

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

***ESTRESSE DE MANEJO CRIATÓRIO EM RÃS-TOURO: ASPECTOS  
HORMONAIS, HEMATOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS***

Patrícia Coelho Teixeira  
Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO  
Junho de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

***ESTRESSE DE MANEJO CRIATÓRIO EM RÃS-TOURO: ASPECTOS  
HORMONAIIS, HEMATOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS***

Patrícia Coelho Teixeira  
Zootecnista

Orientadora: Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini  
Co-orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Tese apresentada ao Centro de  
Aquicultura da UNESP, sediado no  
Campus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Aquicultura

JABOTICABAL - SÃO PAULO  
Junho de 2012

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho com todo amor e carinho*

*Aos meus pais Amauri e Maria Helena, aos meus irmãos Fabio e Gabriela e a  
minha noninha Ida, que foram e sempre serão o meu porto seguro.*

## **Agradecimentos**

À Deus por mais esta etapa concluída.

À minha família, Amauri, Maria Helena e irmãos Fabio e Gabriela e ainda a minha noninha Ida por toda a força que me deram. AMO VOCÊS!

Ao CAUNESP/Jaboticabal, à UNESP/Bauru, ao PRDTA/Pindamonhangaba, ao Instituto Biológico/SP e ao Instituto de Pesca/SP pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Irene Bastos Franceschini Vicentini, UNESP/Bauru, pela orientação neste estudo e ensinamentos.

À Dr<sup>a</sup> Maria José Tavares Ranzani Paiva, Instituto de Pesca, pela co-orientação neste estudo e amizade.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Maris Ferreira, Instituto de Pesca, por TODA a ajuda que me deu!

À Dr<sup>a</sup> Adriana Sacioto Marcantônio, PRDTA/Pindamonhangaba, e a doutoranda Fernanda Menezes França, USP/Lorena pela graaaaande ajuda!

Aos amigos do PRDTA/Pindamonhangaba, Olavo, Jorge, Chavone, Sorriso, João e Andréa...sem vocês o dia-a-dia do experimento não seria o mesmo!

Às amigas do Instituto de Pesca/SP Ludmila e Jorgina... Valeu pela ajuda de vocês!

Ao Dr Marcio Hipólito por toda a colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da UNESP/Bauru Janaina, Thiago, Rafaela, pela ajuda na histologia deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Adriana Fernandes de Barros, Cristiane Meldau de Campos e Veralice Capatto que estiveram comigo nos melhores momentos da “cidade das rosas” em Jaboticabal. Amooooo vcs!!!

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, Dra Cláudia Maris Ferreira, Dra Maria José Tavares Ranzani Paiva, Dra. Elizabeth Romagosa, Dr. Hércio Luiz de Almeida Marques, Dra Cacilda Thais J. Mercante, com quem pude aprender MUITAS coisas durante todos estes anos de convivência.

Ao motorista do Instituto de Pesca/SP, João Batista “JB”, pelas aventuras em viagem.

Ao Dr Cláudio Alvarenga e Dra Priscila Viau Furtado do Laboratório de Dosagens Hormonais da USP pela orientação quanto às análises de hormônio.

Ao Dr Rogério Caetano da Costa UNESP/Bauru pelas dicas estatísticas!

À doutoranda Isabela Cristina, USP/SP pela graaaaaande ajuda nas análises estatísticas!

À Veralice Capatto o ANJO da guarda na secretaria da pós-graduação pela amizade e  
TODA ajuda. Te amo Veritcha!!!

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente deste trabalho.

# Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 Metamorfose	5
2.2 Estresse	6
2.3 Interrenal e Hormônios do Estresse	8
2.4 Biomarcadores	9
2.4.1 Parâmetro Endócrino - Corticosterona	9
2.4.2 Parâmetros Hematológicos	9
2.4.3 Parâmetros Morfológicos	10
2.4.3.1 Células Cromafins (glândula interrenal)	10
2.4.3.2 Glândulas Mucosas (pele)	11
3. Objetivos	12
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. Material e Métodos	14
4.1 Local e Período	15
4.2 Delineamento	15
4.3 Material Biológico e a Experimentação	15
4.3.1 Experimento Densidade laboratório e campo	17
4.3.2 Experimento Triagem laboratório e campo	19
4.4 Condições abióticas e Manejo	21
4.5 Avaliações	21
4.5.1 Parâmetros Endócrinos	21
4.5.1.1 Validação fisiológica da corticosterona	21
4.5.1.2 Corticosterona	23
4.5.2 Parâmetros Hematológicos	23
4.5.3 Parâmetros Morfológicos	24
4.6 Análise Estatística	25
5. Resultados	26
5.1 Condições abióticas e Manejo	27
5.2 Parâmetro Endócrino	27

5.2.1 Validação Fisiológica	27
5.2.2 Corticosterona	29
5.2.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo	29
5.2.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo	32
5.3 Parâmetros Hematológicos	35
5.3.1 Eritrograma	35
5.3.1.1 Experimento de Densidade laboratório e campo	35
5.3.1.2 Experimento de Triagem laboratório e campo	41
5.3.2 Leucograma	47
5.3.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo	47
5.3.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo	53
5.4 Parâmetros Morfológicos	59
5.4.1 Células Cromafins (glândula interrenal)	59
5.4.1.1 Experimento de Densidade laboratório e campo	61
5.4.1.2 Experimento de Triagem laboratório e campo	61
5.4.2 Glândulas Mucosas (pele)	63
5.4.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo	65
5.4.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo	65
6. Discussão	69
6.1 Parâmetro Endócrino - Corticosterona	70
6.2 Parâmetros Hematológicos	76
6.2.1 Eritrograma	76
6.2.2 Leucograma	78
6.3 Parâmetros Morfológicos	81
6.3.1 Células Cromafins (glândula interrenal)	81
6.3.2 Glândulas Mucosas (pele)	83
7. Conclusões	87
8. Referências Bibliográficas	89



## Lista de Figuras

- FIGURA 1** - Esquema da tabela de GOSNER (1960) modificado por McDIARMID e ALTIG (1999), mostrando o clímax da metamorfose em rã-touro *L. catesbeianus* (estágio 42 ao 45) e metamorfose completa semelhante à pós-metamorfose (estágio 46) 16
- FIGURA 2** – Organograma experimental dos estresses de Densidade e Triagem com rã-touro, *L. catesbeianus*, apresentando os tratamentos aplicados, os parâmetros avaliados e os tempos de coleta; (M.Z) momento zero, coleta antes do início do experimento 16
- FIGURA 3** - Esboço experimental para o estresse de Densidade em rã-touro, *L. catesbeianus* com os distintos tratamentos, réplicas e animais amostrados nos períodos de coleta 18
- FIGURA 4** - Esboço experimental para o estresse de Triagem em rã-touro, *L. catesbeianus* com os distintos tratamentos, réplicas e animais amostrados nos períodos de coleta 20
- FIGURA 5 a:** Níveis de corticosterona plasmática em  $\text{ng mL}^{-1}$  para ACTH, solução salina e grupo manipulação nos diferentes tempos de coleta em *L. catesbeianus*. **b:** Níveis de corticosterona plasmática em  $\text{ng mL}^{-1}$  após supressão com Dexametasona no decorrer do tempo em *L. catesbeianus* 28
- FIGURA 6** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório 30
- FIGURA 7** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo 31
- FIGURA 8** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório 33

- FIGURA 9** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo 34
- FIGURA 10** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM respectivamente 37
- FIGURA 11** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM respectivamente 40
- FIGURA 12** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM respectivamente 43
- FIGURA 13** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM respectivamente 46
- FIGURA 14** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. Dados em (a) Leucócito (Lc); (b) Linfócito (Lf); (c) Neutrófilo (Nt); (d) Basófilo (Bs); (e) Eosinófilo (Es) e em (f) Monócito (Mn) respectivamente 49

- FIGURA 15** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. Dados em (a) Leucócito (Lc); (b) Linfócito (Lf); (c) Neutrófilo (Nt); (d) Basófilo (Bs); (e) Eosinófilo (Es) e em (f) Monócito (Mn) respectivamente 52
- FIGURA 16** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Leucócito (Lc); (b) Linfócito (Lf); (c) Neutrófilo (Nt); (d) Basófilo (Bs); (e) Eosinófilo (Es) e em (f) Monócito (Mn) respectivamente 55
- FIGURA 17** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Leucócito (Lc); (b) Linfócito (Lf); (c) Neutrófilo (Nt); (d) Basófilo (Bs); (e) Eosinófilo (Es) e em (f) Monócito (Mn) respectivamente 58
- FIGURA 18** - **a** Secção sagital ventral de rã-touro, *L. catesbeianus*, com destaque para os rins (setas), 0,5X; e glândulas interrenais (entre setas brancas), 2,0X. **b, c** fotomicrografia das glândulas interrenais de rã-touro, *L. catesbeianus*. com células cromafins (seta), células esteroideogênicas (cabeças de setas) e vasos sanguíneos (asterisco); coloração H/E, PAS 60
- FIGURA 19 e 20**- Fotomicrografia da glândula interrenal com células cromafins (seta) de rã-touro, *L. catesbeianus*. **FIGURA 19a:** (D200). **b:** (D100). **FIGURA 20a:** (ST). **b:** (TT); coloração H/E, PAS 62
- FIGURA 21** Fotomicrografia das glândulas multicelulares exócrinas da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a:** glândula mucosa com destaque para epitélio secretor com núcleos basais e porções apicais secretoras (setas), luz alveolar (estrela), região intercalar com células blastos (cabeças de setas) ducto (asterisco), epitélio estratificado cúbico não queratinizado (ep). 64

**b:** glândula granular com destaque para epitélio secretor (setas), luz alveolar com secreções (estrela), região intercalar com células blastos (cabeça de seta) ducto (asterisco), epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (ep); coloração H/E, PAS

**FIGURA 22** Fotomicrografia da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a:** (D200) glândulas granulares sem secreção (setas). **b:** (D100) glândulas granulares com secreção (setas). **c:** (D200) glândulas mucosas mais evidentes (cabeça de seta). **d:** (D100) glândulas mucosas menos evidentes (cabeça de seta); coloração H/E, PAS 67

**FIGURA 23** Fotomicrografia da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a, c:** (TT) glândulas mucosas com secreção mais evidente (setas). **b, d:** (ST) glândulas mucosas com secreção menos evidente (setas); coloração H/E, PAS. 68

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1</b> – Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no laboratório	29
<b>TABELA 2</b> – Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no campo	31
<b>TABELA 3</b> – Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no laboratório	32
<b>TABELA 4</b> – Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no campo	34
<b>TABELA 5</b> - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidas no laboratório	36
<b>TABELA 6</b> - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidas no campo	39
<b>TABELA 7</b> - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no laboratório	42
<b>TABELA 8</b> - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no campo	45
<b>TABELA 9</b> - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no laboratório	48
<b>TABELA 10</b> - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no campo	51

<b>TABELA 11</b> - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidas no laboratório	54
<b>TABELA 12</b> - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> , sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidas no campo	57

## RESUMO

TEIXEIRA, P.C. **ESTRESSE DE MANEJO CRIATÓRIO EM RÃS-TOURO: ASPECTOS HORMONAIS, HEMATOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS.** Jaboticabal, 2012. 109p. Tese (Doutorado) Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta fisiológica de estresse no clímax e logo após a metamorfose de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em diferentes densidades e triagens aplicadas sendo conduzidos no laboratório e no campo. No experimento Densidade foram testadas as densidade de pré-engorda: 70 animais  $m^{-2}$  (D70), 100 animais  $m^{-2}$  (D100) controle, 150 animais  $m^{-2}$  (D150) e 200 animais  $m^{-2}$  (D200), com três réplicas simultâneas. No Experimento Triagem foram testados os manejos de seleção por tamanho (triagem): Sem Triagem (ST), Triagem Parcial a cada quinze dias (TP), Triagem Total a cada quinze dias (TT), com quatro réplicas simultâneas. Foram avaliados o parâmetro hormonal da corticosterona plasmática (Radioimunoensaio - RIE), os parâmetros hematológicos da série vermelha e branca, bem como a morfologia das células cromafins (rim) e glândulas de muco (pele). A corticosterona plasmática respondeu às distintas condições de densidade e triagem aumentando para as densidades D150 e D200 e para as triagens TP e TT ao longo do tempo experimental no laboratório. Porém no campo, a alta densidade e a situação de cativeiro não foram suficientes para provocar estresse nos animais que apresentaram uma diminuição dos níveis de corticosterona aos 30 dias. Na experimentação de Triagem campo os níveis de corticosterona apresentaram menos expressivos se comparado ao laboratório com diminuição aos 30 dias para TT. A série vermelha respondeu aos distintos estresses de densidade e triagem com o aumento do VCM e HCM de forma semelhante, no laboratório. Já no campo este resultado foi menos expressivo. A série branca respondeu ao estresse de densidade com aumento de neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, no laboratório e alterações menos expressivas no campo. Porém respondeu ao estresse agudo de triagem com diminuição de neutrófilos e demais figuras sanguíneas na experimentação de laboratório e campo. As células cromafins responderam, na experimentação de campo com maior área destas células para D200 sugerindo que houve hiperplasia com o aumento de densidade. No experimento Triagem foi observada maior área para ST sugerindo que a triagem não alterou o número das células cromafins dos animais. As glândulas mucosas responderam com acúmulo de muco nos tratamentos de maior estresse nos distintos estudos, sendo mais estressante para a experimentação de laboratório, porém no experimento de Triagem foi observado resposta mais expressiva se comparada ao experimento de Densidade. Concluiu-se que o estresse de densidade e triagem em laboratório mostraram maior expressividade se comparados ao campo.

**Palavras chave:** ranicultura, estresse, corticosterona, hematologia, células cromafins, glândulas mucosas

## ABSTRACT

TEIXEIRA, P.C. HANDLING STRESS IN REARING FARMS OF BULLFROG: HORMONAL, HEMATOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS. Jaboticabal, 2012. 109p. Tese (Dr) Aquaculture Center, São Paulo State University.

This work aimed evaluate the physiological response of the stress in the climax and immediately after metamorphosis of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) submitted to different densities (D) and to selective handling by animal size (S) conducted in laboratory and field. In the Density experiment four different densities for animal were tested: 70 animals.m<sup>-2</sup> (D70), 100 animals.m<sup>-2</sup> (D100), density control, 150 animals.m<sup>-2</sup> (D150) and 200 animals.m<sup>-2</sup> (D200), using 3 simultaneous replicates. In the handling experiment three selective handling by animal size were tested: without selective handling (NS), Partial Selective handling each 15 days (PS), Total Selective handling each 15 days (TS), using 4 simultaneous replicates. For the stress response evaluation hormonal parameter for plasmatic corticosterone (radioimmunoassay - RIE) were quantified. In addition, hematological parameters in red and white blood cells, and the morphology of chromaffin cells (kidneys) and mucus glands (epiderm) were determined. The plasma corticosterone responded to the different conditions of density and separate by size (screening), increasing to the D150 and D200 and to the PS and TS throughout the experimental period. In the laboratory, but in the field high density and captive situation were not enough to cause stress in animals that showed a decrease in corticosterone levels at 30 days. In the field, levels of corticosterone in screening stress showed less significance compared to the laboratory with a decrease to 30 days for TS. The red series responded to different stresses, density and screening with the increase MCV and MCH in a similar way in the laboratory, but in the field this result was less significant. The white series responded to density stress with an increase of neutrophils, basophils, eosinophils and monocytes in the laboratory and less significant changes in the field. However responded to screening stress with a decrease of neutrophils and other blood figures in the laboratory and field experiments. Chromaffin cells responded in the field with the largest area to D200 suggesting hyperplasia with increased density. In the screening stress we observed the largest area to NS suggesting that separate by size did not alter the number in chromaffin cells in the animals. The mucous glands responded with accumulation of mucus in the treatments of increased stress in both studies showing difference for the laboratory experimentation. The screening experiment presented to be more stressful compared to the density stress. It was concluded that the density and screening stress in laboratory showed greater expression compared to field results.

**Key words:** frog culture, stress, corticosterone, hematology, chromaffin cells, mucus glands



## ***1. INTRODUÇÃO***

A rã-touro, *Rana catesbeiana* SHAW 1802, recentemente re-classificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST *et al.*, 2006), é a única espécie utilizada pelos ranários comerciais brasileiros por suas características zootécnicas como rusticidade (facilidade de manejo), precocidade (crescimento rápido) e prolificidade (elevado número de ovos por postura). Embora a criação de girinos e imagos de rã-touro saudáveis seja uma etapa fundamental para o sucesso de qualquer ranário, observa-se mortalidade destes animais na maioria dos ranários comerciais, seja por problemas de manejo, deficiência alimentar, instalações inadequadas, má qualidade da água ou por doenças bacterianas e fúngicas (RIBEIRO FILHO, 1998; FERREIRA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2003).

A metamorfose é um período de grandes transformações pós-embrionárias que envolvem mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, na qual o organismo altera seu modo de vida (DUELLMAN e TRUEB, 1986; AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY, 2008). Nesta etapa e nos 30 dias subsequentes a ela, os animais enfrentam mudanças que os tornam mais susceptíveis a qualquer desequilíbrio homeostático, ou seja, estresse, ocasionando altas taxas de mortalidade em ranários comerciais (FERREIRA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2003). Consideram-se aceitáveis na fase de pré-engorda (imago) taxas de mortalidade de aproximadamente 30% entre animais que não se desenvolveram adequadamente, animais canibalizados e mortalidade propriamente dita, 20% durante a fase de girinagem e 5% na fase de engorda. Assim, a pré-engorda caracteriza-se como sendo a fase de estrangulamento dentro da produção intensiva de rãs (FERREIRA *et al.*, 2002).

A densidade é um fator de extrema importância para a qualidade dos animais LOMAN (2004). Estresses crônicos com alta densidade em anfíbios podem elevar os

níveis basais dos glicocorticóides (HAYES, 1997; GLENNEMEIER e DENVER, 2002 b; ROT-NIKCEVIC *et al.*, 2005).

A prática de separação dos animais por tamanho, conhecida por triagem (FONTANELLO *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 2002) pode minimizar as perdas na fase de pós-metamorfose frente o canibalismo, problema bastante corriqueiro, garantindo também a qualidade dos animais. Porém, esta prática atua como um estressor agudo alterando os níveis basais dos glicocorticóides (LANGKILDE e SHINE, 2006).

A densidade e a triagem devem ser consideradas pelo produtor quanto ao bem estar animal, onde possíveis falhas podem levar ao desequilíbrio e conseqüentemente perdas zootécnicas e econômicas. A corticosterona, principal glicocorticóide em anfíbios (MOBERG, 2000; WADA, 2008), juntamente com marcadores hematológicos (ALLENDER e FRY, 2008; DAVIS *et al.*, 2008) e morfológicos: rim – células cromafins (ACCORDI e MILANO, 1977); pele – glândulas mucosas (MILLS e PRUM, 1984; HAYES e GILL, 1995) foram usados para avaliar o estresse no presente estudo.

## ***2. REVISÃO DE LITERATURA***

## ***2.1 Metamorfose***

A metamorfose é um processo fisiológico contínuo, que ocorre de forma relativamente lenta e gradual sendo subdividida nas fases pré-metamorfose, estágios 26 ao 30 de GOSNER (1960), pró-metamorfose, estágios 31 ao 41 e clímax da metamorfose, estágios 42 ao 45. Porém, como trata-se de um animal pecilotérmico, ou seja, que modifica-se segundo as condições ambientais, alguns fatores regulam a taxa de metamorfose entre eles a temperatura (BIER, 1978; HAYES *et al.*, 1993), alimento (WILBUR e COLLINS, 1973; KUPFERBERG *et al.*, 1994), densidade de girinos (WILBUR, 1977; SEMLITSCH e CALDWELL, 1982), e a presença de predador (WASSERSUG e SPERRY, 1977; ARNOLD e WASSERSUG, 1978; KUPFERBERG *et al.*, 1994), onde um aumento da temperatura, densidade, presença do predador e uma diminuição da disponibilidade do alimento aceleram a metamorfose.

As mudanças bioquímicas da metamorfose apresentam-se menos visíveis, onde se pode observar aumento na produção de proteínas séricas, alteração no metabolismo de ferro, devido ao aumento da ceruloplasmina, mudanças na hemoglobina e também no ciclo da uréia (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

As alterações morfológicas são mais exuberantes, onde se observa o desenvolvimento dos membros, a degeneração das brânquias concomitantes ao desenvolvimento dos pulmões, modificações no aparelho respiratório para permitir a respiração pelos pulmões e pele bem como através da região gular (papo), a reabsorção da cauda, o desenvolvimento das glândulas dos olhos, o aparecimento da pálpebra e da membrana nictante para proteção contra o ressecamento e outras intempéries, a formação da boca e da língua e a diferenciação do trato digestório de onívoros para carnívoros (PAULSON *et al.*, 1995; ROVIRA *et al.*, 1995; HOURDRY *et al.*, 1996).

As alterações comportamentais são mais radicais, onde as rãs após a metamorfose tornam-se carnívoras, caçadoras e canibais. Em outras palavras, os imagos são extremamente vorazes e, a menos que se faça a separação por tamanho (triagens), as perdas podem ser grandes (FONTANELLO *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 2002).

## **2.2 Estresse**

O estresse representa uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo animal, denominado de homeostase, é ameaçado ou perturbado por um conjunto de estímulos intrínsecos e extrínsecos, comumente definidos como estressores, que induzem respostas fisiológicas compensatórias e/ou adaptativas para capacitar o animal a superar ameaças. A reação de estresse prepara o animal para a situação chamada “fight or flight” (luta ou fuga), ou seja, os animais submetidos ao estímulo fogem, evitando o estressor, ou se não podem fazê-lo, reagem e lutam para se ajustar ao estressor (WINGFIELD e ROMERO, 2001; ROMERO, 2002; McEWEN e WINGFIELD, 2003). A resposta de estresse agudo envolve dois componentes do sistema neuro-endócrino: o sistema simpático-cromafim que estimula as células cromafins para a liberação de catecolaminas, cuja resposta é rápida e produz um efeito imediato (ROMERO e REED, 2005), e o sistema hipotálamo-hipófise-interrenal que consiste na estimulação em cascata, de modo mais lento culminando na liberação do cortisol/corticosterona pelas células do tecido interrenal (SAPOLSKY *et al.*, 2002).

As respostas de estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária. A primeira categoria é uma reação de alarme, que causa aumento das catecolaminas (epinefrina e noraepinefrina) e corticosteróides. A segunda caracteriza-se por um estado de resistência que produz efeitos metabólicos como, aumento dos batimentos cardíacos, do consumo de oxigênio, da glicemia, do hematócrito e do número de

leucócitos. A terceira é um estado de exaustão que causa a queda de desempenho, inibição do crescimento e da reprodução e a diminuição da resistência a doenças e, conseqüente, contaminação por bactérias e fungos oportunistas, podendo levar os organismos à morte (SAPOLSKY, 1993; SAPOLSKY *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2008; DENVER, 2009).

O estresse do tipo agudo observado em manejos, como biometria e transporte apresenta resposta fortemente imunossupressora, levando a perdas. O estresse do tipo crônico, observado em condições que mantenham os organismos aquáticos por longo período em situações estressantes, como pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido na água e superpopulação, pode levar a baixo crescimento e perda de peso (BARTON e IWAMA, 1991).

O conceito de estresse cumulativo é importante para os aquicultores, pois indica que distúrbios sub-letais, que não parecem problemáticos, podem se acumular e, se o período entre eles for insuficiente para recuperação, pode haver efeito deletério individualmente e na população, pois as respostas perdem seu valor adaptativo, e tornam-se disfuncionais (BARTON e IWAMA, 1991; BARTON, 2002; LIMA *et al.*, 2006).

