUZA, C.W.O.; SOUZA Jr., F.L. 1988 Presença de *Streptococcus* sp ao nível do sistema nervoso central em *Rana catesbeiana* com sintomatologia nervosa. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE AQUICULTURA, 6, SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5, 17-22 abril, Florianópolis, 1988. *Resumos*. Florianópolis, Assoc. Latino Americana Aquic. e Assoc. Bras. Aquicultura, p. 46.
- _____; BALDASSI, L.; CALIL, E.M.B.; MOULIN, A.A.P.; PIRES, D.C. 1990 Microbiota de lesão tegumentar em anfíbios (*Rana catesbeiana*) de ranário comercial. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 1, 15-19 out., São Paulo, 1990. *Resumos*. São Paulo, ABRAPOA, p. 32.
- MILLER, W.C. & WEST, G.P. 1955 *Black's Veterinary Dictionary*. 3, London, Adam & Charles Black, 1112 p.
- REICHENBACH-KLINKE, L. & ELKAN, E. 1965 Infections Diseases. In: *The Principals Diseases of Lower Vertebrates. Diseases of Amphibians*. London, Academic Press Inc., p.220-320.
- ROBERTS, R.J. 1978 *Fish Pathology*. 1. London, Baillieri-Tindall, 317p.
- SOUZA, C.W.O.; OLIVEIRA, P.R.; SILVA, N.R.; RIBEIRO, S.C.A.; SILVA, P.L.; HUEI, H.J. 1984 Estudo da flora bacteriana patogênica de rãs touro (*Rana catesbeiana*). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 1, 5-9 nov., Goiânia, 1984. *Anais*. Goiânia, Assoc. Goiana Criad. Rãs, p. 196-200.
- _____; MACRUZ, R.; MARTINS, M.L.; SOUZA Jr., F.L. 1990 Ocorrência de lesões cutâneas na região do crânio de imagos de rã touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802). *Histopatologia*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 1, 15-19

HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; MOULIN, A. A. P.; MACRUZ, R. 1995 Nódulos com depósito de cálcio em girinos e imagos de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22(2): 121- 127, jul./dez.

out., São Paulo, 1990. *Resumos*. São Paulo, ABRAPOA, p. 31.

SOUZA Jr., F.L.; SOUZA, C.W.O.; HIPOLITO, M.; BALDASSI, L. 1989 Cases of buccal myiasis in

the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) with larvae of *Notochaeta* sp Aldrich, 1916 (Diptera: Sarcophagidae) in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 84, Sup IV: 517-8.