Em rãs-touro, alterações comportamentais são observadas na pré-engorda (30 dias subseqüentes à metamorfose) e engorda (90 dias subseqüentes à pré-engorda) frente a situações de estresse como o refúgio embaixo d' água ou de abrigos de proteção, o empilhamento das rãs nos cantos das baias, saltos desnorteados, sons característicos de fuga, além do aparecimento de peles em excesso nas áreas úmidas. Algumas vezes chega-se até a visualizar muco sobre a epiderme em forma de espuma com odor discreto e característico (LIMA e AGOSTINHO, 1992; FERREIRA *et al.*, 2002).

### ***2.3 Interrenal e hormônios do estresse***

Em anfíbios anuros, a glândula interrenal, análoga à glândula adrenal está em contato com a superfície do rim, apresentando-se como estruturas alongadas localizadas na porção ventral mediana de cada rim (DUELLMAN e TRUEB, 1986; ACCORDI, 1991). A compactação e a comunicação que o tecido tem com os vasos sanguíneos varia nesta ordem estando relacionado com a posição da glândula. No caso da rã-touro, a glândula compõe-se de cordões celulares enclausurados uns nos outros, onde as células cromafins se arranjam em grande número. Estes cordões formam linhas laterais que são supridas por vasos delgados (MILANO e ACCORDI, 1983). O arranjo específico da glândula em anfíbios favorece a interação das células esteroidogênicas e cromafins (DELARUE *et al.*, 1990; CAPALDO *et al.*, 2008a, b).

Em mamíferos, a camada cortical da adrenal produz hormônios adrenocorticóides, que podem ser glicocorticóides, mineralocorticóides entre outros. Os glicocorticóides, representados principalmente pelo cortisol e corticosterona, agem particularmente nos metabolismos protéico, lipídico e dos carboidratos. Promovem o catabolismo protéico com conseqüente aumento na produção de glicogênio (neoglicogênese) e elevação da taxa de glicose no sangue entre outras funções. Os mineralocorticóides, dos quais o mais importante é a aldosterona, agem principalmente nos túbulos renais, mas também na mucosa gástrica, glândulas salivares, e sudoríparas, estimulando a reabsorção de sódio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Ainda segundo estes mesmos autores, a camada medular secreta catecolaminas, representada pela epinefrina e noraepinefrina, substâncias mediadoras químicas do sistema nervoso simpático através das células cromafins. O principal hormônio, a epinefrina afeta o sistema cardiovascular e o fluxo sanguíneo para o cérebro, fígado, rim e



músculos, atuando como vasodilatador enquanto a noraepinefrina geralmente atua como vaso constritor. As catecolaminas são liberadas no organismo sempre que há necessidade de mobilização de substratos energéticos e incremento no transporte de oxigênio no sangue (LIMA *et al.*, 2006). Devido à comunicação direta com o sistema nervoso central, a secreção das células cromafíns é imediata e logo após o evento estressor as catecolaminas apresentam níveis elevados na circulação sanguínea (BARTON, 2002).

## ***2.4 Biomarcadores***

### ***2.4.1 Parâmetro Endócrino - Corticosterona***

Os vertebrados geralmente respondem ao estímulo estressor com aumentos nos níveis dos glicocorticóides, cortisol ou corticosterona, dependendo da espécie (ROMERO, 2002). Em anfíbios, a corticosterona é o principal glicocorticóide (FEDER e BURGGREN, 1992; WADA, 2008) que mobiliza reservas energéticas e supre processos fisiológicos não vitais até que o estímulo estressor acabe (WINGFIELD e ROMERO, 2001; ROMERO, 2002). De imediato atua de forma benéfica ao organismo uma vez que tem sua sobrevivência garantida. Entretanto, elevações crônicas podem ter efeitos deletérios, incluindo diminuição do crescimento e desenvolvimento, bem como depressão do sistema imune entre outros (SAPOLSKY, 1993).

### ***2.4.2 Parâmetros Hematológicos***

Marcadores hematológicos também são utilizados na avaliação do estresse em anfíbios (WRIGHT, 2001; ALLENDER e FRY, 2008). O uso do perfil leucocitário para medir o estresse em anfíbios é apresentado em alguns estudos (ROMANOVA e ROMANOVA, 2003; DAVIS *et al.*, 2008; SHUTLER *et al.*, 2009). Os linfócitos estão envolvidos com a modulação da defesa imune (CAMPBELL, 1996). Os neutrófilos,

conhecidos como fagócitos, apresentam-se envolvidos na defesa de patógenos não específicos e inflamação (JAIN, 1993; THRALL, 2004). Os eosinófilos apresentam-se associados com a defesa parasitária (KIESECKER, 2002). Os basófilos não apresentam funções claras no sistema imune (RUPLEY, 1997), mas estão aparentemente envolvidos com inflamação. Já os monócitos apresentam-se como células fagocíticas na defesa contra inflamações e bactérias (CAMPBELL, 1995; DAVIS *et al.*, 2004).

Segundo SAPOLSKY *et al.* (2000), durante a resposta de estresse, a imunidade é diminuída de forma a redirecionar as reservas energéticas para atividades de maior valia na sobrevivência. WICK *et al.* (1993) e GENTZ (2007) relataram a interação entre imunologia e funções endócrinas promovendo a homeostase quando sob condições estressantes. Entretanto, a complexidade da liberação e interação dos hormônios envolvidos na resposta ao estresse e, principalmente os mecanismos utilizados pelos indivíduos para manterem sua homeostase carecem de elucidações (MOBERG, 2000).

### ***2.4.3 Parâmetros Morfológicos***

#### ***2.4.3.1 Células Cromafins (glândula interrenal)***

As células cromafins, responsáveis pela liberação das catecolaminas, epinefrina e noraepinefrina, adquirem uma cor característica, arroxeadada, denominada reação cromafim quando em contato com agentes oxidantes, como sais de cromo sendo facilmente visualizadas no corpo do rim.

Segundo DONALDSON (1981), a identificação de alterações nas cromafins pode auxiliar na avaliação da ocorrência de estresse, já que estudos histológicos podem ser indicadores desse evento.

#### ***2.4.3.2 Glândulas Mucosas (pele)***

As glândulas do tegumento em anfíbios dividem-se principalmente em mucosas e granulares (TOLEDO e JARED, 1995; CLARKE, 1997; WARBURG *et al.*, 2000).

As glândulas mucosas apresentam-se geralmente menores e mais numerosas que as granulares, produzem o muco que compõe parte de funções como respiração, reprodução, termorregulação e defesa. Em situações de estresse a síntese de muco aumenta e este produto acumula na superfície do corpo (THOMAS *et al.*, 1993; SCHUMACHER *et al.*, 1994; BRIZZI *et al.*, 2002; SAHIN *et al.*, 2008).

As glândulas granulares, maiores e mais escassas, secretam sob controle nervoso ou hormonal, componentes anti-fúngicos, anti-bacterianos, de natureza alcalóide e em alguns casos tóxica aos predadores, principalmente vertebrados (DELFINO *et al.*, 1999; GORAYA *et al.*, 2000; CONLON 2008, 2011; CONLON *et al.*, 2009; DIAMOND *et al.*, 2009). Em situação de estresse, durante o estado de exaustão, os animais apresentam diminuição da resistência a doenças e, conseqüente contaminação por bactérias e fungos oportunistas, podendo levá-los à morte uma vez que se trata da primeira linha de ataque (HANCOCK, 2001).

A avaliação morfológica dessas glândulas torna-se importante para identificar se colaboram com a queda da resistência dos animais, onde segundo DUELLMAN e TRUEB (1986), a epinefrina secretada pelo tecido cromafim localizado na interrenal pode causar aumento na atividade das glândulas do tegumento em anfíbios.

### ***3. OBJETIVOS***

### ***3.1 Objetivo geral***

Avaliar a resposta fisiológica da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), no clímax e logo após a metamorfose, submetida à condição de estresse por diferentes densidades e triagens (seleção por tamanho).

### ***3.2 Objetivos específicos***

- Validar fisiologicamente o kit de corticosterona para a espécie *L. catesbeianus*.
- Avaliar a corticosterona plasmática.
- Avaliar os parâmetros hematológicos da série vermelha e branca.
- Caracterizar a resposta terciária ao estresse através da avaliação das possíveis alterações histológicas nas células cromafins (glândula interrenal), bem como nas glândulas de muco (pele).
- Comparar os resultados obtidos em laboratório e campo.

#### ***4. MATERIAL E MÉTODOS***

#### ***4.1 Local e Período***

Os experimentos de Densidade e Triagem, etapas de laboratório e campo foram realizados no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba (PRDTAVP), da Secretaria da Agricultura e Abastecimento em Pindamonhanaba/SP, no período de novembro-dezembro/2009 (Densidade Laboratório), março-abril/2010 (Triagem Laboratório), novembro-dezembro/2010 (Densidade Campo) e fevereiro-março/2011 (Triagem Campo).

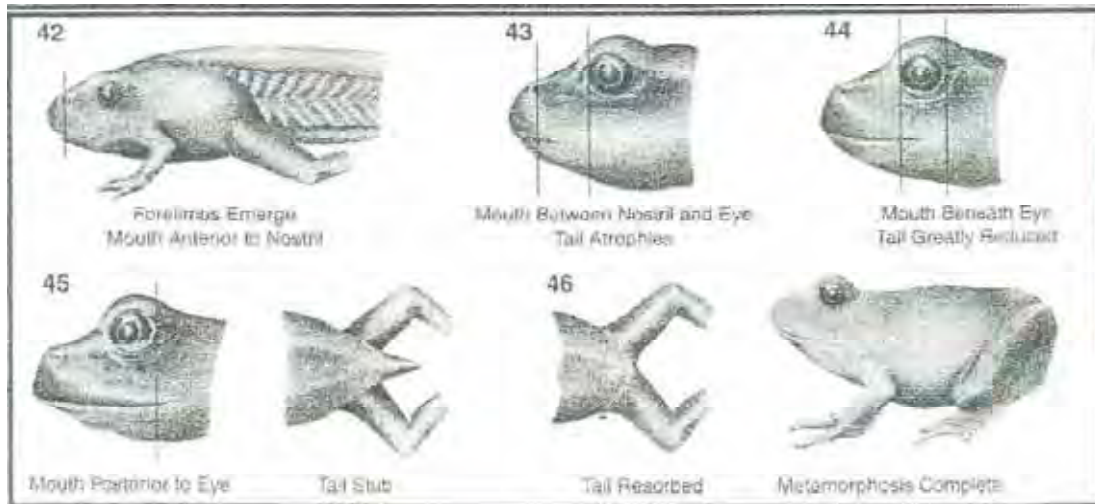
#### ***4.2 Delineamento***

O delineamento utilizado nos experimentos foi inteiramente casualizado. No experimento de Densidade utilizou-se quatro (4) tratamentos e dois (2) tempos de coleta. No experimento de Triagem utilizou-se três (3) tratamentos e dois (2) tempos de coleta.

#### ***4.3 Material Biológico e a Experimentação***

Animais no clímax da metamorfose, entre os estágios 42 a 45 de GOSNER (1960), com peso médio de 14g foram adquiridos para o experimento Densidade, e na fase de pós-metamorfose com peso médio de 8,0 g para o experimento de Triagem (Figura 1).

A experimentação foi realizada para avaliar os parâmetros de corticosterona plasmática, parâmetros sanguíneos e morfológicos nos tempos de coleta para os distintos tratamentos dos experimentos (Figura 2).



**FIGURA 1** - Esquema da tabela de GOSNER (1960) modificado por McDIARMID e ALTIG (1999), mostrando o clímax da metamorfose em rã-touro *L. catesbeianus* (estágio 42 ao 45) e metamorfose completa semelhante à pós-metamorfose (estágio 46)

### Estresse

D (diferentes densidades) laboratório/campo	T (diferentes triagens) laboratório/campo
Tratamentos D70 = 70 animais/m <sup>2</sup> D100 = 100 animais/m <sup>2</sup> D150 = 150 animais/m <sup>2</sup> D200 = 200 animais/m <sup>2</sup>	Tratamentos ST = sem triagem TP = com triagem parcial TT = com triagem total
Parâmetros avaliados bioquímico hematológico morfológico	Parâmetros avaliados bioquímico hematológico morfológico
Tempos de coleta MZ 15 dias 30 dias	Tempos de coleta MZ 15 dias 30 dias

**FIGURA 2** – Organograma experimental dos estresses de Densidade e Triagem com rã-touro, *L. catesbeianus* apresentando os tratamentos aplicados, os parâmetros avaliados e os tempos de coleta; (M.Z) Momento Zero, coleta antes do início do experimento



#### ***4.3.1 Experimento Densidade laboratório e campo***

No *laboratório*, foram utilizados 219 girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no clímax da metamorfose, entre os estágios 42 a 45 de GOSNER (1960), com peso médio de 14g. Os animais foram transportados para Unidade Experimental do PRDAVP em Pindamonhangaba/SP e aclimatados pelo período de quatro dias em caixas de propileno de 40L (0,33 x 0,46 x 0,27m). A seguir, foram mensurados e distribuídos, aleatoriamente, em caixas de polipropileno (0,47 x 0,30 x 0,17 m) (BUENO-GUIMARÃES, 1999), com água apenas na parte da piscina.

O experimento foi conduzido com quatro tratamentos: 70 animais m<sup>-2</sup> (D70); 100 animais m<sup>-2</sup> (D100); 150 animais m<sup>-2</sup> (D150) e 200 animais m<sup>-2</sup> (D200) com respectivos 10, 14, 21 e 28 animais/caixa. Cada tratamento foi realizado com três réplicas simultâneas. Doze organismos foram amostrados antes da experimentação (MZ – momento zero), e dois organismos de cada réplica (6 animais/tratamento) nos tempos 15 e 30 dias (totalizando 60 animais) para avaliação do perfil hormonal, hematológico e morfológico (Figura 3).

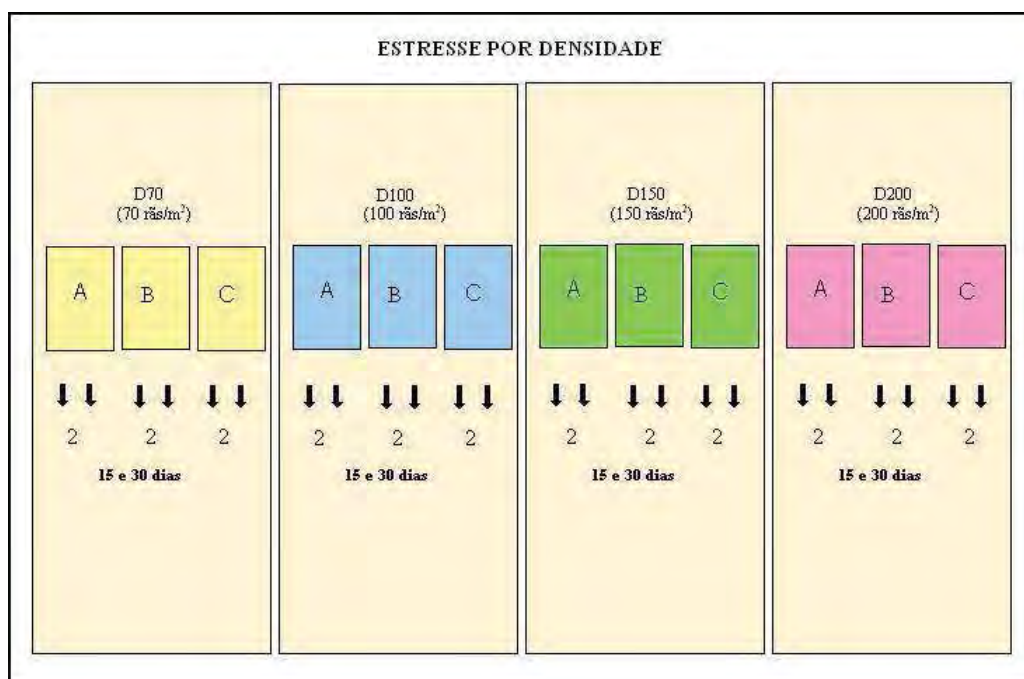
Segundo FERREIRA *et al.* (2002), a densidade de 100 animais m<sup>-2</sup> é recomendada quanto ao crescimento e sobrevivência frente a seu custo benefício em produções comerciais em sistema semi-seco e por esta razão foi utilizado como densidade controle nesta experimentação.

À medida que os animais eram retirados para amostragem foi realizado o reajuste do espaço interno das caixas com um aparato de fibra plástica simulando uma parede, para que a densidade inicial fosse mantida.

No *campo*, foram utilizados 1560 girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no clímax da metamorfose, entre os estágios 42 a 45 de GOSNER (1960), com peso médio de 14 g. Os animais foram transportados para a Unidade Experimental do PRDAVP, em

Pindamonhangaba/SP e, aclimatados pelo período de quatro dias em caixas de propileno de 140L (0,52 x 0,69 x 0,40m). A seguir, foram mensurados e distribuídos aleatoriamente em caixas de alvenaria (1,10 x 0,77 x 0,80 m), levemente inclinadas de forma a simular uma piscina. Foi conduzido o mesmo delineamento experimental realizado em laboratório. Doze organismos foram amostrados antes da experimentação (MZ), e três organismos de cada réplica (9 animais/tratamento) foram amostrados nos tempos 15 e 30 dias (totalizando 84 animais) para avaliação do perfil hormonal, hematológico e morfológico (Figura 3).

À medida que os animais eram retirados para amostragem foi realizado o reajuste do espaço interno das caixas de alvenaria, com um aparato de fibra de coco, para que a densidade inicial fosse mantida.



**FIGURA 3** – Esboço experimental para o estresse de Densidade em rã-touro, *L. catesbeianus* com os distintos tratamentos, réplicas e animais amostrados nos períodos de coleta

### ***4.3.2 Experimento Triagem laboratório e campo***

No *laboratório*, foram utilizados 168 imagos de rã-touro (*L. catesbeianus*) na fase de pós-metamorfose com peso médio de 8,0 g. Os animais foram transportados para a Unidade Experimental do PRDTAVP, em Pindamonhangaba/SP e aclimatados pelo período de quatro dias em caixas de propileno de 40L (0,33 x 0,46 x 0,27m). A seguir, foram mensurados e distribuídos aleatoriamente nas mesmas caixas experimentais de propileno utilizadas no laboratório.

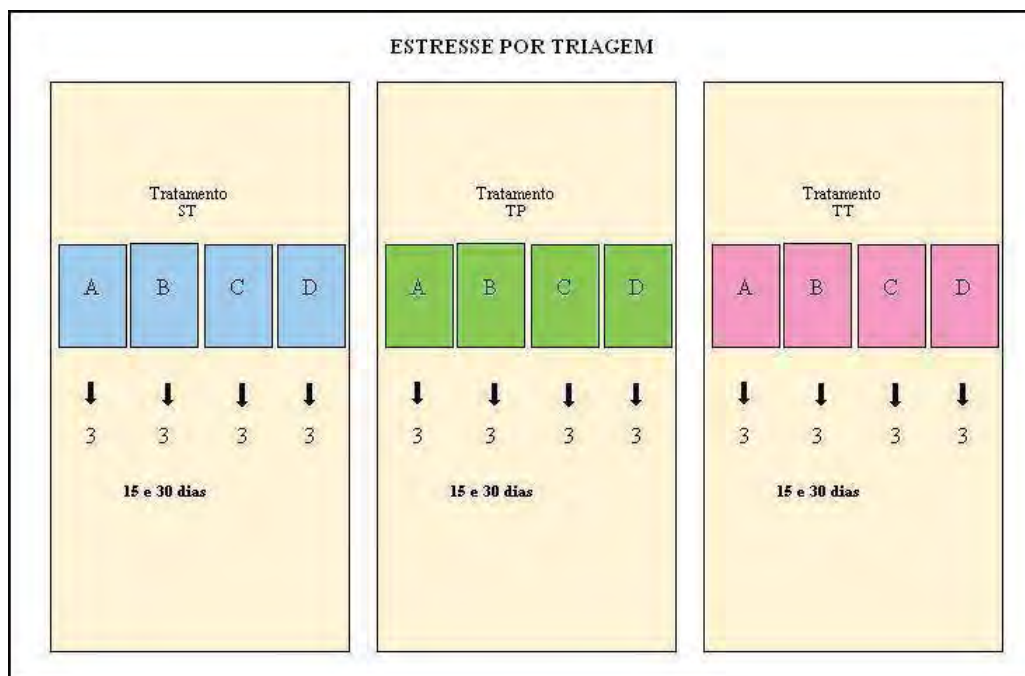
O experimento foi conduzido com três tratamentos: Sem Triagem (ST); Triagem Parcial (TP) a cada 15 dias e Triagem Total (TT) a cada 15 dias. Cada tratamento foi realizado com quatro réplicas simultâneas. Dezoito organismos foram amostrados antes da experimentação (MZ), e três organismos de cada réplica (12 animais/tratamento) foram amostrados nos tempos 15 e 30 dias (totalizando 90 animais) para avaliação do perfil hormonal, hematológico e morfológico (Figura 4). A densidade utilizada foi de 100 animais m<sup>-2</sup> correspondendo a 14 animais/caixa.

A triagem é praticada de forma a uniformizar o plantel diminuindo assim as perdas por canibalismo onde, no triar dos animais, a dominância/subordinação estabelecida naquele determinado espaço é reestruturada e respostas fisiológicas são aplicadas frente a nova situação de territorialidade.

O tratamento Sem Triagem (ST) caracterizou-se por um processo de não manipulação. O tratamento Triagem Parcial (TP) consistiu na retirada dos animais parcialmente levando-se em consideração seu tamanho, ou seja, foram retirados os animais com tamanho bastante diferenciado em comparação aos demais do mesmo lote (cerca de 10% dos animais) e colocados em baldes, sendo 1 balde/réplica. Estes animais foram reorganizados por tamanho e colocados de volta às caixas de forma a manter a densidade com “uniformidade”. O tratamento Triagem Total (TT) consistiu na retirada total dos animais das caixas e de sua separação por

tamanho: em pequeno (Pq, 8 gramas), médio pequenos (Mp, 10 gramas), médio grandes (Mg, 12 gramas) e grande (G, 14 gramas) em diferentes baldes, 4 baldes/réplica. Estes animais foram da mesma forma reorganizados por tamanho e colocados de volta nas caixas mantendo a densidade com uniformidade de tamanho dos animais, representado pela combinação de peso com o comprimento (FONTANELLO *et al.*, 1993).

No *campo*, foram utilizados 1200 imagos de rã-touro (*L. catesbeianus*) na fase de pós-metamorfose com peso médio de 8,0 g. Os animais foram transportados para a Unidade Experimental do PRDAVP, em Pindamonhangaba/SP, e aclimatados pelo período de quatro dias em caixas de propileno de 40L (0,33 x 0,46 x 0,27m). A seguir, foram mensurados e distribuídos aleatoriamente nas mesmas caixas experimentais de alvenaria de forma a repetir o delineamento realizado no laboratório. Dezoito organismos foram amostrados antes da experimentação (MZ), e três organismos de cada réplica (9 animais/tratamento) foram amostrados nos tempos 15 e 30 dias (totalizando 90 animais) para avaliação do perfil hormonal, hematológico e morfológico (Figura 4). A densidade utilizada foi de 100 animais m<sup>-2</sup>



**FIGURA 4** – Esboço experimental para o estresse de Triagem em rã-touro, *L. catesbeianus* com os distintos tratamentos, réplicas e animais amostrados nos períodos de coleta

#### ***4.4 Condições abióticas e Manejo***

A temperatura média do ar foi monitorada através de termômetro de máx e min, no laboratório e no campo. Apenas o fotoperíodo do laboratório foi controlado em 12:12 com auxílio de timer.

Os animais foram alimentados diariamente com ração peletizada contendo 40% de proteína bruta, na quantidade de 10% PV apenas 1x/dia em ambos os experimentos de Densidade e Triagem, sendo o alimento ofertado em bandejas fazendo o uso de larvas de mosca como indutor biológico.

A água da “piscina” das caixas foi trocada diariamente de forma a causar o mínimo de perturbação aos animais. No laboratório, a água foi previamente declorada e a troca se dava por meio de um sistema de sifão com auxílio de baldes. No campo, a água foi filtrada por um sistema de pedras e cascalhos de maneira a retirar algumas sujidades. A troca se dava por meio de um sistema de cotovelo sendo a renovação de água em fluxo contínuo.

As caixas foram limpas diariamente para retirar restos de alimento e pele apenas com o uso de mangueira, de maneira rápida para não interferir na experimentação. A mortalidade dos animais foi registrada diariamente.

#### ***4.5 Avaliações***

##### ***4.5.1 Parâmetros Endócrinos***

###### ***4.5.1.1 Validação fisiológica da corticosterona***

O desafio hormonal foi realizado para validação do kit de dosagem de corticosterona plasmática, para a espécie *L. catesbeianus* frente à administração de ACTH (fármaco estimulador) e Dexametasona (fármaco supressor). Este procedimento foi necessário para acompanhar o comportamento deste glicocorticóide nesta espécie de anuro para validar as análises de corticosterona realizadas por radioimunoensaio

utilizando-se um kit comercial desenvolvido para dosagem de corticosterona de ratos, previamente validado laboratorialmente para esta espécie de anuro por KNOOP *et al.* (2011).

O desenho experimental foi uma adaptação de um protocolo padrão usado para mamíferos constituído de quatro grupos. Foram utilizadas rãs-touro (*L. catesbeianus*) adultas, dois machos e duas fêmeas adquiridas em ranários comerciais. Os animais foram transportados para a Unidade Laboratorial de Referência em Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA), no Instituto de Pesca/APTA/SAA em São Paulo/SP e, aclimatados pelo período de quatro dias. A seguir foram mensurados e distribuídos, aleatoriamente, em caixas de polipropileno (0,47 x 0,30 x 0,17 m) (BUENO-GUIMARÃES, 1999), totalmente inundadas com lâmina d'água de 0,03 m.

O experimento foi realizado com quatro tratamentos. O 1º grupo (Controle) foi injetado com solução salina e foram coletadas amostras basais, cinco minutos e 1 hora após a aplicação da solução. O 2º grupo foi desafiado com ACTH (10 U/250 g de massa corporal) e foram coletadas amostras basais, cinco minutos e 1 hora após aplicação deste hormônio. O 3º grupo foi suprimido com 0,4 mL de dexametasona (DXM) e foram coletadas amostras basais, cinco minutos após a aplicação de DXM, e após 4 e 8 horas de aplicação. O 4º grupo representou o grupo controle de manipulação com coletas de amostras basais, cinco minutos e 1 hora após a manipulação. As amostras foram coletadas no período da manhã, com animais em jejum não prolongado.

Durante o período de experimentação a água das caixas foi trocada de maneira rápida de forma a causar o mínimo de perturbação aos animais. A água de laboratório utilizada foi declorada e oriunda de água de abastecimento. O fotoperíodo foi mantido em 12:12 e a temperatura média do ar em 26°C.

As amostras sanguíneas foram coletadas através da punção do vaso do membro posterior, com auxílio de seringas e agulhas descartáveis e heparinizadas. Como anestésico local externo foi utilizada lidocaína. A coleta seguiu-se no período da manhã, diante de uma possível variação circadiana dos animais. O sangue utilizado para a análise de corticosterona foi inicialmente acondicionado em microtubos previamente heparinizados e, mantidos em gelo. Em seguida, centrifugado a 1006 x g, por 10 minutos para a obtenção do plasma e, finalmente, congelado para posterior análise.

Para a dosagem da corticosterona plasmática foi utilizada a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase líquida, por meio do conjunto diagnóstico comercial (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

#### ***4.5.1.2 Corticosterona***

A primeira alíquota de sangue foi utilizada para a análise de corticosterona seguindo-se o mesmo procedimento de coleta sanguínea. O plasma resultante foi utilizado para a dosagem da corticosterona plasmática segundo a técnica de radioimunoensaio (RIE) (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA) e as análises realizadas no LDH do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP.

#### ***4.5.2 Parâmetros hematológicos***

O restante do sangue foi utilizado para análises hematológicas, cuja metodologia seguiu as recomendações internacionais: contagem de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer utilizando-se a solução de Hayem como diluente; hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito; taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da

cianometahemoglobina; contagem total dos leucócitos (CTL) e contagem diferencial de leucócitos (CDL), em extensões sangüíneas coradas por método de ROSENFELD (1949), e os índices hematimétricos absolutos: Volume Corpuscular Médio ( $VCM = Ht \times 100/Er_m$ , em fentolitros), Hemoglobina Corpuscular Média ( $HCM = Hb \times 100/Er_m$  em pg/cel) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média ( $CHCM = Hb \times 100/Ht$  em %).

#### ***4.5.3 Parâmetros morfológicos***

A resposta ao estresse foi observada ainda através da análise morfológica do rim e da pele. Os animais foram anestesiados por benzocaína (1g:1 ½ L) e, posteriormente mortos através de secção medular. Os rins e secções da pele (região dorsal  $\pm 0,5 \text{ cm}^2$ ) de 6 animais/tratamento, aos 15 e 30 dias foram retirados para posterior fixação por 24h em solução de Karvovsky (KARNOVSKY, 1965). Foram realizados banhos em tampão fosfato a 10%, durante sete dias para a rotina de inclusão em Paraplast (Oxford - USA). As secções histológicas de  $2\mu\text{m}$  de espessura em cortes longitudinais foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H/E) e submetidas à reação com o Ácido Periódico de Schiff (PAS), para análise das características estruturais das células cromafins (rim) e da glândula de muco (pele). A rotina de inclusão em Histoiresina (Leica Microsystems Nussloch, Alemanha) foi aplicada para efeito da morfometria do material seguindo-se o mesmo padrão de corte histológico e coloração da inclusão em Paraplast.

A análise e a fotodocumentação digital foi realizada no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Depto de Ciências Biológicas da UNESP - Bauru/SP, com a utilização de um fotomicroscópio Olympus BX 40 acoplado a um sistema de câmara digital Olympus DP12.

Os estudos morfométricos foram realizados utilizando-se o programa computacional de imagens Image Pro Plus® Version 4.1 (Media Cybernetics – USA),



onde foi mensurado a área ocupada pelas células cromafins. Para tanto foram avaliadas cinco secções histológicas de cada um dos seis indivíduos coletados em cada tratamento, aos 15 e 30 dias.

A leitura e interpretação dos dados ocorreu através da observação de hiperplasia nas células cromafins da glândula interrenal, além da avaliação das glândulas mucosas presentes no epitélio de revestimento da pele.

#### ***4.6 Análise estatística***

A análise descritiva das variáveis do estudo foi apresentada em termos de seus valores de tendência central e de dispersão (média e erro padrão). Testes foram realizados para verificar a normalidade dos dados (Shapiro-Wilk e Bartlett) e a homogeneidade das variâncias (F). Os dados de células brancas foram testados após transformação raiz ( $x+1$ ), de modo a atender a essas premissas. Os dados foram testados por meio da análise de variância (ANOVA TWO WAY) seguida pelo teste *a posteriori* de Tukey de forma a verificar em quais situações houve diferenças significativas no número de células e nos níveis de corticosterona com relação às triagens e densidades. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$  (ZAR, 1999). O programa estatístico utilizado foi STATISTICA (Statsoft).

## ***5. RESULTADOS***

## **5.1 Condições abióticas e Manejo**

A temperatura média do ar dos experimentos realizados no laboratório (Validação Fisiológica, Densidade e Triagem) foi de 25 °C e a dos experimentos realizados no campo (Densidade e Triagem) foi de 26 °C. Segundo FIGUEIREDO *et al.* (2001) estas condições apresentam-se como ideais para o conforto térmico da referida espécie.

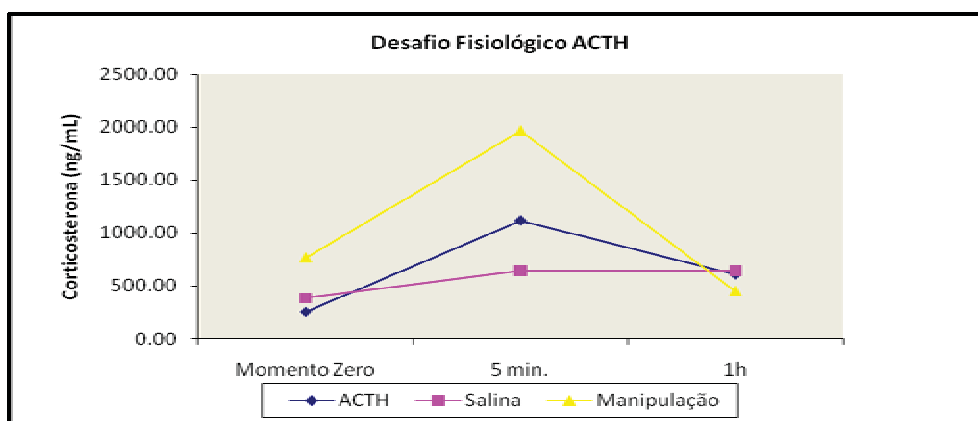
No experimento de *Densidade e Triagem laboratório* não foi observado canibalismo e mortalidade. Já no experimento de *Densidade campo*, a taxa média de canibalismo foi de 14% e a média de mortalidade foi de 8%. E no experimento de *Triagem campo* a taxa média de canibalismo foi de 30% e a média de mortalidade foi de 20%.

## **5.2 Parâmetro Endócrino**

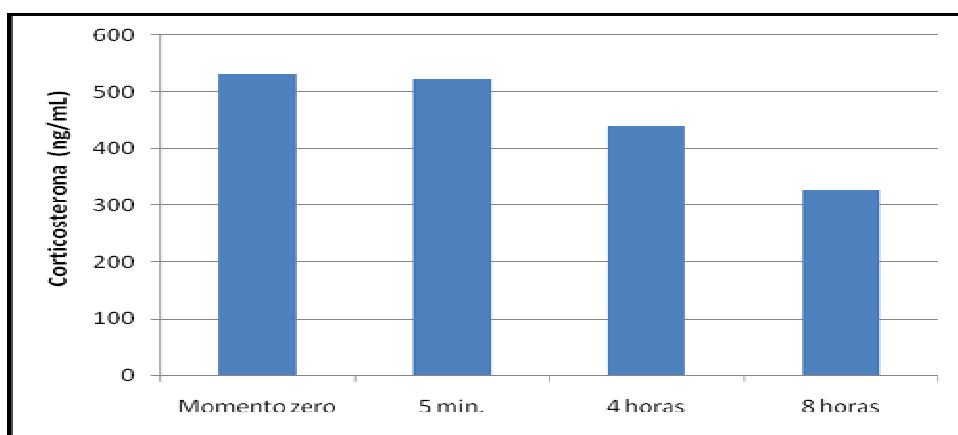
### **5.2.1 Validação Fisiológica**

Os resultados obtidos demonstraram haver diferença quantitativa em relação aos parâmetros testados. Os níveis de ACTH mostraram-se maiores que o controle cinco minutos após a aplicação do hormônio, demonstrando a eficiência do fármaco testado. Os resultados da manipulação também atingiram níveis altos no mesmo momento em relação aos outros tratamentos, havendo uma estabilização nos níveis de corticosterona em todos os grupos, uma hora após as administrações (Figura 5a). O tratamento com DXM apresentou níveis de supressão de corticosterona ao longo do tempo de coleta sendo estes diminuídos oito horas após a administração da dose (Figura 5b).

Os coeficientes de variação intra-ensaio para os valores baixos foram menores que 8,61% e para os valores altos foram menores que 5,55%. Os coeficientes de variação inter-ensaio para os valores baixos foram de 4,95% e para os valores altos foram de 2,52%.



**FIGURA 5a** – Níveis de corticosterona plasmática em  $\text{ng mL}^{-1}$  para o ACTH, solução salina e grupo manipulação nos diferentes tempos de coleta em *L. catesbeianus*



**FIGURA 5b** – Níveis de corticosterona plasmática em  $\text{ng mL}^{-1}$  após supressão com Dexametasona no decorrer do tempo em *L. catesbeianus*

Os resultados alcançados podem ser considerados como uma validação hormonal do ponto de vista das variações quantitativas visíveis, entretanto, a análise de variância não indicou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p=0,407$  para ACTH, Salina e Manipulação e,  $p=0,797$  para DXM). Este fato sugere adequações das doses de ACTH e DXM.

## 5.2.2 Corticosterona

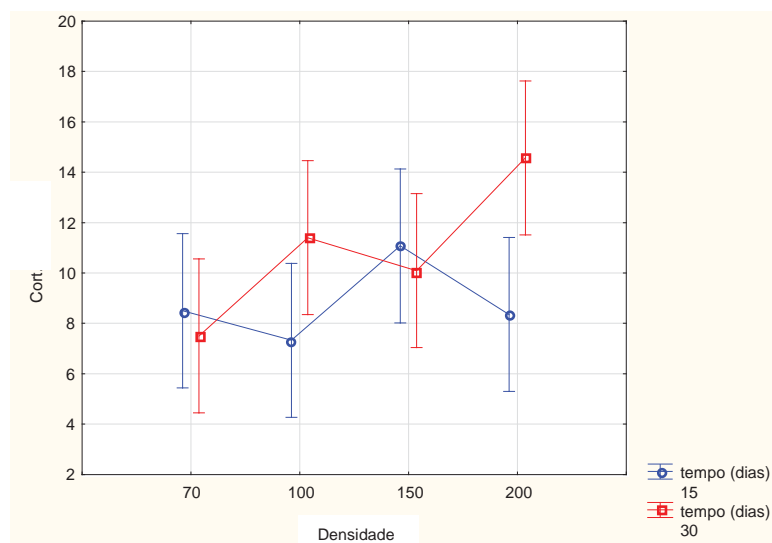
### 5.2.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo

Os dados da corticosterona plasmática encontrados nos animais do experimento de Densidade laboratório são apresentados na Tabela 1 e na Figura 6. Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $16,37 \pm 1,75$  ng mL<sup>-1</sup> de corticosterona. Observa-se através da ANOVA que ocorreram diferenças significativas para a interação tempo X tratamento, onde os animais submetidos ao tratamento D200 aos 30 dias mostraram níveis superiores aqueles submetidos aos tratamentos D100 aos 15 dias e D70 aos 30 dias.

**TABELA 1** - Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=48)

Tempo (dias)	Densidade	CORT(ng mL <sup>-1</sup> )	
15	70	8,50 ± 0,79	A'B'
	100	7,33 ± 1,46	A'D'
	150	11,08 ± 1,02	A'B'
	200	8,35 ± 1,26	A'B'
30	70	7,50 ± 1,88	A'C'
	100	11,40 ± 0,91	A'B'
	150	10,09 ± 1,84	A'B'
	200	14,57 ± 2,21	B'
		F	p
T		3,82	0,06
Densidade		2,00	0,13
T x Densidade		2,95	0,04

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ )



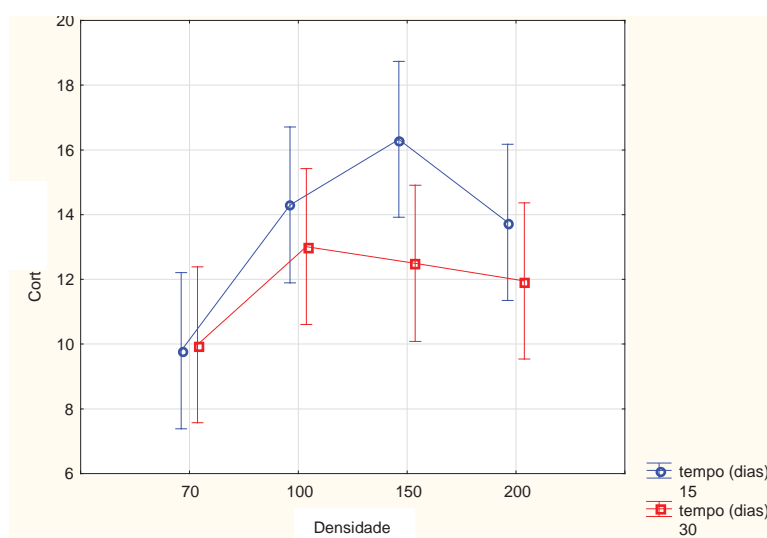
**FIGURA 6** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório

Os dados da corticosterona plasmática encontrados nos animais do experimento de Densidade campo são apresentados na Tabela 2 e na Figura 7. Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $11,05 \pm 1,42 \text{ ng mL}^{-1}$  de corticosterona. Observa-se através da ANOVA que ocorreram diferenças significativas somente para os tratamentos, onde os animais submetidos ao tratamento D200 mostrou níveis de corticosterona inferiores aqueles submetidos aos tratamentos D100 e D150.

**TABELA 2** - Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

Tempo (dias)	Densidade	CORT(ng.mL <sup>-1</sup> )	
15	70	9,80 ± 0,49 a	
	100	14,30 ± 0,61 b	
	150	16,33 ± 1,65 b	
	200	13,76 ± 1,19 a	
30	70	9,98 ± 0,90 a	
	100	13,01 ± 1,17 b	
	150	12,49 ± 1,16 b	
	200	11,95 ± 1,76 a	
		F	p
T		4,00	0,06
Densidade		5,51	0,00
T x Densidade		0,96	0,41

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (‘) refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



**FIGURA 7** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo

### 5.2.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo

Os dados da corticosterona plasmática encontrados nos animais do experimento de Triagem laboratório são apresentados na Tabela 3 e na Figura 8. Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $6,52 \pm 0,87 \text{ ng mL}^{-1}$  de corticosterona. Observa-se através da ANOVA que ocorreram diferenças altamente significativas somente para os tratamentos onde os animais submetidos aos tratamentos com triagem (TP e TT) mostraram níveis de corticosterona superiores aqueles submetidos ao tratamento sem triagem (ST).

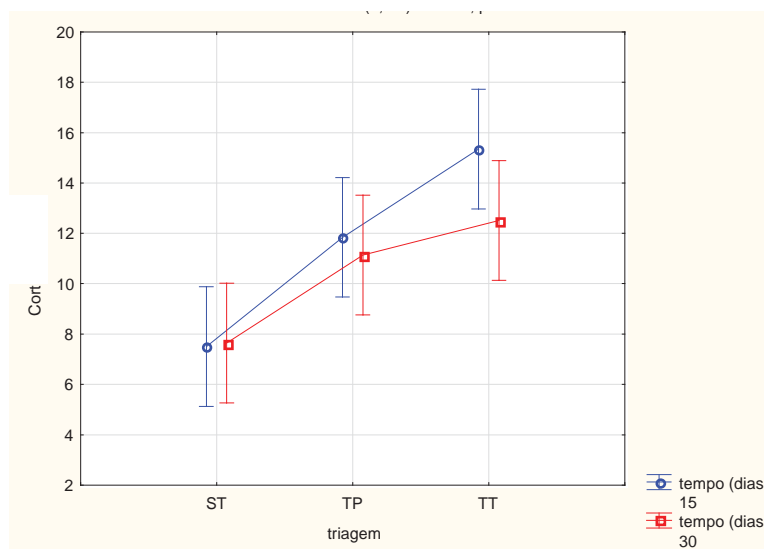
**TABELA 3** - Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=72)

Tempo (dias)	Triagem	CORT( $\text{ng mL}^{-1}$ )	
15	ST	$7,51 \pm 0,98$	a
	TP	$11,84 \pm 1,39$	b
	TT	$15,35 \pm 1,21$	b
30	ST	$7,64 \pm 1,01$	a
	TP	$11,14 \pm 1,12$	b
	TT	$12,51 \pm 1,31$	b
		F	p
T		1,38	0,24
Triagem		14,75	0,00
T x Triagem		0,84	0,43

ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (\*) refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ )





**FIGURA 8** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catsebeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório

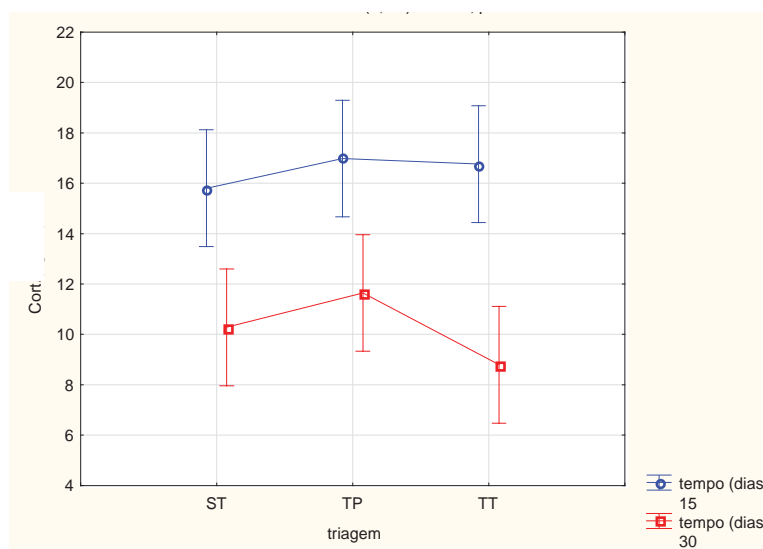
Os dados da corticosterona plasmática encontrados nos animais do experimento de Triagem campo são apresentados na Tabela 4 e na Figura 9. Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $13,41 \pm 1,63 \text{ ng mL}^{-1}$  de corticosterona. Observa-se através da ANOVA que ocorreram diferenças altamente significativas somente para os tempos, onde os animais aos 30 dias mostraram níveis de corticosterona plasmática inferiores aqueles aos 15 dias, independente do tratamento.

**TABELA 4** - Média e erro padrão de corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

Tempo (dias)	Triagem	CORT(ng.mL-1)	
15	ST	15,80 ± 1,14 A	
	TP	16,98 ± 1,42 A	
	TT	16,76 ± 1,06 A	
30	ST	10,28 ± 1,37 B	
	TP	11,64 ± 0,99 B	
	TT	8,80 ± 0,74 B	
		F	p
T		44,84	0,00
Triagem		1,01	0,36
T x Triagem		0,81	0,44

ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (\*) refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ )



**FIGURA 9** - Valores médios e erro padrão da corticosterona plasmática (CORT) de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo

### ***5.3 Parâmetros hematológicos***

#### ***5.3.1 Eritrograma***

##### ***5.3.1.1 Experimento de Densidade laboratório e campo***

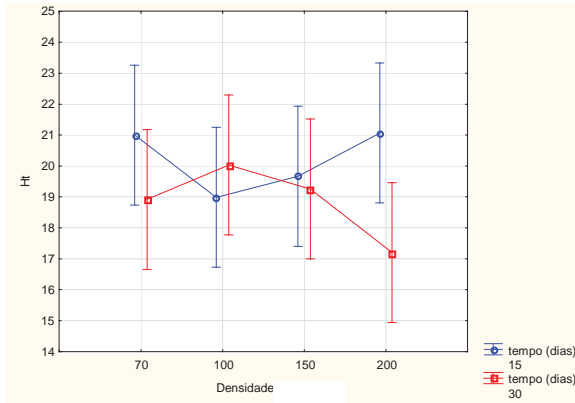
Os dados do eritrograma encontrados no animais do experimento de Densidade laboratório são apresentados na Tabela 5 e na Figura 10 (a-f). Os animais amostrados no MZ, antes da experimentação apresentaram média de hematócrito:  $25,96 \pm 1,31$  %; taxa de hemoglobina:  $6,04 \pm 0,36$  g.100 mL<sup>-1</sup>; número de eritrócitos:  $351000,00 \pm 9669,54$  10<sup>4</sup>mm<sup>-3</sup>; VCM:  $821,72 \pm 9,91$  fL; HCM:  $185,50 \pm 5,50$  pg cel<sup>-1</sup>; CHCM:  $22,60 \pm 0,57$  %.

**TABELA 5** - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=48)

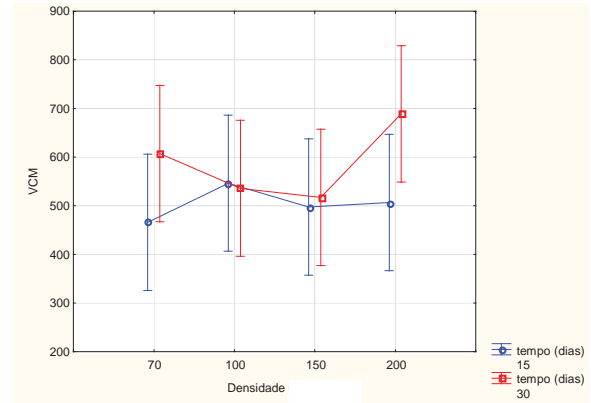
Tempo (dia)	densidade	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM					
15	70	21,00 ± 1,10	5,84 ± 0,32	361000,00 ± 39032,04	465,90 ± 74,40	151,91 ± 8,68	27,92 ± 1,38					
	100	18,99 ± 1,65	6,60 ± 0,38	363000,00 ± 35517,60	546,43 ± 14,56	160,49 ± 14,77	35,29 ± 2,20					
	150	19,67 ± 1,04	5,31 ± 0,36	371000,00 ± 26944,39	497,34 ± 26,82	144,78 ± 14,21	25,70 ± 1,07					
	200	21,07 ± 0,76	5,89 ± 0,33	414000,00 ± 66226,88	506,63 ± 57,27	146,40 ± 21,53	32,21 ± 2,59					
30	70	18,92 ± 1,06	5,00 ± 0,34	317000,00 ± 27046,26	607,23 ± 35,96	160,79 ± 11,80	27,53 ± 0,41					
	100	20,03 ± 1,24	5,66 ± 0,22	398000,00 ± 47397,26	535,93 ± 55,72	165,55 ± 11,92	27,58 ± 1,44					
	150	19,25 ± 0,84	4,87 ± 0,17	379000,00 ± 21412,61	517,00 ± 21,57	122,08 ± 4,47	24,38 ± 0,97					
	200	17,20 ± 0,97	4,64 ± 0,18	219000,00 ± 34256,39	688,89 ± 152,44	235,27 ± 40,12	25,93 ± 0,64					
T	F	p	F	p	F	p	F	p				
Densidade	2,87	0,10	16,89	0,00	3,07	0,08	2,92	0,10	2,23	0,14	13,54	0,00
T x Densidade	0,18	0,90	4,69	0,00	1,18	0,33	0,60	0,62	3,11	0,03	6,25	0,00
	1,82	0,16	0,63	0,59	3,37	0,03	0,91	0,44	3,21	0,03	2,86	0,05

Ht - hematócrito (%); Hb - taxa de hemoglobina (g.100 mL<sup>-1</sup>); RBC - número de eritrócitos (10<sup>4</sup>.mm<sup>-3</sup>); VCM - Volume Corpuscular Médio (fL); HCM - Hemoglobina Corpuscular Média (pg.cel<sup>-1</sup>); CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%).

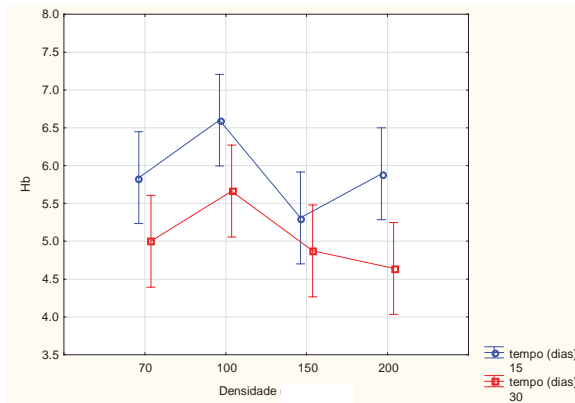
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



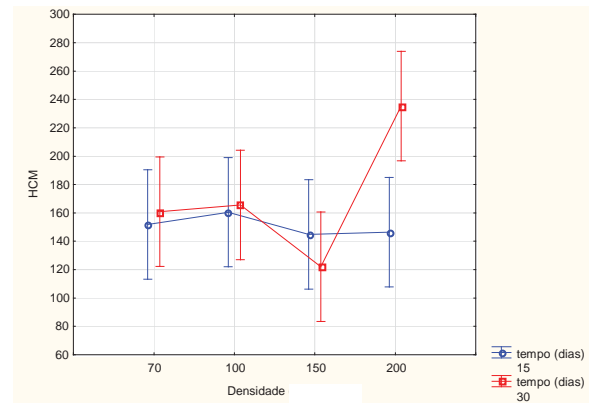
(a)



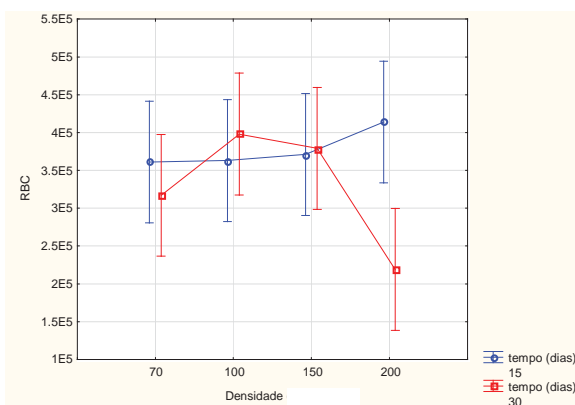
(d)



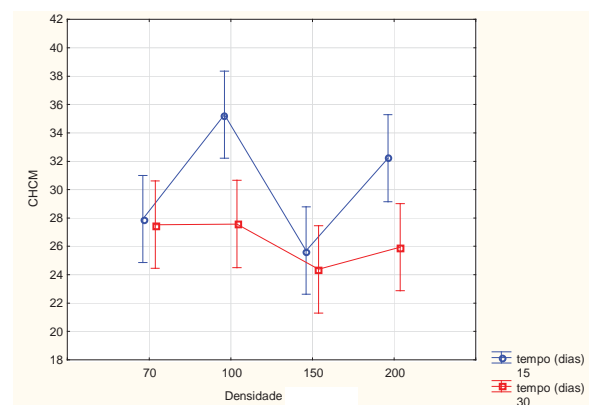
(b)



(e)



(c)



(f)

**FIGURA 10** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa da Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM, respectivamente

Observa-se através da ANOVA do eritrograma, do experimento de Densidade laboratório que não ocorreram diferenças significativas nos valores do hematócrito (Ht) ( $p > 0,05$ ) nos diferentes tempos e tratamentos, que apesar da não significância, foi observada uma tendência de diminuição ao longo do tempo mostrando queda para os animais do tratamento D200 ao final do experimento. Porém ocorreram diferenças nos valores da taxa de hemoglobina (Hb) sendo altamente significativas para os tempos ( $p < 0,0001$ ) onde a Hb dos animais aos 30 dias mostrou diminuição, e significativas para os tratamentos ( $p < 0,05$ ) onde os animais submetidos as maiores densidades mostraram diminuição de Hb. Para número de eritrócitos (Er) ocorreram diferenças significativas para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,05$ ), onde o Er dos animais submetidos ao tratamento D200 no tempo 30 dias mostraram diminuição.

Nos índices hematimétricos, não ocorreram diferenças significativas nos valores do VCM ( $p > 0,05$ ), que apesar da não significância, uma tendência de aumento deste índice foi observado para os animais do tratamento D200 ao final do experimento. Para os valores do HCM ocorreram diferenças significativas para os tratamentos e para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,05$ ), onde os animais submetidos ao tratamento D200 aos 30 dias mostraram aumento do HCM. Para os valores do CHCM ocorreram diferenças significativas para os tempos e para os tratamentos ( $p < 0,05$ ), onde os animais aos 30 dias mostraram diminuição do CHCM e, os animais do tratamento D150 mostraram menor CHCM do que os dos demais tratamentos.

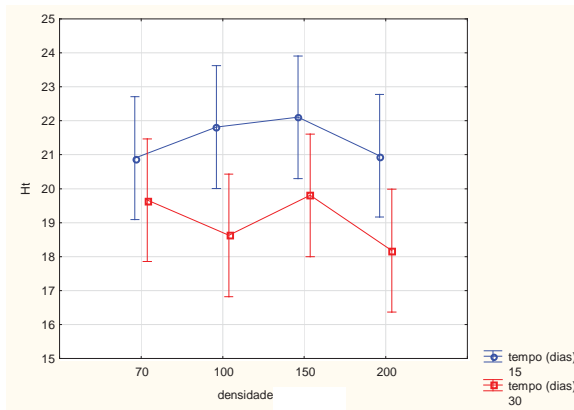
Os dados do eritrograma encontrados nos animais do experimento de Densidade campo são apresentados na Tabela 6 e na Figura 11 (a-f). Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de hematócrito:  $21,47 \pm 0,32$  %; taxa de hemoglobina:  $5,13 \pm 0,16$  g.100 mL<sup>-1</sup>; número de eritrócitos:  $331666,67 \pm 21160,76$  10<sup>4</sup> mm<sup>-3</sup>; VCM:  $578,61 \pm 27,01$  fL; HCM:  $160,82 \pm 7,38$  pg cel<sup>-1</sup> e CHCM:  $24,14 \pm 0,46$  %.

**TABELA 6** - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catenellatus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

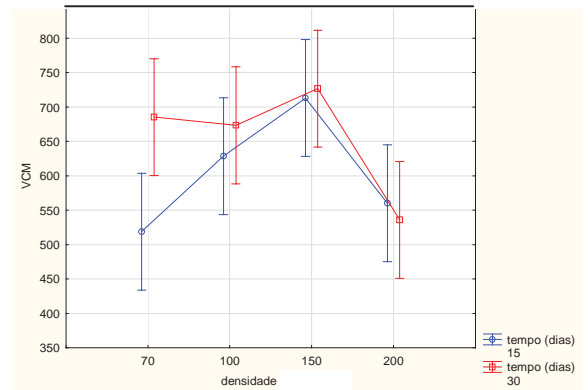
Tempo (dia)	densidade	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
15	70	20,90 ± 1,52 A	4,46 ± 0,23 A	308333,33 ± 14063,35 ab	518,97 ± 35,59 a	123,00 ± 5,44 A	21,55 ± 1,12
	100	21,82 ± 0,79 A	4,77 ± 0,37 A	295000,00 ± 23380,90 ab	628,77 ± 43,39 ab	125,83 ± 9,85 A	21,11 ± 1,17
	150	22,11 ± 0,65 A	4,22 ± 0,17 A	300000,00 ± 12382,78 a	713,12 ± 47,24 b	126,61 ± 13,04 A	20,43 ± 0,46
	200	20,97 ± 0,76 A	4,41 ± 0,18 A	343333,33 ± 18242,20 b	560,13 ± 27,51 ac	123,69 ± 7,19 A	22,03 ± 0,97
30	70	19,67 ± 0,61 B	4,34 ± 0,23 B	288333,33 ± 17061,98 ab	685,41 ± 43,53 a	176,93 ± 9,15 B	20,46 ± 1,15
	100	18,63 ± 0,85 B	3,79 ± 0,31 B	280833,33 ± 24338,47 ab	673,48 ± 27,02 ab	154,97 ± 9,90 B	23,31 ± 1,18
	150	19,81 ± 0,64 B	4,07 ± 0,16 B	257500,00 ± 19181,15 a	726,93 ± 63,87 b	151,61 ± 9,60 B	21,71 ± 0,79
	200	18,18 ± 0,98 B	4,22 ± 0,17 B	326666,67 ± 19479,33 b	536,15 ± 35,77 ac	120,18 ± 13,75 B	23,61 ± 1,03
T	F	14,18	4,46	3,04	2,86	13,47	1,92
	P	0,00	0,04	0,08	0,09	0,00	0,17
Densidade	F	0,79	0,39	3,40	6,05	2,68	1,55
	P	0,50	0,75	0,02	0,00	0,05	0,21
T x Densidade	F	0,44	1,54	0,23	1,92	2,73	1,01
	P	0,72	0,21	0,87	0,14	0,05	0,39

Ht - hematócrito (%); Hb - taxa de hemoglobina (g.100 mL<sup>-1</sup>); RBC - número de eritrócitos (10<sup>4</sup>.mm<sup>-3</sup>); VCM - Volume Corpuscular Médio (fL); HCM - Hemoglobina Corpuscular Média (pg.cel<sup>-1</sup>); CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%).

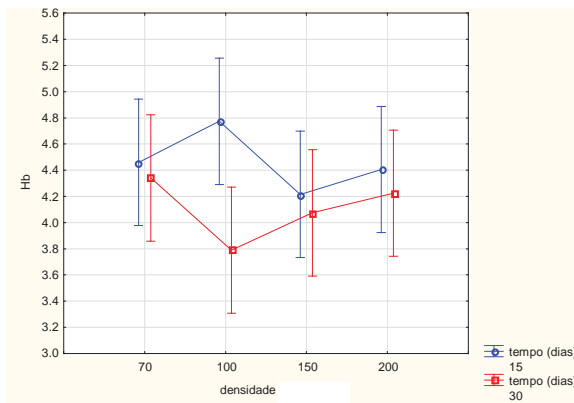
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra minúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de ( ) refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



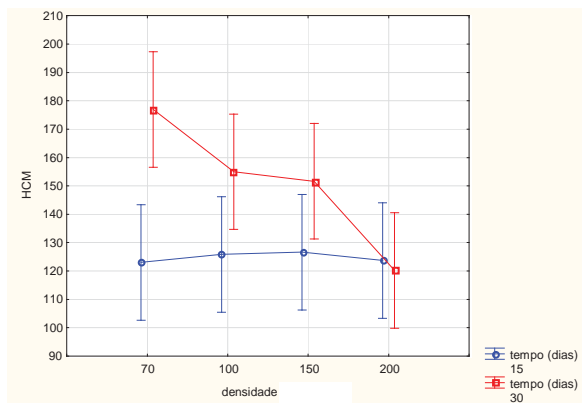
(a)



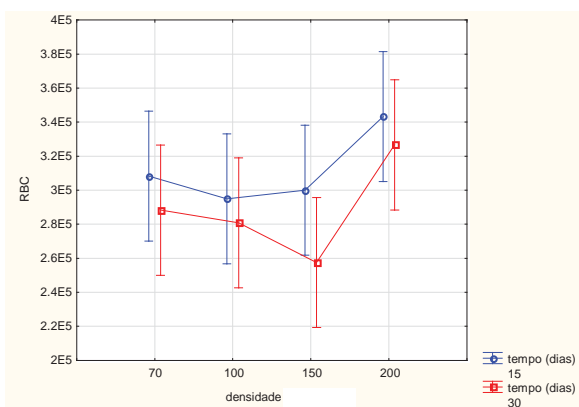
(d)



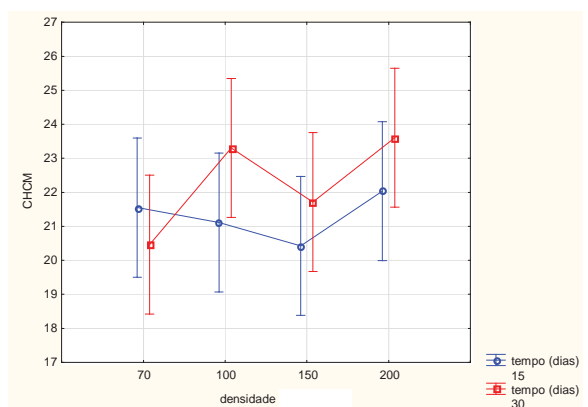
(b)



(e)



(c)



(f)

**FIGURA 11** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa da Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM respectivamente



Observa-se através da ANOVA do eritrograma do experimento de *Densidade campo* que ocorreram diferenças altamente significativas nos valores de hematócrito (Ht) para os tempos ( $p < 0,0001$ ), onde os animais aos 30 dias mostraram diminuição do Ht. Os valores da taxa de hemoglobina (Hb) dos animais foram significativamente diferentes para os tempos ( $p < 0,05$ ), apresentando o mesmo comportamento do hematócrito. Para os valores do número de eritrócitos (Er) ocorreram diferenças significativas para os tratamentos ( $p < 0,05$ ), onde os animais submetidos ao tratamento D200 mostraram aumento acentuado do Er aos 15 e 30 dias.

Os valores de VCM apresentaram diferenças significativas para os tratamentos ( $p < 0,05$ ), onde os animais submetidos ao tratamento D150 mostraram aumento do VCM aos 15 e 30 dias. Os valores de HCM apresentaram diferenças altamente significativas para os tempos ( $p < 0,0001$ ), onde os animais aos 30 dias mostraram aumento do HCM. Quanto aos valores do CHCM não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), que, apesar da não significância foi observado uma tendência de aumento deste índice para D200 ao final do experimento.

### ***5.3.1.2 Experimento de Triagem laboratório e campo***

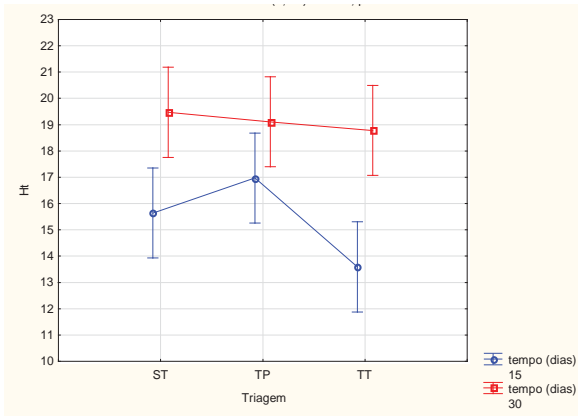
Os dados do eritrograma encontrados nos animais do experimento de Triagem laboratório são apresentados na Tabela 7 e na Figura 12 (a-f). Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de hematócrito:  $18,41 \pm 1,12$  %; taxa de hemoglobina:  $4,16 \pm 0,18$  g  $100 \text{ mL}^{-1}$ ; número de eritrócitos:  $362777,78 \pm 15945,02 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$ ; VCM:  $412,88 \pm 28,58$  fL; HCM:  $115,06 \pm 7,66$  pg  $\text{cel}^{-1}$  e CHCM:  $22,72 \pm 0,82$  %.

**TABELA 7** - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=72)

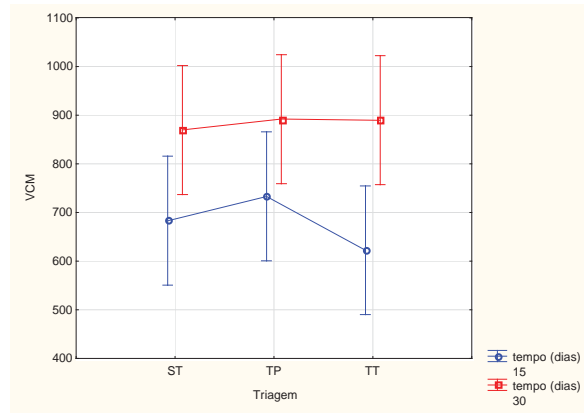
Tempo (dia)	triagem	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
15	ST	15,64 ± 0,72 A	4,05 ± 0,20 A	202222,22 ± 13922,18	683,08 ± 57,53 A	176,06 ± 13,37 A	25,30 ± 1,10 A
	TP	16,97 ± 0,82 A	3,88 ± 0,10 A	211111,11 ± 8966,67	732,88 ± 31,48 A	178,40 ± 9,44 A	23,30 ± 0,75 A
	TT	13,59 ± 0,81 A	3,68 ± 0,15 A	233333,33 ± 14953,63	622,12 ± 97,58 A	149,70 ± 13,83 A	23,88 ± 1,31 A
30	ST	19,47 ± 0,67 B	4,50 ± 0,23 B	227777,78 ± 8543,64	869,29 ± 57,13 B	208,32 ± 13,10 B	23,61 ± 0,63 B
	TP	19,11 ± 1,00 B	4,76 ± 0,19 B	196666,67 ± 13123,34	891,60 ± 62,56 B	184,27 ± 10,24 B	22,71 ± 0,80 B
	TT	18,78 ± 0,99 B	4,10 ± 0,18 B	200555,56 ± 10974,85	889,37 ± 71 B	195,85 ± 10,65 B	21,40 ± 0,57 B
T	F	28,60	14,87	0,54	14,38	8,36	4,59
Triagem	p	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,03
T x Triagem	F	2,55	3,19	0,68	0,37	1,33	2,25
	p	0,08	0,06	0,50	0,68	0,27	0,11
	F	1,60	0,91	3,09	0,36	1,47	0,55
	p	0,21	0,40	0,06	0,69	0,23	0,57

ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total; Ht - hematócrito (%); Hb – taxa de hemoglobina (g.100 mL<sup>-1</sup>); RBC – número de eritrócitos (10<sup>4</sup>.mm<sup>-3</sup>); VCM – Volume Corpuscular Médio (fL); HCM – Hemoglobina Corpuscular Média (pg.cel<sup>-1</sup>); CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)

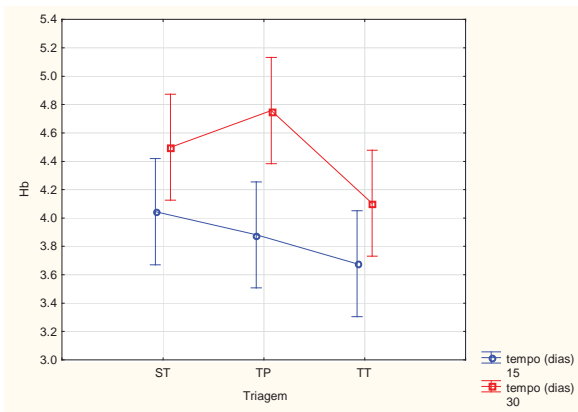
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



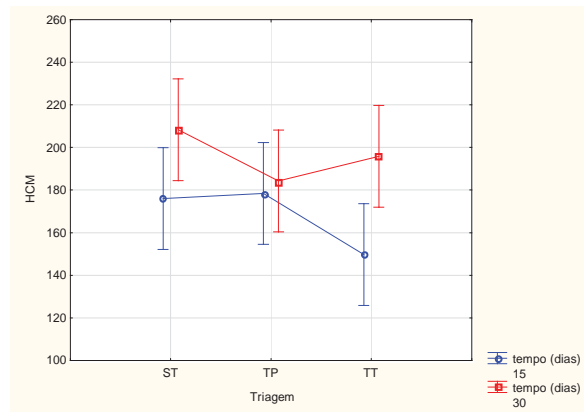
(a)



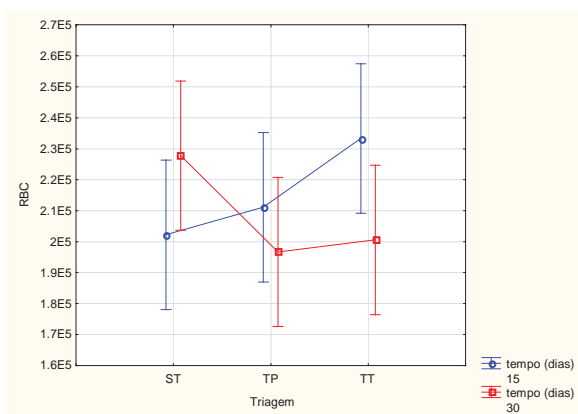
(d)



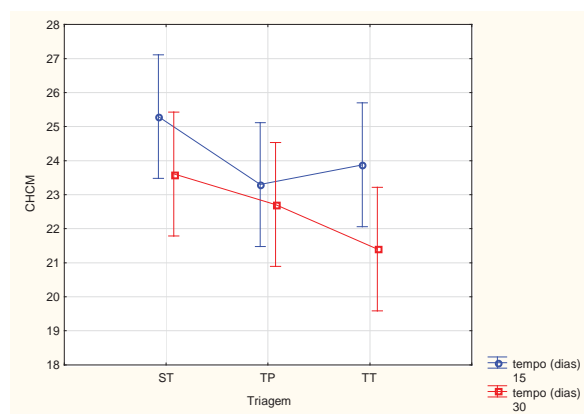
(b)



(e)



(c)



(f)

**FIGURA 12** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias no laboratório; ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM, respectivamente

Observa-se através da ANOVA do eritrograma do experimento de *Triagem laboratório* que ocorreram diferenças nos valores do hematócrito (Ht) sendo altamente significativas para os tempos ( $p < 0,0001$ ), onde os animais aos 30 dias mostraram aumento do Ht independente dos tratamentos. Para os valores da taxa de hemoglobina (Hb) foi observado o mesmo comportamento do hematócrito. Para os valores de Er não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), que apesar da não significância foi observado uma tendência de diminuição entre as triagens TP e TT, ao final do experimento.

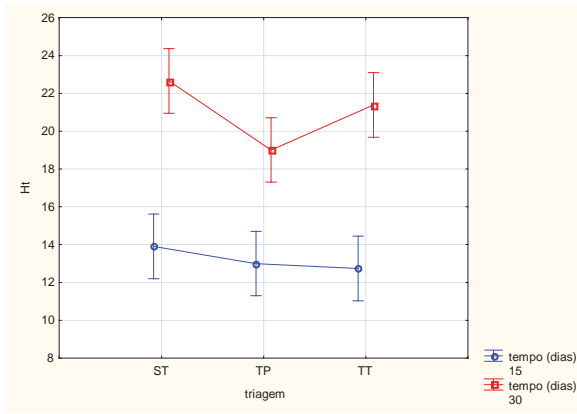
Nos índices hematimétricos, ocorreram diferenças significativas nos valores de VCM para os tempos ( $p < 0,05$ ) onde os animais apresentaram valores superiores de VCM e HCM aos 30 dias e inferiores de CHCM aos 30 dias, independente dos tratamentos.

Os dados do eritrograma encontrados nos animais do experimento de *Triagem campo* são apresentados na Tabela 8 e na Figura 13 (a-f). Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de hematócrito:  $19,93 \pm 0,47$  %; taxa de hemoglobina:  $4,81 \pm 0,15$  g  $100 \text{ mL}^{-1}$ ; número de eritrócitos:  $241666,67 \pm 11086,78 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$ ; VCM:  $777,95 \pm 24,88$  fL; HCM:  $186,37 \pm 8,05$  pg  $\text{cel}^{-1}$  e CHCM:  $23,64 \pm 0,64$  %.

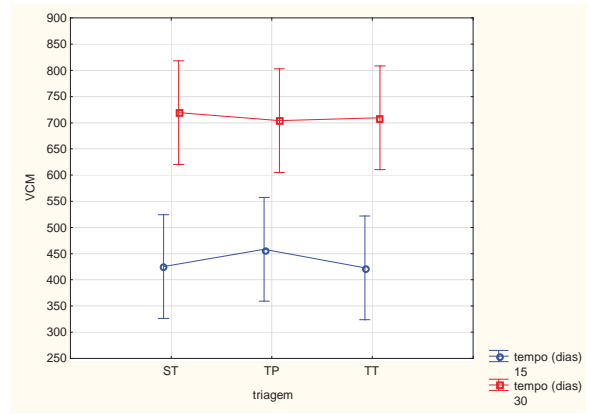
**TABELA 8** - Média e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

Tempo (dia)	triagem		Ht		Hb		Er		VCM		HCM		CHCM					
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p				
15	ST	13,91 ± 1,01	Aa	4,14 ± 0,15	A'	2355555,56 ± 27124,26	A	425,48 ± 57,39	A	159,93 ± 18,19	31,10 ± 2,54	A						
	TP	13,00 ± 0,76	Ab	3,85 ± 0,28	A'	2455555,56 ± 20402,96	A	458,48 ± 48,25	A	154,31 ± 14,99	29,16 ± 1,94	A						
	TT	12,74 ± 0,53	Aab	2,83 ± 0,28	B'	2177777,78 ± 24567,24	A	422,97 ± 21,87	A	146,32 ± 19,05	27,20 ± 1,90	A						
30	ST	22,66 ± 0,51	Ba	4,19 ± 0,15	A'	310000,00 ± 23139,07	B	719,66 ± 68,44	B	128,41 ± 10,59	18,23 ± 0,47	B						
	TP	19,00 ± 1,06	Bb	3,72 ± 0,11	A'B'	2655555,56 ± 10255,23	B	704,07 ± 36,26	B	159,16 ± 8,74	23,09 ± 1,42	B						
	TT	21,39 ± 1,03	Bab	3,83 ± 0,27	A'	278333,33 ± 6972,17	B	709,70 ± 49,47	B	136,41 ± 10,50	18,60 ± 0,79	B						
T							F	p	F	p	F	p	F	p				
Triagem							126,54	0,00	2,84	0,09	9,82	0,00	46,96	0,00	1,09	0,29	45,55	0,00
T X Triagem							3,62	0,03	7,18	0,00	0,78	0,46	0,04	0,95	0,66	0,52	1,87	0,16
							1,67	0,19	3,81	0,02	0,98	0,38	0,14	0,86	0,82	0,44	2,13	0,12

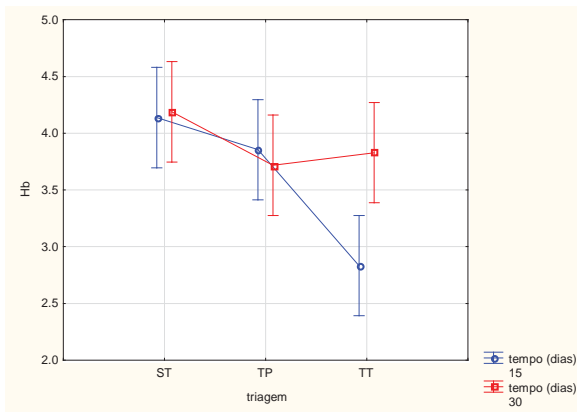
ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total; Ht – triagem total; Ht - hematócrito (%); Hb – taxa de hemoglobina (g.100 mL<sup>-1</sup>); RBC – número de eritrócitos (10<sup>4</sup>.mm<sup>-3</sup>); VCM – Volume Corpuscular Médio (fL); HCM – Hemoglobina Corpuscular Média (pg.cel<sup>-1</sup>); CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)  
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (\*) refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



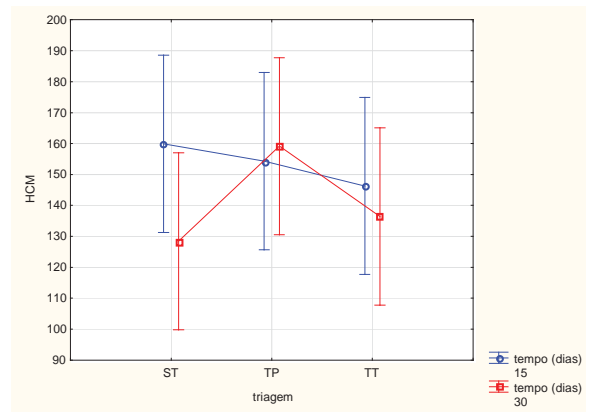
(a)



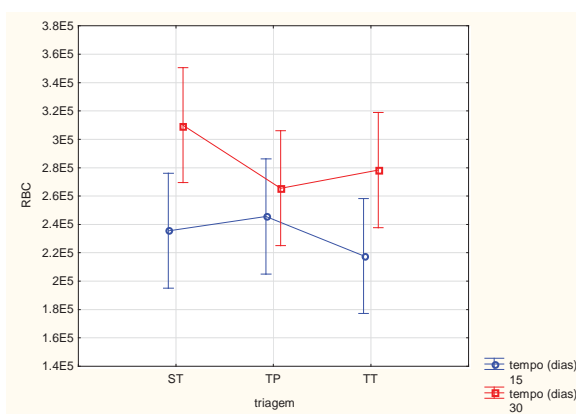
(d)



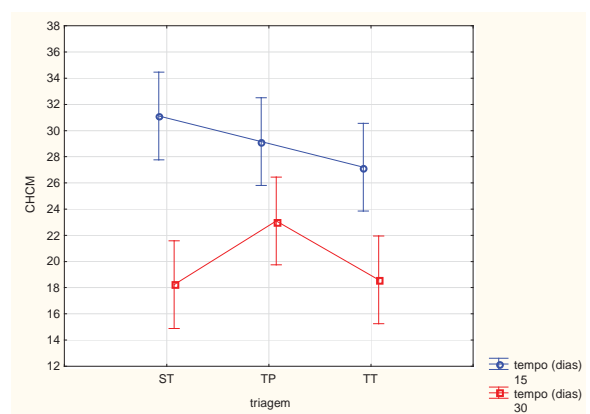
(b)



(e)



(c)



(f)

**FIGURA 13** - Valores médios e erro padrão da série vermelha de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias no campo; ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. Dados em (a) Hematócrito (Ht); (b) Taxa de Hemoglobina (Hb); (c) número de eritrócitos (RBC); (d) VCM; (e) HCM e em (f) CHCM, respectivamente

Observa-se através da ANOVA do eritrograma, do experimento de *Triagem campo* que houve diferenças altamente significativas nos valores de hematócrito (Ht) para os tempos ( $p<0,001$ ), onde os animais mostraram aumento do Ht aos 30 dias, e significativas para os tratamentos ( $p<0,05$ ), onde os animais mostraram diminuição do hematócrito para TP em relação aos demais tratamentos, ao final do experimento. Para os valores da taxa de hemoglobina (Hb) ocorreram diferenças significativas para os tratamentos e para a interação tempo X tratamento ( $p<0,05$ ), com leve diminuição para TT, aos 15 dias. Diferenças significativas foram observadas nos valores de número de eritrócitos (Er) para os tempos ( $p<0,05$ ), onde os animais mostraram aumento, ao final do experimento independente dos tratamentos.

Quanto aos índices hematimétricos, ocorreu diferenças altamente significativas nos valores do VCM para os tempos ( $p<0,001$ ), onde os animais aos 30 dias mostraram um aumento de VCM independente dos tratamentos. Não ocorreram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos valores de HCM que, apesar da não significância foi observado uma tendência de aumento para TP aos 30 dias. Para os valores de CHCM ocorreram diferenças significativas para os tempos ( $p<0,05$ ), onde os animais mostraram diminuição de CHCM ao final do experimento.

### ***5.3.2 Leucograma***

#### ***5.3.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo***

Os dados do leucograma encontrados nos animais do experimento de Densidade laboratório são apresentados na Tabela 9 e na Figura 14 (a-f). Os animais antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $4443,00\pm 151,95$  leucócitos totais  $\text{mm}^{-3}$ ;  $3461,71\pm 104,17$  linfócitos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $120,51\pm 12,51$  neutrófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $759,17\pm 105,72$  basófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $4,24\pm 8,97$  eosinófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $11,65\pm 8,29$  monócitos.  $\text{mm}^{-3}$ .

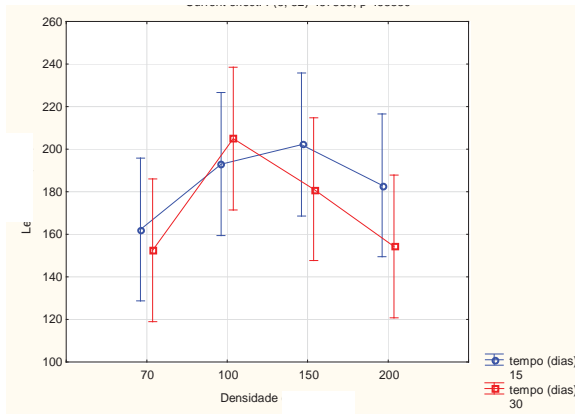
**TABELA 9** - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=48)

Tempo (dia)	Densidade	Lc	Lf	Nt	Bs	Es	Mn				
15	70	26925,09 ± 4024,64	25061,73 ± 4131,87	585,34 ± 318,62	A'B'	861,78 ± 518,91	88,11 ± 40,02	A'	309,84 ± 63,10	A'C'D'E'F'	
	100	39873,60 ± 11167,71	34311,18 ± 8605,19	1036,15 ± 207,71	A'	2198,37 ± 1229,43	676,13 ± 301,44	A'B'	510,34 ± 137,09	A'	
	150	41399,03 ± 4709,47	38839,41 ± 4657,28	443,11 ± 236,7	A'B'	401,16 ± 185,3	168,85 ± 70,27	A'B'	567,58 ± 197,74	A'	
	200	34967,25 ± 7963,5	31405,93 ± 6744,79	930,44 ± 197	A'B'	858,13 ± 197,95	366,77 ± 152,18	A'B'	69,31 ± 69,31	B'C'	
30	70	24355,29 ± 4723,13	23151,43 ± 4535,39	285,79 ± 82,75	A'B'	475,81 ± 75,89	289,35 ± 98,20	A'B'	50,10 ± 32,03	B'D'	
	100	43197,6 ± 6962,84	41042,69 ± 7350,76	460,80 ± 161,43	B'	953,67 ± 389,59	159,51 ± 77,34	A'B'	56,13 ± 56,13	B'E'	
	150	32948,13 ± 1965,5	30047,22 ± 1878,17	1240,51 ± 286,38	A'C'	1068,36 ± 223,62	383,14 ± 108,81	A'B'	208,91 ± 92,75	A'C'D'E'F'	
	200	24920,20 ± 5084,65	22321,66 ± 4437,67	435,03 ± 190,52	A'B'	1307,54 ± 427,41	739,91 ± 228,86	B'	60,51 ± 31,97	B'F'	
T		F	p	F	p	F	p	F	p		
Densidade	1,03	0,31	0,38	2,94	0,09	0,09	0,76	0,85	0,36	18,08	0,00
T x Densidade	2,78	0,06	0,06	1,11	0,35	0,56	0,64	2,66	0,06	4,44	0,01
	0,57	0,63	0,44	6,64	0,01	1,00	0,4	4,01	0,01	3,15	0,03

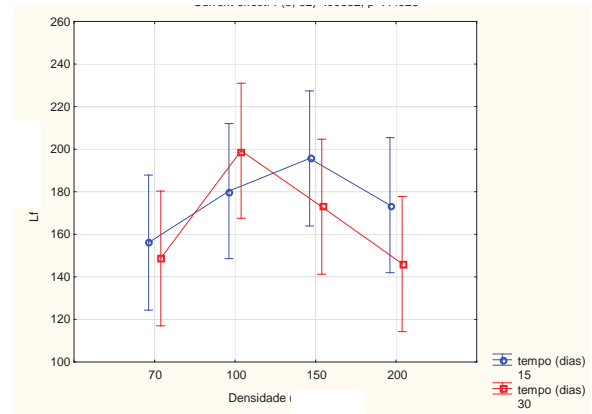
Lc – (leucócitos totais.mm<sup>-3</sup>); Lf – (linfócitos.mm<sup>-3</sup>); Bs – (basófilos.mm<sup>-3</sup>); Nt – (neutrófilos.mm<sup>-3</sup>); Es – (eosinófilos.mm<sup>-3</sup>); Mn – (monócitos.mm<sup>-3</sup>)

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)

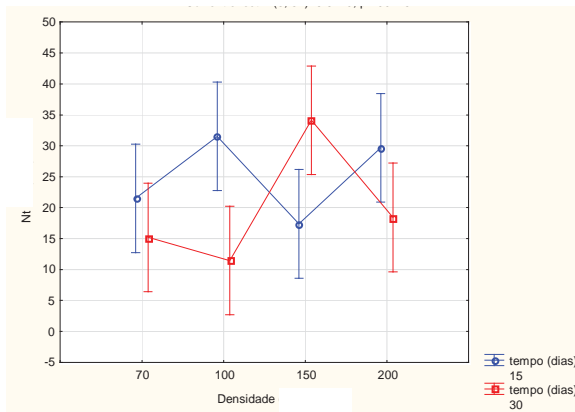




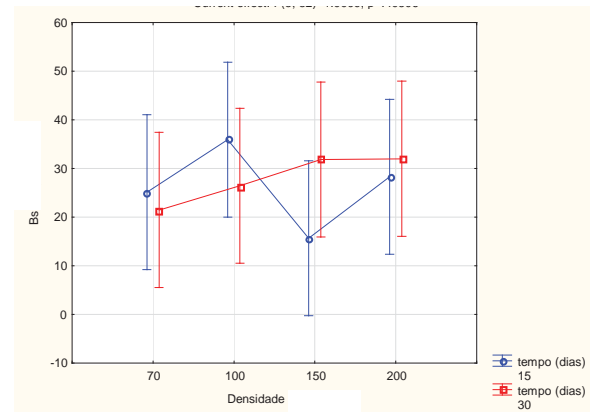
(a)



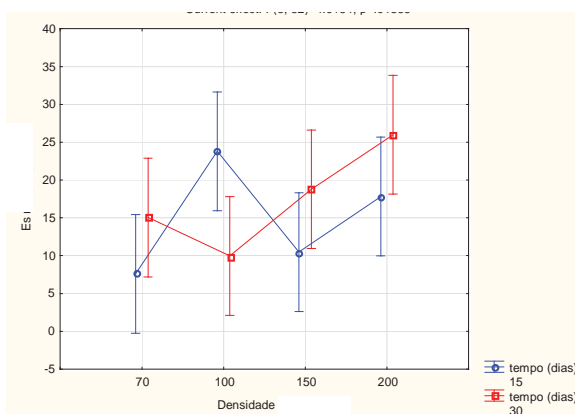
(b)



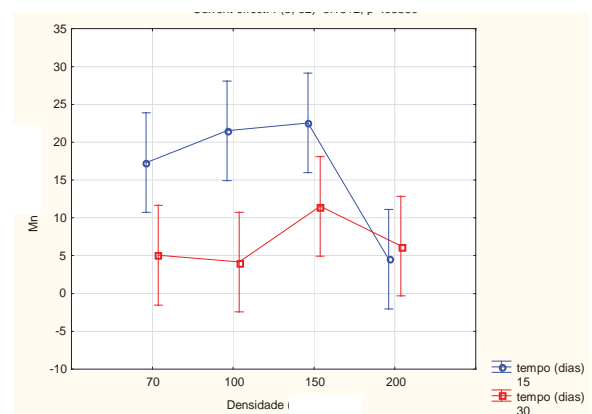
(c)



(d)



(e)



(f)

**FIGURA 14** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório. Dados em (a) Leucócitos (Lc); (b) Linfócitos (Lf); (c) Neutrófilos (Nt); (d) Basófilos (Bs); (e) Eosinófilos (Es) e em (f) Monócitos (Mn), respectivamente

Observa-se através da ANOVA do leucograma do experimento de *Densidade laboratório* que não ocorreram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) no número absoluto de leucócitos totais (Lc) e linfócitos (Lf) mas, apesar da não significância, foi observada uma tendência de diminuição para os animais submetidos ao tratamento D200 ao final do experimento. Ocorreram diferenças significativas no número absoluto de neutrófilos (Nt) para a interação tempo X tratamento ( $p<0,05$ ), com aumento para os animais do tratamento D150, aos 30 dias. Não ocorreram diferenças significativas no número absoluto de basófilos (Bs) ( $p>0,05$ ), que apesar da não significância, todos os tratamentos apresentaram comportamento semelhante ao final do experimento. Ocorreram diferenças no número absoluto de eosinófilos (Es) sendo significativas para interação tempo X tratamento ( $p<0,05$ ), com aumento para os animais submetidos ao tratamento D200, aos 30 dias. Para os valores de monócitos (Mn) ocorreram diferenças significativas para os tempos e os tratamentos ( $p<0,05$ ), e altamente significativas para a interação tempo X tratamento ( $p<0,0001$ ), com aumento para os animais do tratamento D150, ao final do experimento.

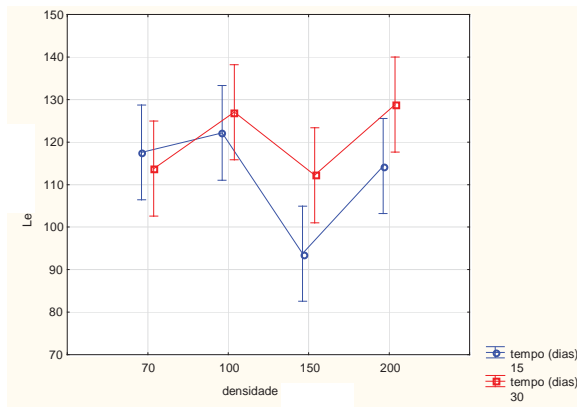
Os dados do leucograma encontrados nos animais do experimento de *Densidade campo* são apresentados na Tabela 10 e na Figura 15 (a-f). Os animais antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $5565,33\pm 440,70$  leucócitos totais. $\text{mm}^{-3}$ ;  $5272,50\pm 420,69$  linfócitos. $\text{mm}^{-3}$ ;  $140,25\pm 37,63$  neutrófilos. $\text{mm}^{-3}$ ;  $34,64\pm 11,65$  basófilos. $\text{mm}^{-3}$ ;  $17,81\pm 8,41$  eosinófilos. $\text{mm}^{-3}$ ;  $55,34\pm 19,39$  monócitos. $\text{mm}^{-3}$ .

**TABELA 10** - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catenbeianus*, sob diferentes densidades nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

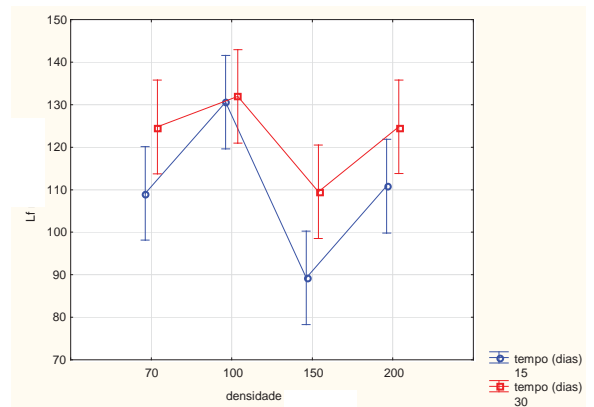
Tempo (dia)	densidade	Lc	Lf	Nt	Bs	Es	Mn				
15	70	13909,89 ± 993,31	Aa	12007,12 ± 954,29	Aa	302,66 ± 58,82	Aa	74,85 ± 26,77	70,63 ± 16,56	ab	55,26 ± 17,74
	100	15252,50 ± 2067,27	Aa	17449,87 ± 2429,79	Aac	392,98 ± 65,20	Aac	72,85 ± 19,65	34,29 ± 19,04	a	29,88 ± 13,72
	150	8910,31 ± 925,89	Ab	8051,21 ± 716,75	Ab	91,83 ± 41,25	Ab	61,47 ± 29,33	90,15 ± 7,96	ab	59,20 ± 15,11
	200	13140,86 ± 824,88	Aa	12351,58 ± 820,08	Aab	189,68 ± 18,98	Aab	247,77 ± 66,42	200,25 ± 20,65	b	111,22 ± 43,19
30	70	13141,47 ± 1375,20	Ba	15737,60 ± 1471,99	Ba	580,55 ± 40,13	Ba	236,24 ± 34,49	161,83 ± 52,26	ab	76,76 ± 35,19
	100	16342,89 ± 1585,92	Ba	17581,72 ± 1558,55	Bac	478,12 ± 109,35	Bac	102,04 ± 65,71	31,33 ± 19,87	a	78,03 ± 34,99
	150	12646,10 ± 773,36	Bb	12049,72 ± 729,32	Bb	167,71 ± 38,14	Bb	182,02 ± 53,63	50,00 ± 18,40	ab	25,51 ± 11,70
	200	16766,75 ± 1475,03	Ba	15740,90 ± 1415,50	Bab	652,01 ± 63,67	Bab	68,87 ± 35,10	84,84 ± 58,27	b	24,72 ± 15,91
T	F	4,72	11,05	15,16	1,09	2,74	0,10	1,25	0,26		
Densidade	p	0,03	0,00	0,00	0,30	0,06	0,10	0,02	0,93		
T x Densidade	F	6,01	11,54	11,13	1,11	3,31	0,02	0,14	0,93		
	p	0,01	0,00	0,00	0,35	0,06	0,02	0,14	0,93		
	F	1,63	1,10	2,44	5,75	2,74	0,06	1,70	0,18		
	p	0,19	0,36	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,18		

Lc – (leucócitos totais.mm<sup>-3</sup>); Lf – (linfócitos.mm<sup>-3</sup>); Bs – (basófilos.mm<sup>-3</sup>); Nt – (neutrófilos.mm<sup>-3</sup>); Es – (eosinófilos.mm<sup>-3</sup>); Mn – (monócitos.mm<sup>-3</sup>)

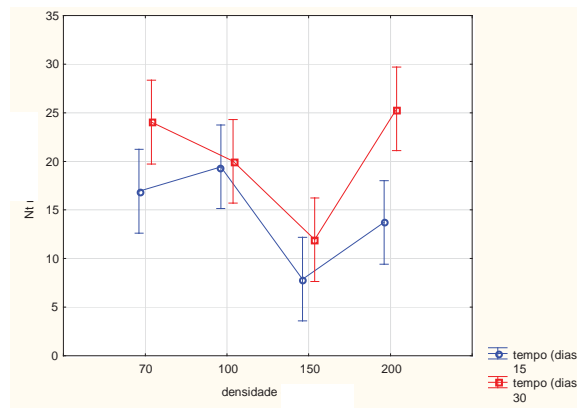
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



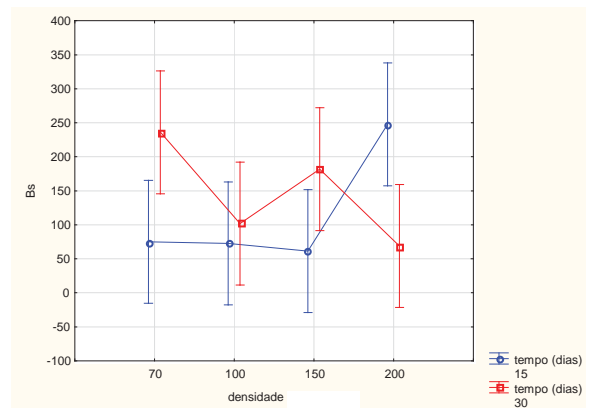
(a)



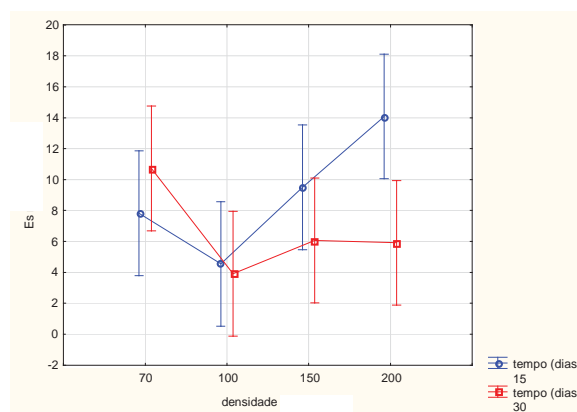
(b)



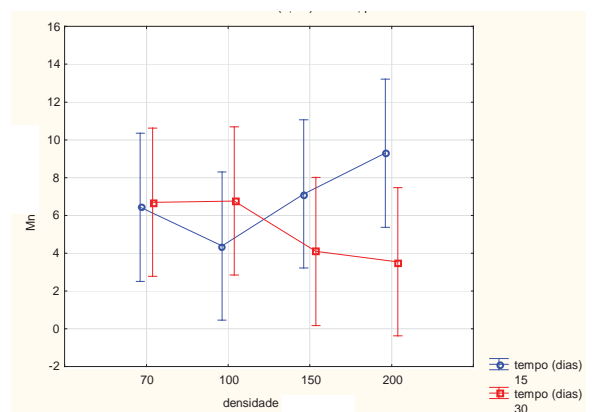
(c)



(d)



(e)



(f)

**FIGURA 15** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas densidades ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo. (a) Leucócitos (Lc); (b) Linfócitos (Lf); (c) Neutrófilos (Nt); (d) Basófilos (Bs); (e) Eosinófilos (Es) e em (f) Monócitos (Mn), respectivamente

Observa-se através da ANOVA do leucograma do experimento de *Densidade campo* que ocorreram diferenças no número absoluto de leucócitos totais (Lc) sendo significativas para os tempos e os tratamentos ( $p < 0,05$ ), onde os animais mostraram um aumento nos valores aos 30 dias e aqueles submetidos ao tratamento D150 mostraram diminuição. Ocorreram diferenças significativas no número absoluto de linfócitos (Lf) para os tempos ( $p < 0,05$ ) e altamente significativas para os tratamentos ( $p < 0,001$ ), sendo observado o mesmo comportamento dos leucócitos. Ocorreram diferenças significativas para o número absoluto de neutrófilos (Nt) para os tempos e os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo observado o mesmo comportamento dos leucócitos e linfócitos. Não ocorreram diferenças significativas para o número absoluto de basófilos (Bs) ( $p > 0,05$ ) que, apesar da não significância foi observado um a tendência de diminuição para os animais submetidos ao tratamento D200, aos 30 dias. Para o número absoluto de eosinófilos (Es) ocorreram diferenças significativas para os tratamentos ( $p < 0,05$ ), com aumento para os animais submetidos ao tratamento D200 aos 15 dias, porém diminuição daqueles submetidos ao D200 aos 30 dias. Não ocorreram diferenças significativas para o número absoluto de monócitos, que apesar da não significância uma tendência de diminuição foi observado aos animais submetidos ao tratamento D200 ao final do experimento.

### ***5.3.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo***

Os dados do leucograma encontrados nos animais do experimento de Triagem laboratório são apresentados na Tabela 11 e na Figura 16 (a-f). Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $14417,41 \pm 849,64$  leucócitos totais  $\text{mm}^{-3}$ ;  $12459,42 \pm 714,53$  linfócitos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $549,78 \pm 46,46$  neutrófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $237,99 \pm 66,66$  basófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $120,44 \pm 34,76$  eosinófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $139,69 \pm 42,26$  monócitos  $\text{mm}^{-3}$ .

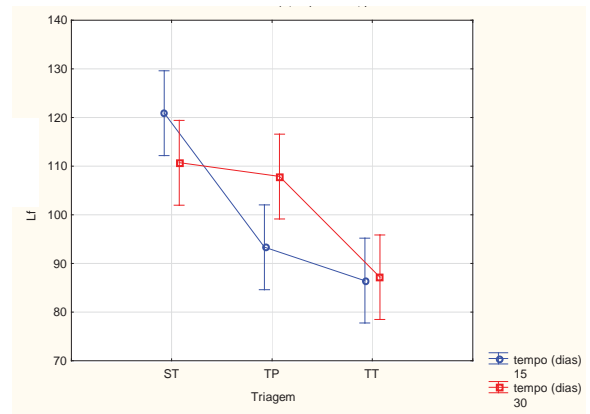
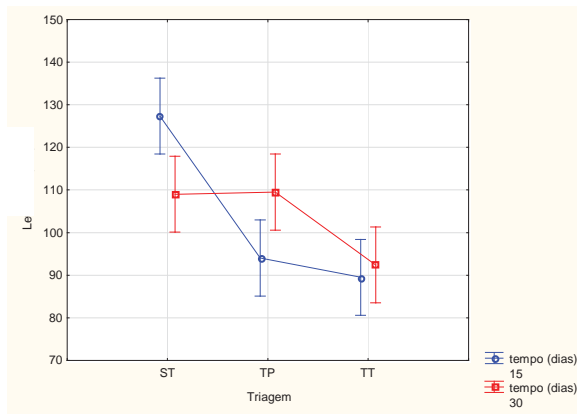
**TABELA 11** - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catsebeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no laboratório (n=72)

Tempo (dia)	triagem	Lc	Lf	Nt	Bs	Es	Mn
15	ST	16413,89 ± 1227,61 B'	14844,28 ± 1242,85 A'	755,66 ± 69,17 A'	182,42 ± 56,81 a	89,26 ± 29,89 A	134,36 ± 41,33 A
	TP	8931,09 ± 614,85 A'D'	8808,12 ± 673,49 B'D'E'F'	379,38 ± 75,09 B'C'	178,63 ± 51,92 ab	130,17 ± 28,85 A	70,42 ± 17,55 A
	TT	8256,91 ± 935,79 A'C'E'	7619,96 ± 733,91 C'D'	623,58 ± 60,78 A'C'	117,39 ± 25,42 b	41,03 ± 14,08 A	34,93 ± 12,01 A
30	ST	12074,17 ± 1012,72 B'D'F'	12538,34 ± 1465,42 A'E'	865,63 ± 105,48 D'	356,54 ± 52,44 a	215,37 ± 52,22 B	291,81 ± 66,89 B
	TP	12190,51 ± 1086,32 B'D'G'	11767,85 ± 863,84 A'E'	707,48 ± 99,64 A'D'	194,53 ± 77,08 ab	196,78 ± 38,14 B	355,64 ± 56,29 B
	TT	8569,17 ± 355,40 A'C'F'G'	7629,89 ± 349,30 D'F'	464,32 ± 65,37 A'C'	78,81 ± 21,07 b	181,59 ± 46,78 B	283,94 ± 45,07 B
T	F	0,00	0,22	1,72	0,47	8,98	43,04
Triagem	p	0,99	0,63	0,19	0,49	0,00	0,00
T x Triagem	F	19,09	22,38	7,47	4,10	1,47	0,98
	p	0,00	0,00	0,00	0,02	0,23	0,37
	F	7,42	4,09	5,48	2,80	0,57	1,39
	p	0,00	0,02	0,00	0,07	0,56	0,25

ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total

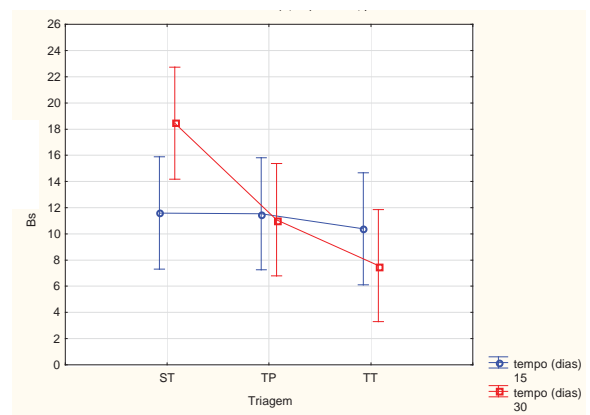
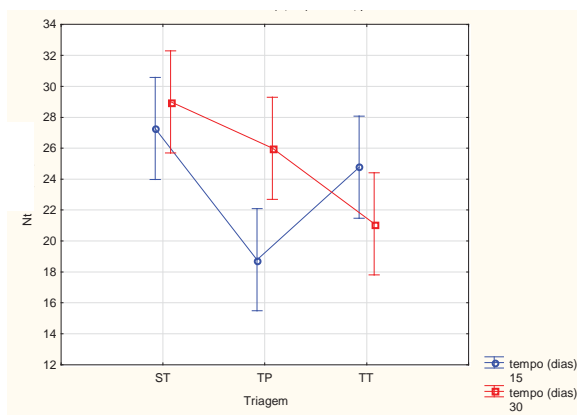
Lc – (leucócitos totais.mm<sup>-3</sup>); Lf – (linfócitos.mm<sup>-3</sup>); Bs – (basófilos.mm<sup>-3</sup>); Nt – (neutrófilos.mm<sup>-3</sup>); Es – (eosinófilos.mm<sup>-3</sup>); Mn – (monócitos.mm<sup>-3</sup>);

As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



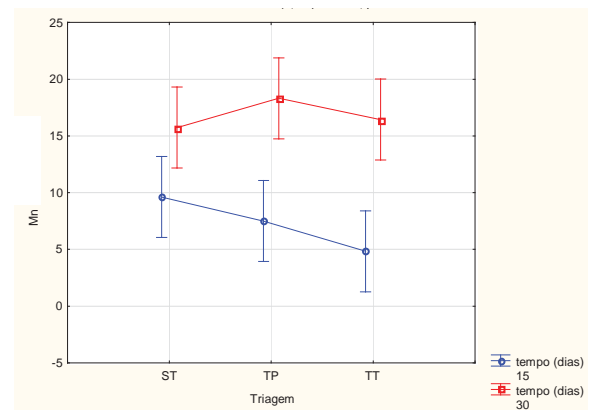
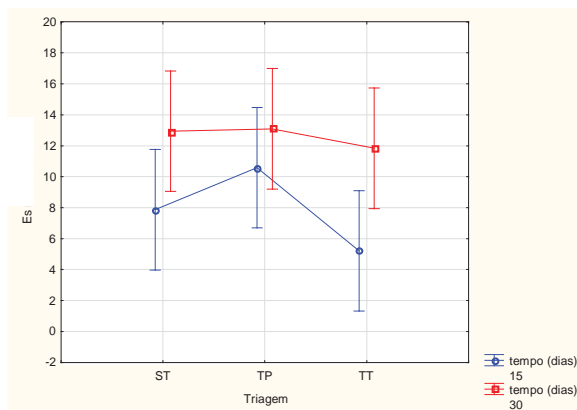
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

**FIGURA 16** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no laboratório; ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. (a) Leucócitos (Lc); (b) Linfócitos (Lf); (c) Neutrófilos (Nt); (d) Basófilos (Bs); (e) Eosinófilos (Es) e em (f) Monócitos (Mn), respectivamente

Observa-se através da ANOVA do leucograma do experimento de *Triagem laboratório* que ocorreram diferenças no número absoluto de leucócitos totais (Lc) e de linfócitos (Lf) sendo altamente significativas para os tratamentos ( $p < 0,0001$ ) e significativas para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,005$ ), com diminuição acentuada no número destas células nos animais submetidos ao tratamento TT, ao final do experimento. Ocorreram diferenças significativas no número absoluto de neutrófilos (Nt) para os tratamentos e para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,005$ ), sendo observado o mesmo comportamento dos leucócitos e linfócitos aos 30 dias. Para o número absoluto de basófilos (Bs) ocorreram diferenças significativas para os tratamentos ( $p < 0,05$ ), com diminuição para os animais submetidos ao tratamento TT, aos 15 e 30 dias. Ocorreram diferenças significativas no número absoluto de eosinófilos (Es) e de monócitos (Mn) para os tempos ( $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) sendo observado aumento destas células aos 30 dias independente dos tratamentos.

Os dados do leucograma encontrados nos animais do experimento de *Triagem campo* são apresentados na Tabela 12 e na Figura 17 (a-f). Os animais amostrados antes da experimentação (MZ) apresentaram média de  $9635,05 \pm 838,47$  leucócitos totais  $\text{mm}^{-3}$ ;  $10061,56 \pm 810,20$  linfócitos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $40,01 \pm 11,70$  neutrófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $83,48 \pm 28,50$  basófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $9,90 \pm 6,90$  eosinófilos  $\text{mm}^{-3}$ ;  $28,17 \pm 12,06$  monócitos  $\text{mm}^{-3}$ .



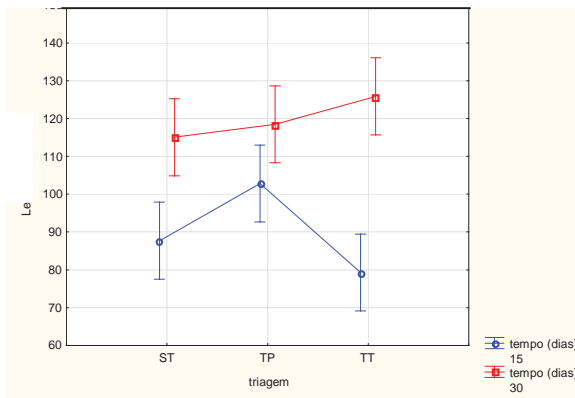
**TABELA 12** - Média e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus*, sob diferentes triagens nos tempos de coleta obtidos no campo (n=72)

Tempo (dia) triagem	Lc	Lf	Nt	Bs	Es	Mn							
15	ST	8031,19 ± 1116,43 A'C'	7639,95 ± 1030,75 A'C'	15,97 ± 8,19 A'	73,10 ± 17,79 A'BC'	46,26 ± 14,68	10,38 ± 7,11						
	TP	10828,64 ± 1180,15 A'D'	10539,08 ± 1158,99 A'B'	14,74 ± 8,75 A'	17,90 ± 7,54 A'	50,41 ± 18,07	6,23 ± 4,16						
	TT	6486,72 ± 788,73 C'	6201,23 ± 736,27 C'	26,75 ± 10,96 A'	66,33 ± 24,58 A'BC'	24,18 ± 7,29	11,14 ± 5,67						
30	ST	13407,91 ± 1035,29 B'D'	13122,01 ± 1008,09 B'D'	26,40 ± 12,96 A'	18,29 ± 10,75 A'B'	66,02 ± 13,80	21,24 ± 11,34						
	TP	14133,06 ± 806,43 B'D'	13827,25 ± 821,27 B'D'	24,87 ± 13,68 A'	118,31 ± 40,57 C'	47,84 ± 20,60	21,64 ± 14,54						
	TT	15989,57 ± 1070,11 B'	15586,54 ± 1093,83 D'	109,00 ± 14,46 B'	51,02 ± 25,63 A'BC'	50,36 ± 21,05	38,47 ± 12,63						
T	F	p	F	p	F	p	F	p					
Triagem	52,19	0,00	55,60	0,00	8,58	0,00	0,26	0,60	0,26	0,60	0,60	3,00	0,08
T x Triagem	1,98	0,14	2,20	0,12	9,04	0,00	0,44	0,64	0,80	0,45	0,92	0,40	
	4,75	0,01	4,90	0,01	4,18	0,02	5,74	0,00	0,38	0,68	0,31	0,72	

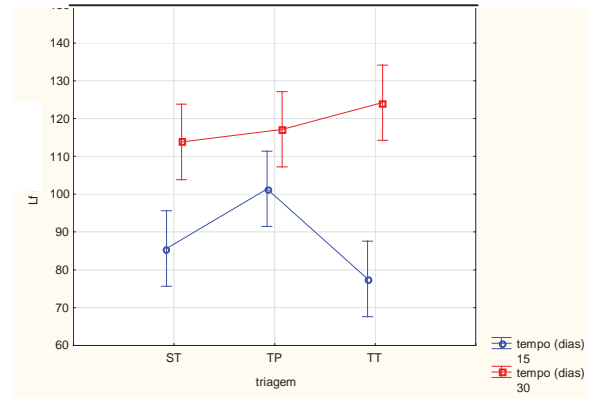
ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total

Lc – (leucócitos totais.mm<sup>-3</sup>); Lf – (linfócitos.mm<sup>-3</sup>); Bs – (basófilos.mm<sup>-3</sup>); Nt – (neutrófilos.mm<sup>-3</sup>); Es – (eosinófilos.mm<sup>-3</sup>); Mn – (monócitos.mm<sup>-3</sup>);

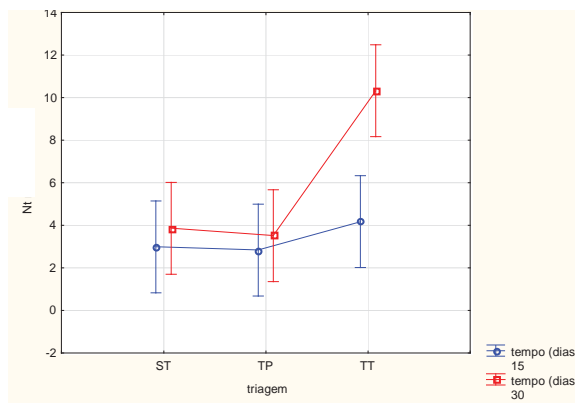
As médias foram somente comparadas nas colunas onde a letra maiúscula refere-se a Tempo, a letra minúscula refere-se a Tratamento e a letra maiúscula seguida de (') refere-se a interação Tempo X Tratamento; a ausência de letras mostra que a diferença não foi significativa (p>0,05)



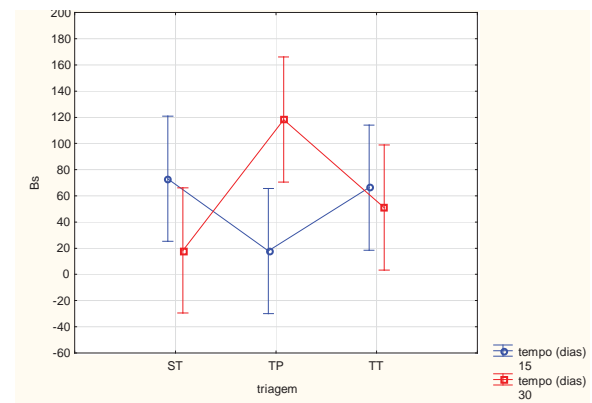
(a)



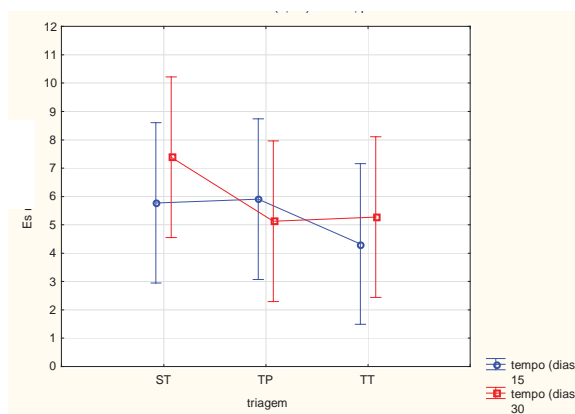
(b)



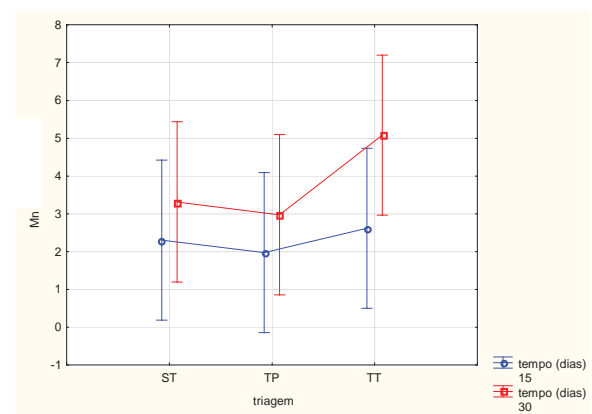
(c)



(d)



(e)



(f)

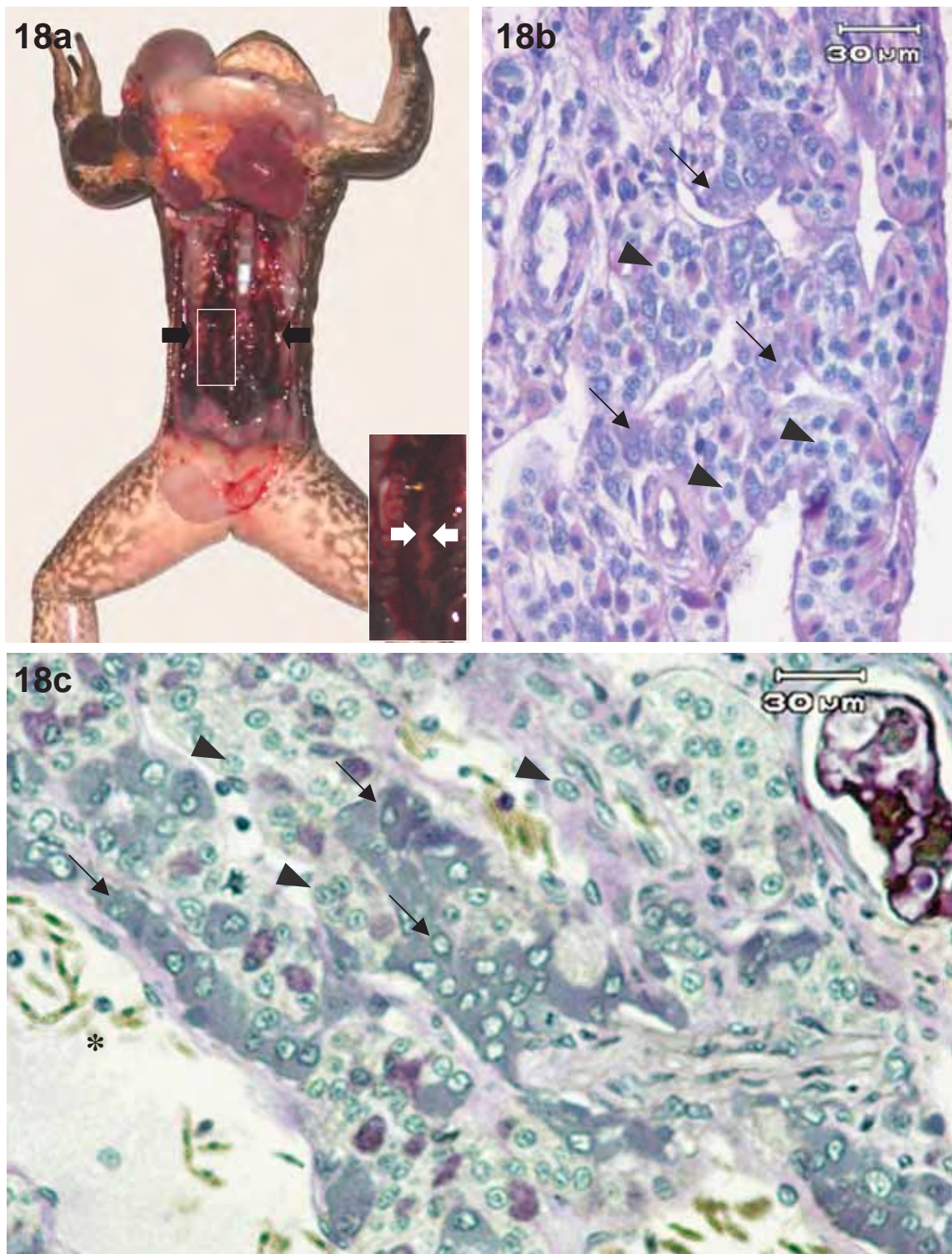
**FIGURA 17** - Valores médios e erro padrão da série branca de rã-touro, *L. catesbeianus* nas distintas triagens ao longo dos 15 e 30 dias obtidos no campo; ST – sem triagem, TP – triagem parcial e TT – triagem total. (a) Leucócitos (Lc); (b) Linfócitos (Lf); (c) Neutrófilos (Nt); (d) Basófilos (Bs); (e) Eosinófilos (Es) e em (f) Monócitos (Mn), respectivamente

Observa-se através da ANOVA do leucograma do experimento de *Triagem campo* que ocorreram diferenças no número absoluto de leucócitos totais (Lc) e de linfócitos (Lf) sendo altamente significativas para os tempos ( $p < 0,001$ ) e significativas para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,05$ ), com diminuição aos 15 dias porém de aumento ao final do experimento para os animais submetidos ao tratamento TT. Ocorreram diferenças significativas para o número absoluto de neutrófilos (Nt) para os tempos e tratamentos ( $p < 0,05$ ) e altamente significativas para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,001$ ), com aumento acentuado nos animais do tratamento TT, aos 30 dias. Ocorreram diferenças significativas no número absoluto de basófilos (Bs) para a interação tempo X tratamento ( $p < 0,05$ ), com aumento nos animais submetidos ao tratamento TP ao final do experimento. Não ocorreram diferenças significativas no número absoluto de eosinófilos (Es) e monócitos ( $p > 0,05$ ) que, apesar da não significância, uma tendência de diminuição do número de eosinófilos foi observado nos animais do tratamento TT aos 15 dias e, de aumento do número de monócitos foi observado aos 30 dias para os animais submetidos ao tratamento TT.

#### **5.4 Parâmetros Morfológicos**

##### **5.4.1 Células Cromafins (glândula interrenal)**

A glândula interrenal apresenta-se como um órgão de cor esbranquiçada, lateral ao plano sagital (Figura 18a). As células cromafins assumem arranjo glandular e são organizadas cordonalmente, na superfície ventral dos rins direito e esquerdo. Os aglomerados de células, sob microscopia de luz, se mostram compactados e intimamente associados a vasos sanguíneos (Figura 18b). Os resultados indicaram que as células cromafins ficaram evidenciadas quanto ao corante utilizado, portanto PAS-positivas, adquirindo a coloração característica. As células esteroideogênicas não se comportaram da mesma forma, portanto PAS-negativas, exibindo citoplasma claro e núcleo evidente quando contra-coradas com hematoxilina (Figuras 18b e 18c).



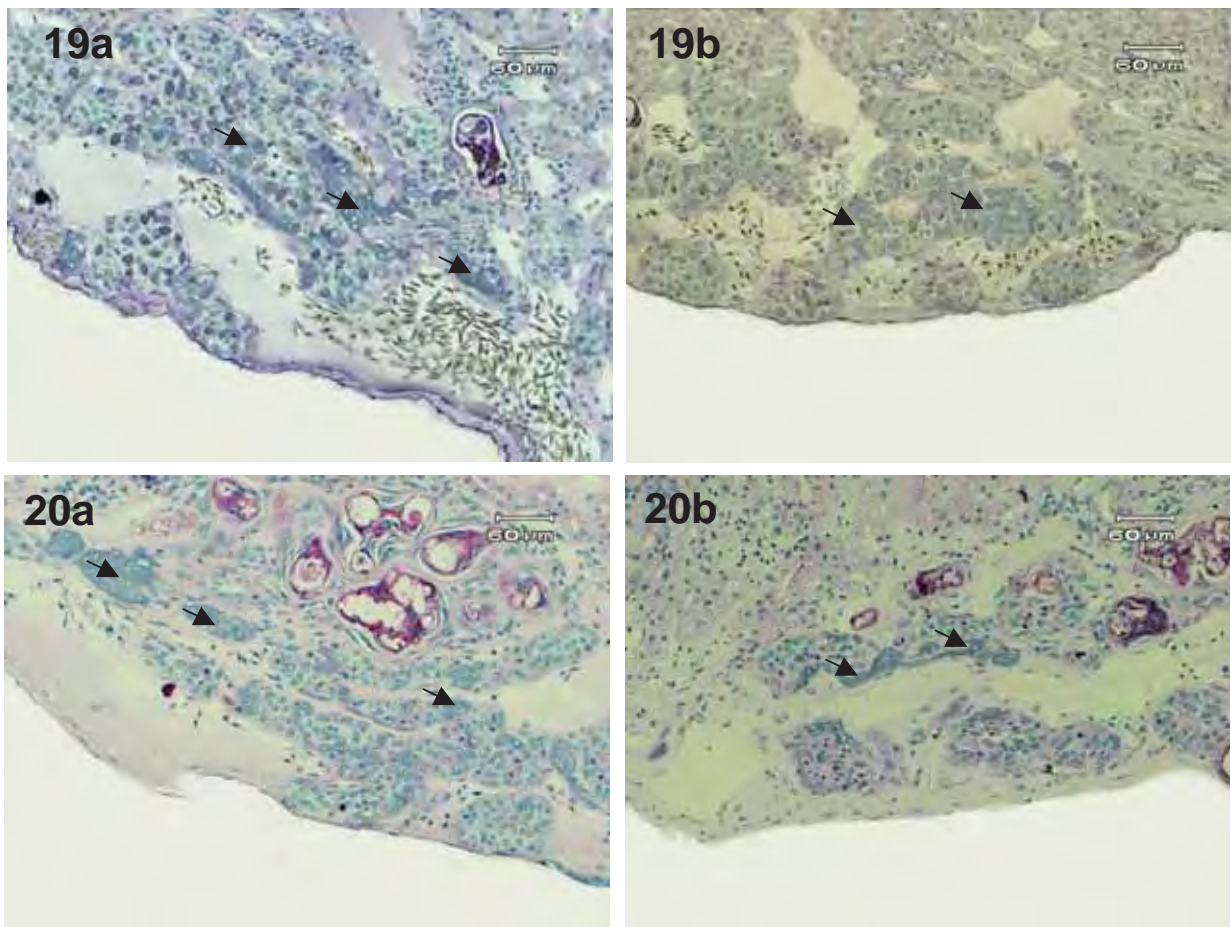
**Figura 18a.** Secção sagital ventral de rã-touro, *L. catesbeianus*, com destaque para os rins (setas), 0,5X; e glândulas interrenais (entre setas brancas), 2,0X. **Figura 18b e c** fotomicrografia da glândula interrenal de rã-touro, *L. catesbeianus* com células cromafins (setas), células esteroidogênicas (cabeças de setas) e vasos sanguíneos (asterisco); coloração H/E, PAS

#### ***5.4.1.1 Experimento de Densidade laboratório e campo***

No experimento *Densidade laboratório* aos 30 dias, observou-se igual comportamento para D200 e D100, ou seja, as células comafins ficaram evidenciadas ao corante utilizado (Figura 18b e c). Já no experimento *Densidade campo* aos 30 dias, além da evidencia quanto à coloração, positiva ao PAS, foi observada, no plano transversal mediano do órgão, uma área média de 20.479,21  $\mu\text{m}^2$  de células cromafins para os animais submetidos ao tratamento D200 (Figura 19a) e 6.482,78  $\mu\text{m}^2$  para os animais do tratamento D100 (Figura 19b).

#### ***5.4.1.2 Experimento de Triagem laboratório e campo***

No experimento *Triagem laboratório* aos 30 dias, observou-se igual comportamento para ST e TT evidenciando a coloração nas células cromafins (Figura 18b e c). Já no experimento de *Triagem campo* aos 30 dias, além da evidencia quanto a coloração, positiva ao PAS, foi observada uma área média de 8.334,06  $\mu\text{m}^2$  de células cromafins para os animais submetidos ao tratamento ST (Figura 20a) e 3.427,10  $\mu\text{m}^2$  para os animais do tratamento TT (Figura 20b).

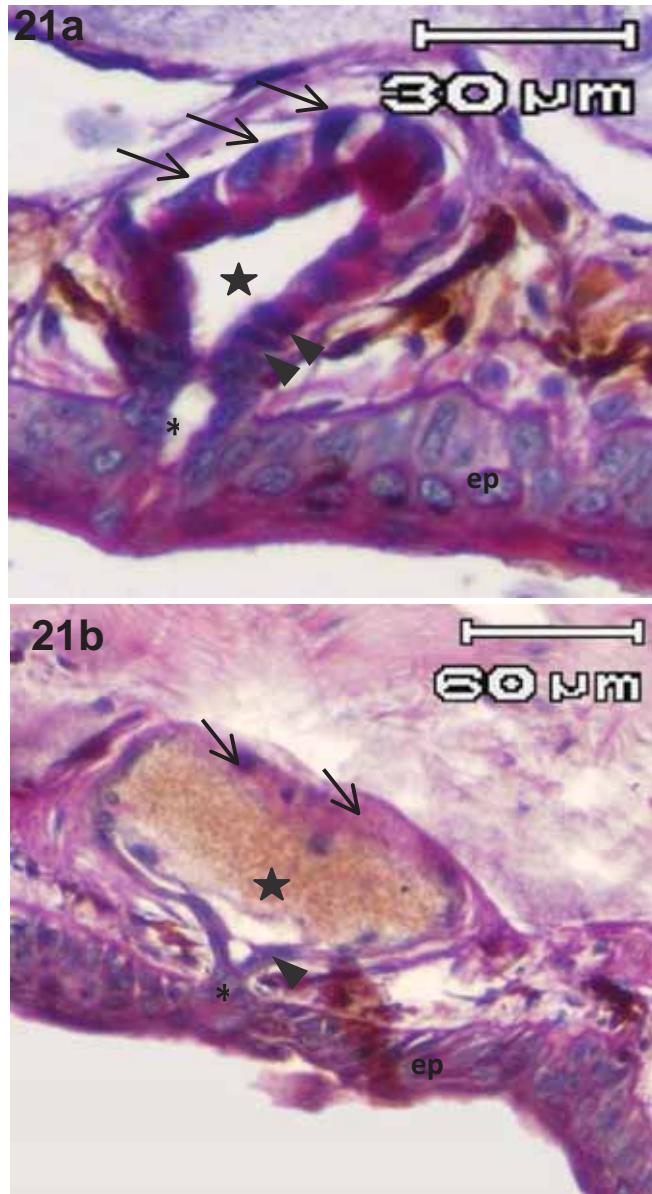


**Figura 19.** Fotomicrografia da glândula interrenal com células cromafins (seta) de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a:** (D200). **b:** (D100). **Figura 20a:** (ST). **b:** (TT); coloração H/E, PAS

#### 5.4.2 *Glândulas mucosas (pele)*

O tegumento de rã-touro, *L. catesbeianus* está constituído da epiderme apoiada pela derme subjacente que abriga as glândulas multicelulares exócrinas. Estas são compostas de três partes: o ducto, formado por queratinócitos modificados; a região intercalar, situada logo abaixo da epiderme, correspondente a transição entre o ducto e o alvéolo, caracterizada por um tipo de célula chamada de “blasto”; e os alvéolos, que contém o epitélio secretor (Figuras 21a e 21b). As glândulas mucosas possuem epitélio colunar ou cuboidal (Figura 21a) na porção secretora; as glândulas granulares apresentam epitélio cúbico que tende a pavimentoso na porção secretora (Figura 21b).

Os resultados indicaram que as glândulas de muco mostram forte evidencia ao PAS, portanto PAS-positivas (Figura 21a), e as granulares não se comportam de forma semelhante, portanto PAS-negativas (Figura 21b).



**Figura 21.** Fotomicrografia das glândulas multicelulares exócrinas da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a:** glândula mucosa com destaque para epitélio secretor com núcleos basais e porções apicais secretoras (setas), luz alveolar (estrela), região intercalar com células blastos (cabeças de setas) ducto (asterisco), epitélio estratificado cúbico não queratinizado (ep). **b:** glândula granular com destaque para epitélio secretor (setas), luz alveolar com secreções (estrela), região intercalar com células blastos (cabeça de seta) ducto (asterisco), epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (ep); coloração H/E, PAS



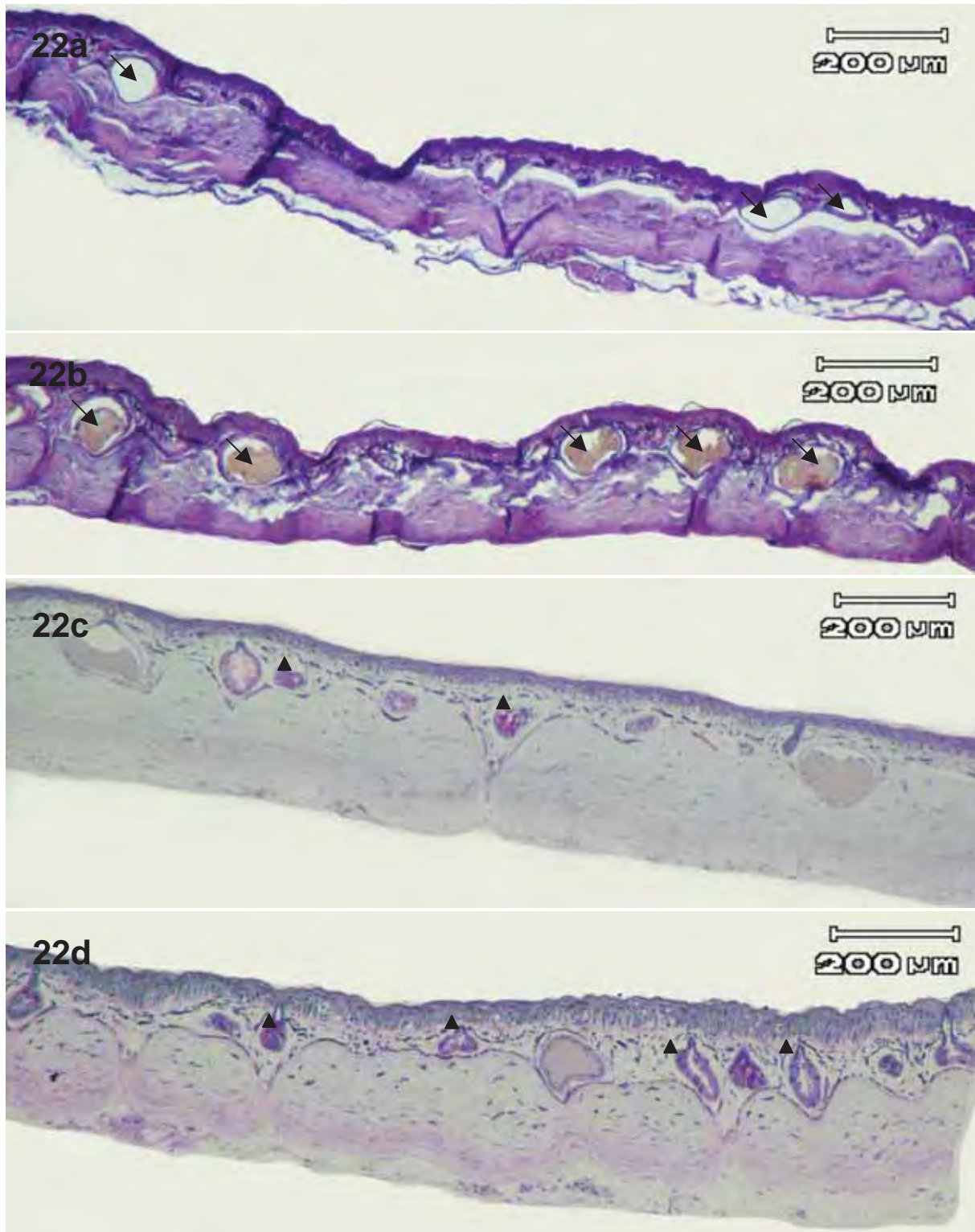
#### ***5.4.2.1 Experimento de Densidade laboratório e campo***

No experimento de *Densidade laboratório* aos 30 dias a relação média de glândulas mucosas para glândulas granulares foi de 40:7 nos animais submetidos ao tratamento D200 e 45:15 nos animais do tratamento D100 sendo observado menos glândulas mucosas nos animais submetidos a maior densidade (D200) (Figura 22a). As mucosas apresentaram acúmulo de mucina para os animais do tratamento D200 (Figura 22a). As glândulas granulares não apresentaram grânulos para os animais submetidos ao tratamento D200 (Figura 22a), em quase toda extensão do corte se comparados à D100 (Figura 22b). Já, no experimento de *Densidade campo* aos 30 dias a relação de glândulas mucosas para granulares foi de 30:7 nos animais submetidos ao tratamento D200 e 30:10 nos animais do tratamento D100 sendo observado igual número de glândulas mucosas em ambos os tratamentos (Figuras 22c e 22d). As glândulas de muco se apresentaram evidentes nos animais do tratamento de maior densidade (Figura 22c) e menos evidentes para os animais submetidos ao tratamento D100 (Figura 22d), da mesma forma que observado no laboratório. As glândulas granulares se apresentaram repletas de grânulos nos distintos tratamentos (Figuras 22c e 22d).

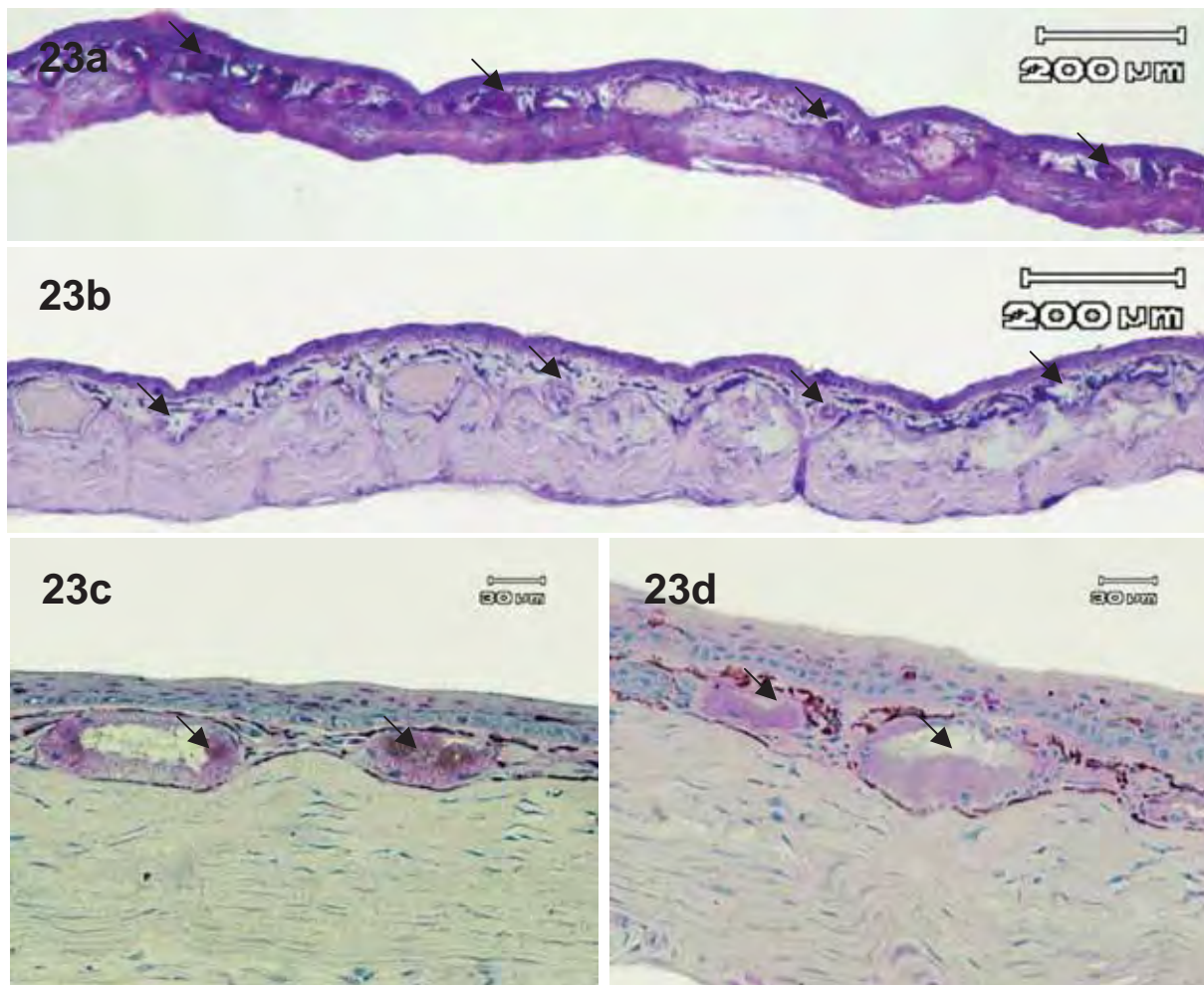
#### ***5.4.2.2 Experimento de Triagem laboratório e campo***

No experimento de *Triagem laboratório* aos 30 dias a relação média de glândulas mucosas para glândulas granulares foi de 50:5 nos animais do tratamento ST e 40:10 para os animais submetidos ao tratamento TT sendo observado menos glândulas mucosas para os animais do tratamento TT (Figura 23a). As glândulas de muco se apresentaram mais evidentes, com acúmulo de mucina nos animais submetidos ao tratamento TT (Figura 23a). As glândulas granulares apresentaram secreção nos distintos tratamentos (Figuras 23a e 23b). Já no experimento de *Triagem campo* aos 30 dias a relação de glândulas

mucosas para glândulas granulares foi de 24:3 para os animais do tratamento ST e 24:8 para os animais do tratamento TT sendo observado igual número de glândulas mucosas em ambos os tratamentos (Figuras 23c e 23d). Como observado em laboratório, as glândulas mucosas se apresentaram evidentes nos animais do tratamento TT (Figura 23c) e menos evidentes para os animais do tratamento ST (Figura 23d). As glândulas granulares apresentaram grânulos de secreção independente dos tratamentos.



**Figura 22.** Fotomicrografia da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a:** (D200) glândulas granulares sem secreção (setas) . **b:** (D100) glândulas granulares com secreção (setas). **c:** (D200) glândulas mucosas mais evidentes (cabeça de seta). **d:** (D100) glândulas mucosas menos evidentes (cabeça de seta); coloração H/E, PAS



**Figura 23.** Fotomicrografia da pele de rã-touro, *L. catesbeianus*. **a, c:** (TT) glândulas mucosas com secreção mais evidente (setas). **b, d:** (ST) (glândulas mucosas com secreção menos evidente (setas); coloração H/E, PAS

## ***6. DISCUSSÃO***

### **6.1 Parâmetro Endócrino - Corticosterona**

Os resultados do teste de *Validação Fisiológica* foram extremamente esclarecedores mostrando como os animais se estressam rapidamente quando manipulados, e o quão rápida é a metabolização da corticosterona plasmática nesta espécie retornando ao basal cerca de uma hora depois do estímulo. O presente estudo corrobora os achados de GLENNEMEIER e DENVER (2002a) que observaram que a injeção de ACTH resulta em aumentos nos níveis de corticosterona, e os de MOORE *et al.* (1991) que mostraram que os níveis deste glicocorticóide retornam ao normal muito rapidamente após um estresse agudo de manejo. Entretanto, os dados de literatura são bastante escassos a este respeito, e as doses utilizadas na Validação Fisiológica deste estudo foram baseadas em relatos de ROSENTHAL e ROSS (1984), que verificaram aumento nos níveis de glicose plasmática, alanina e uréia em rãs-touro frente à administração de ACTH, implicando na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical de forma a regular a gliconeogênese vinda da alanina e provavelmente de outros aminoácidos glicogênicos.

A complexa interpretação dos resultados de experimentos envolvendo estresse em anuros se deve a natureza do agente estressor e a resposta a sua magnitude e duração (MOBERG, 2000; WADA, 2008), bem como ao estágio do ciclo de vida do organismo, pré ou pró-metamorfose (CRESPI e DENVER 2004a, b, 2005). As concentrações de corticóides plasmáticos em larvas de várias espécies de anfíbios são baixas durante a pré-metamorfose, aumentam durante a pró-metamorfose e atingem o pico no clímax da metamorfose, em *R. catesbeiana* (JAFFE, 1981; KRUG *et al.*, 1983; KIKUYAMA *et al.*, 1986); em *X. laevis* (JOLIVET-JAUDET e LELOUP-HATEY, 1984); em *Ambystoma tigrinum* (CARR e NORRIS, 1988) e *R. pipiens* (GLENNEMEIER e DENVER, 2002a). O efeito da corticosterona no desenvolvimento larval de anuros difere entre os estágios

apresentando-se antagonista às modificações induzidas pela tireóide na pré-metamorfose reduzindo o desenvolvimento (HAYES *et al.*, 1993; GLENNEMEIER e DENVER, 2002b, c), mas agindo de maneira sinérgica ao aumento do nível dos hormônios tireoideanos na pré-metamorfose acelerando este processo (KIKUYAMA *et al.*, 1993; WRIGHT *et al.*, 1994; DENVER, 1997; HAYES, 1997; DENVER *et al.*, 2002; KRAIN e DENVER, 2004).

Os resultados de corticosterona do experimento de *Densidade laboratório* indicaram que houve diferença estatística apenas para a interação tempo X tratamento. Entretanto, aos 15 dias foi observado um aumento não significativo no nível de corticosterona na D150. Isto pode ser explicado porque neste primeiro período de início de crescimento em *L. catesbeianus* (primeiros 15 dias após a metamorfose), os animais estão aprendendo a se alimentar e os confrontos nesta fase apresentam-se como confrontos leves, de igual para igual em virtude de sua uniformidade. Por outro lado, o mesmo comportamento de aumento do nível da corticosterona não foi observado nos animais do tratamento D200, provavelmente porque o espaço apresentava-se mais restrito devido a maior densidade, e os animais não tinham espaço para o confronto. Já aos 30 dias foi observado aumento significativo no nível de corticosterona nos animais do tratamento D200. Neste período, o crescimento é exponencial (FONTANELLO *et al.*, 1993) e alguns animais se desenvolvem mais rápido do que outros (*i.e.* desuniformidade) que somado a alta voracidade torna os confrontos mais agressivos e conseqüentemente aumenta os níveis de corticosterona. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado nos animais submetidos ao tratamento D150 uma vez que este apresentava mais espaço livre comparado a D200 o que pode ter funcionado como espaço de fuga para os animais menores.

Analisando este cenário pode-se inferir que a alta densidade causou estresse aos animais corroborando com os autores GLENNEMEIER e DENVER (2002b); CRESPI e DENVER (2005) e HU *et al.* (2008).

Os resultados de corticosterona do experimento de *Densidade campo* indicaram que houve diferença significativa apenas para os tratamentos (D200 foi diferente da D100 e da D150). Entretanto, aos *15 dias* foi observado aumento no nível de corticosterona nos animais do tratamento D150, e aos *30 dias*, diminuição nos animais submetidos ao D200. Isto indicou um comportamento igual à experimentação de laboratório aos 15 dias nos animais da D150, mas diferente aos 30 dias para os animais da D200. A hipótese para responder a esta questão seria a adaptação. Nesta densidade (D200) verificou-se ainda a alta taxa de canibalismo (média de 14%) que somado aos 5% de mortalidade contribuiu para a uniformidade de tamanho dos animais, o que possivelmente diminuiu os confrontos e conseqüentemente o nível de corticosterona. Este processo fisiológico é citado por WENDERLAAR BONGA (1997); MOBERG (2000) e ROMERO (2004) que afirmam que a adaptação ao estresse pode ocorrer como um tipo de resposta crônica.

O aumento da densidade em girinos (WILBUR, 1977; SEMLITSCH e CALDWELL, 1982) e a diminuição da disponibilidade do alimento (WILBUR e COLLINS, 1973; KUPFERBERG *et al.*, 1994) aceleram a metamorfose e, aumentam a produção de corticosteróides (DENVER 2009). HAYES (1997) relatou elevados níveis de corticosterona em *Bufo boreas* criados sob alta densidade e alimentação “*ad libitum*” e, GLENNEMEIER e DENVER (2002b) relataram o mesmo em *R. pipiens* quando sob alta densidade e alimentação limitada, ambos se tratando de girinos.

A densidade de 100 rãs m<sup>-2</sup> para imagos (rãs até 30g) é utilizada historicamente pelos criadores de rãs. Foi testada e proposta por pesquisadores da Universidade de



Uberlândia na década de 80, e considerada como grupo controle nesta experimentação (FERREIRA *et al.*, 2002).

No experimento *Densidade laboratório*, foi observada desuniformidade de tamanho nos animais das maiores densidades ficando evidente uma situação de territorialidade dos animais maiores para com os menores, porém não houve mortalidade ou sinais de canibalismo nos animais dos distintos tratamentos. Os resultados desta experimentação evidenciaram que situações de alta densidade e cativeiro foram estressantes para os animais.

No experimento *Densidade campo* a desuniformidade foi observada para todos os tratamentos de maneira semelhante, independente da densidade dos animais ocorrendo mortalidade e sinais de canibalismo nos animais dos distintos tratamentos. A alta densidade e a situação de cativeiro não foram suficientes para provocar estresse. Nesta linha de raciocínio os produtores poderiam trabalhar na etapa inicial de desenvolvimento (rãs até 30 g) com densidades mais altas (200 rãs m<sup>-2</sup>), o que se traduziria em aumento da produtividade.

Os resultados de corticosterona do experimento de *Triagem laboratório* indicaram que houve diferenças significativas para os tratamentos, a Triagem Parcial (TP) e a Triagem Total (TT) apresentaram-se diferentes do tratamento Sem Triagem (ST). Aos 15 dias os animais se comportaram como aos 30 dias do experimento de Densidade laboratório, ou seja, apresentando alta voracidade e confrontos desiguais em virtude da desuniformidade. No ST a dominância foi estabelecida para com aquele grupo de indivíduos tornando os confrontos mais raros. Em outras palavras, os animais eram os mesmos desde o início da experimentação. Já no tratamento de TP, o manejo da triagem fez com que novos indivíduos fossem inseridos nos espaços previamente estabelecidos, provocando nova situação de dominância/subordinação, colocando-os frente à situação de

confronto. No tratamento TT, os confrontos tornaram-se de maior grandeza, uma vez que todos os animais foram remanejados. Aos 30 dias o mesmo comportamento continuou sendo observado nos distintos tratamentos, porém como os animais apresentaram-se maiores e mais uniformes por conta das triagens, os confrontos tenderam a ser menores.

Analisando este cenário pode-se inferir que a triagem causou estresse aos animais, corroborando com os autores, LANGKILDE e SHINE (2006) que relataram um aumento temporário da corticosterona mediante um estímulo agudo seguido de retorno aos níveis basais em poucas horas. Outros autores relataram observações semelhantes de aumento deste hormônio em estudos de manejo, captura/confinamento de *Rana esculenta* (ZERANI *et al.*, 1991; CODDINGTON e CREE, 1995); captura/confinamento de *Urosaurus ornatus* (MOORE *et al.*, 1994); manipulação/confinamento de *Rana pipiens* (GLENNEMEIER e DENVER, 2002a) e confinamento/manipulação de girinos (BELDEN *et al.*, 2003, 2007; BELDEN e KIESECKER, 2005; BELDEN e WINGFIELD, 2010). Porém, não foram observados sinais de canibalismo e mortalidade nos animais dos distintos tratamentos.

Os resultados de corticosterona do experimento de *Triagem campo* indicaram que houve diferença altamente significativa somente para os tempos. Esta situação não refletiu as observações feitas em laboratório uma vez que os animais submetidos ao TT apresentaram um comportamento de diminuição dos níveis de corticosterona aos 15 e 30 dias sugerindo adaptação frente ao estímulo estressor. Respostas fisiológicas adaptativas desta natureza foram observadas nos estudos de SAPOLSKY *et al.* (2000); CARR (2002) e BERNIER *et al.* (2004) após um estresse agudo de forma a manter a homeostase energética.

A presença de predador e conseqüente risco de predação acelera a metamorfose (WASSERSUG e SPERRY, 1977; ARNOLD e WASSERSUG, 1978; KUPFERBERG *et*

al., 1994) e aumenta a produção de corticosteróides (DENVER, 2009). No experimento de triagem campo, os animais do TT buscaram adaptar-se onde foi observada tendência de diminuição dos níveis de corticosterona ao final do experimento, uma vez que diante da triagem total, o risco de predação e canibalização foi minimizado (em média 32%), mesmo que não diferente da taxa do TP.

Os resultados da experimentação de *Triagem laboratório* evidenciaram, mais uma vez, que a manipulação é altamente estressante para estes animais. Nesta linha de raciocínio os produtores, considerando o alto custo operacional envolvido no manejo de triagem total e os possíveis danos fisiológicos que este procedimento pode acarretar poderiam optar por não fazer triagem ou fazê-la parcialmente para otimizar sua produtividade.

## ***6.2 Parâmetros Hematológicos***

A análise fisiológica do comportamento da corticosterona na avaliação do estresse em *L. catesbeianus* foi complementada por alguns indicadores hematológicos como o hematócrito, taxa de hemoglobina entre outros relacionados às células do sistema imunológico, como leucócitos. Os parâmetros hematológicos representam método alternativo para analisar os efeitos da corticosterona, onde aumentos nos glicocorticóides ocasionam mudanças quantitativas e qualitativas dos componentes leucocitários (DAVIS *et al.*, 2008), porém se trata de uma resposta mais lenta na ordem de horas e de até dias (BENNETT *et al.*, 1972).

ALLENDER e FRY (2008) relataram a escassez dos valores de referência hematológica para anfíbios. Segundo CATHERS *et al.* (1997), COPPO *et al.* (2005), FORBES *et al.* (2006), as diferenças observadas em um hemograma se devem a fatores como estágio de desenvolvimento, idade, disponibilidade de alimento, variáveis

ambientais (temperatura, fotoperíodo), o que dificulta ainda mais a interpretação dos resultados.

### **6.2.1 Eritrograma**

Estudos de eritropoiese/Er da fase larval e adulta apresentam-se mais expressivos em *X. laevis*, *R. catesbeiana* e *R. pipiens*, existindo alguns outros com urodelos (tritões) e poucos com caecilian (ápodas) (WAKAHARA e YAMAGUCHI, 2001). Segundo TAMORI e WAKAHARA (2000), o Er diminui gradualmente durante a metamorfose de anuros, sendo as células envelhecidas seletivamente removidas do sistema circulatório por apoptose celular e eliminadas por fagocitose, no clímax da metamorfose em rã-touro.

Os resultados do eritrograma do experimento de *Densidade laboratório* mostraram, aos *15 dias*, para os animais do tratamento D200, o quadro de Er apresentando leve aumento, e VCM constante, ou seja, leve manifestação diante dos confrontos leves iniciais, de igual para igual. Já, aos *30 dias* com o quadro de Er diminuindo, porém de VCM aumentando sugeriu que ao longo do experimento de *Densidade* células vermelhas “jovens”, de maior volume foram sendo recrutadas ao sistema sanguíneo para dar o aporte necessário diante dos confrontos agressivos. Esses dados corroboram com os de GILMOUR (1997) que observou alterações do volume e do número das células vermelhas relacionadas ao processo de transporte de oxigênio. Já os resultados do eritrograma do experimento de *Densidade campo* mostraram aos *15 e 30 dias*, que os animais submetidos ao tratamento D200 apresentaram o quadro de Er aumentando, porém de VCM diminuindo, o que sugeriu a presença de células vermelhas “maduras” de menor volume frente ao comportamento de adaptação observado. As observações do eritrograma do experimento de *Densidade campo* aos 30 dias não refletiram os resultados do laboratório. Este comportamento pode ser observado frente a

menor expressão dos níveis de corticosterona no campo se comparado à experimentação laboratorial, significando menor estresse ou que os animais se adaptaram a esta condição.

No experimento de *Triagem laboratório*, os resultados do eritrograma mostraram que aos *15 dias* foi observado nos animais do tratamento D200, o quadro de Er aumentando gradativamente e VCM diminuindo. Aos *30 dias* foi observado o quadro de Er diminuindo, porém de VCM mantendo-se constante. Já no experimento de *Triagem campo*, para os animais submetidos ao tratamento D200, os resultados mostraram que aos *15 dias* foi observado o quadro de Er, VCM diminuindo, e aos *30 dias* foi observado o quadro de Er diminuindo, porém de VCM mantendo-se constante. De certa forma, as observações do eritrograma do experimento de *Triagem campo* aos 30 dias foram semelhantes ao laboratório corroborando BENNETT *et al.* (1972) que retratam a forma lenta como a resposta sanguínea é expressa, mesmo tendo sido observado menor expressão dos níveis de corticosterona no campo se comparado ao laboratório.

### **6.2.2 Leucograma**

A série branca é composta de granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos), onde os neutrófilos e monócitos apresentam atividade fagocitária e estão intimamente relacionados com os mecanismos de defesa celular do hospedeiro, particularmente contra bactérias. Os eosinófilos e basófilos estão relacionados aos processos inflamatórios e alérgicos e os linfócitos à atividade citotóxica e humoral (DUELLMAN e TRUEB, 1986; ALLENDER e FRY, 2008).

O leucograma dos experimentos de *Densidade* e *Triagem*, de ambas as etapas *laboratório* e *campo* mostraram que as células leucocitárias mais abundantes em rã-touro foram linfócitos e neutrófilos, enquanto monócitos, eosinófilos e basófilos apresentaram-se mais escassas, corroborando os resultados de outros autores (CATHERS *et al.*, 1997;

FERREIRA *et al.*, 2003; THRALL, 2004; FRANÇA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010).

Durante o estresse da metamorfose, na transição de larva para adulto, a corticosterona apresenta-se envolvida na reorganização do sistema imune (ROLLINS-SMITH *et al.*, 1997). A diminuição na população de leucócitos, indicando susceptibilidade a infecções, foi observada em indivíduos metamorfoseados (KOLIAS, 1984; USSING e ROSENKILDE, 1995), especificamente, linfócitos e neutrófilos diminuíram no clímax da metamorfose (USSING e ROSENKILDE, 1995; BELDEN e KIESECKER, 2005; WOODHAMS *et al.*, 2007). No entanto, DAVIS (2009) relatou que depois do processo de metamorfose os neutrófilos, monócitos e eosinófilos tornaram-se mais pronunciados onde os neutrófilos, atuantes na primeira linha de ataque/defesa, juntamente com os monócitos, mostram-se envolvidos com a fagocitose sendo mais abundantes frente às “lises” dos tecidos. Já os eosinófilos, participam diretamente das “lises” dos tecidos produzindo substâncias (citoquinas, quemoquinas, mediadores lipídicos e neuromoduladores) (ROTHENBERG e HOGAN, 2006) que iniciam e modulam a resposta inflamatória agindo, portanto, como precursor para fagocitose, ou seja, a metamorfose é entendida neste caso, como um processo inflamatório.

Os resultados do leucograma no experimento de *Densidade laboratório* mostraram que aos *15 dias* foi observado para os animais do tratamento D200 leves alterações em quase todas as figuras sanguíneas brancas e diminuição mais expressiva para os monócitos. Já, aos *30 dias*, foi observada diminuição de leucócitos e linfócitos e leves aumentos para neutrófilos, basófilos e monócitos sendo a alteração eosinofílica mais expressiva, porém sem sinais de injúria aos animais neste período. Segundo DAVIS e MAERZ (2009), aumentos na corticosterona apresentaram alterações na população de leucócitos circulantes, especificamente com diminuição de linfócitos e aumento de

neutrófilos em salamandras criadas em altas densidades corroborando com o presente estudo onde foi observado resultado semelhante ao final da experimentação.

Os resultados do leucograma no experimento de *Densidade campo* mostraram que aos *15 dias* foi observado para os animais submetidos ao tratamento D200 diminuição de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos e aumento das demais figuras sanguíneas brancas. Já, aos *30 dias*, foi observado aumento de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos e diminuição das demais figuras sanguíneas brancas, sugerindo possível quadro de enfermidade diante dos sinais da tentativa de canibalismo nos animais menores. As observações nos resultados do leucograma do experimento de *Densidade campo* aos 30 dias não refletiram os de laboratório, entretanto, segundo MARTIN *et al.* (2005) e KIANK *et al.* (2006), estressores crônicos usualmente suprimem o sistema imune mesmo tendo sido observado níveis de corticosterona menos expressivos se comparados à experimentação laboratorial.

Os resultados do leucograma no experimento de *Triagem laboratório* mostraram que aos *15 e 30 dias* foi observado nos animais submetidos à TT diminuição de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos que corrobora BENNETT *et al.* (1972) em que retratam a forma lenta como a resposta sanguínea é expressa, se comparada à resposta hormonal.

Os resultados do leucograma do experimento de *Triagem campo* mostraram que os animais do tratamento TT aos *15 dias* mostraram diminuição de leucócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos e leve aumento de neutrófilos e monócitos. Já aos *30 dias* mostraram aumento de leucócitos totais, linfócitos, basófilos, sendo mais expressivo para neutrófilos e de menor grandeza para monócitos e de leve diminuição de eosinófilos sugerindo também possível quadro de enfermidade diante dos sinais de tentativa de canibalismo, mesmo que reduzidos frente às triagens. As observações nos resultados do

leucograma do experimento de Triagem campo aos 30 dias não refletiram os de laboratório, porém mostraram ser semelhantes a outros estudos onde o estresse agudo causou diminuição do número de linfócitos circulantes (MAULE e VANDERKOOI, 1999), aumento do número de neutrófilos e diminuição do número de eosinófilos em *R. pipiens* expostas ao frio (MANIERO e CAREY, 1997), em salamandras em estudo de captura/“manipulação” (DAVIS e MAERZS, 2010) e em desafio de *R. catesbeiana* com chitridio (DAVIS *et al.*, 2010). Além disso, diminuição do número de eosinófilos em infestações por parasitas trematodos foram descritas por KIESECKER (2002), BELDEN e KIESECKER (2005) e ROHR *et al.*, 2008).

Considerando a resposta do sangue em sua totalidade como resposta lenta e, que segundo FORBES *et al.* (2006) e DAVIS *et al.* (2008), durante o processo de estresse ocorre não somente um aumento ou diminuição da resposta imune, mas redistribuição das células imunes por todo o corpo. É importante notar que as alterações fisiológicas, do eritrograma e do leucograma neste estudo, provavelmente consumiram energia e que no momento no qual o estresse agudo se tornar crônico, poderá gerar os efeitos terciários como diminuição da resistência e surgimento de problemas relacionados ao crescimento e desenvolvimento dos animais com conseqüente perda da produtividade.

### ***6.3 Parâmetros Morfológicos***

#### ***6.3.1 Células cromafins (glândula interrenal)***

Numerosos estudos fazem referência à morfologia das células cromafins da glândula interrenal em espécies de anuros (ACCORDI, 1988, 1991; ACCORDI e CIANFONI, 1981; ACCORDI e GALLO, 1982; ACCORDI *et al.*, 1980, 1981, 1984; MILANO e ACCORDI, 1983, 1986). Porém, somente KATAOKA *et al.* (1979); VOLK



(1972); KURAMOTO (1987); CHIMENTI e ACCORDI (2008), trabalharam com a rã-touro.

Já, os estudos que correlacionam a morfologia destas células com fisiologia são escassos, entre eles, ROCHA *et al.* (2001) que observaram aumento na atividade secretora e início de lesões das células interrenais em matrinxã mediante estresse de captura/alta densidade; NORRIS *et al.* (1997) que observaram alterações estruturais da glândula interrenal de peixes como hipertrofia e hiperplasia do tecido e, ACCORDI e MILANO (1977); KLOAS *et al.* (1997) que observaram aumento do número das células secretoras de catecolaminas próximo do clímax da metamorfose em anfíbios.

No experimento de *Densidade campo* aos 30 dias, a resposta hormonal de corticosterona foi pouco expressiva. Entretanto, a área das células cromafins foi qualitativamente maior nos animais submetidos ao tratamento D200 do que aos animais do tratamento D100, indicando processo de hiperplasia (aumento de número) com o aumento da densidade.

Estudos têm documentado o aumento das catecolaminas associado a agentes estressores agudos em anfíbios: hipoxia (BOUTILIER e LANTZ, 1989; TALBOT e STIFFLER, 1991; ANDERSEN *et al.*, 2001); função cardíaca e resistência vascular (HERMAN e SANDOVAL, 1983); atividade forçada (TUFTS *et al.*, 1987 a; ROMERO *et al.*, 2004); desidratação/hemorragia (WITHERS *et al.*, 1988); manipulação/confinamento (BOORSE e DENVER, 2003; YAO *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2008); disruptor endócrino (GOULET e HONTELA, 2003; CAPALDO *et al.*, 2006).

No experimento de *Triagem campo* aos 30 dias, a resposta hormonal de corticosterona foi pouco expressiva. Entretanto, a área das células cromafins foi qualitativamente maior nos animais submetidos ao tratamento ST do que nos animais do tratamento TT, uma vez que no ST os animais permaneceram em constantes confrontos

frente a desuniformidade devido a não triagem. Não foi observada hiperplasia nas células cromafins com a prática da triagem e sim uma diminuição do número destas células.

Considerando que a resposta das interrenais é bastante rápida em termos hormonais para a liberação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que por sua vez são liberadas e metabolizadas imediatamente após a ocorrência do fator estressante (BARTON, 2002), e que, em termos estruturais as células dessas glândulas (cromafins) respondem de forma lenta, a ferramenta estrutural das células cromafins soma-se às demais neste estudo para a obtenção de uma recomendação ao produtor para melhorar a produtividade de seus manejos de densidade e triagem.

### **6.3.2 Glândulas mucosas (pele)**

A morfologia do tegumento de anuros têm sido descrita por vários estudos (DUELLMAN e TRUEB, 1986; FOX, 1986a, b; WARBURG *et al.*, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2005, 2006; de BRITO-GITIRANA e AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2007; 2009), porém somente ROBINSON e HEINTZELMAN (1987); IZUTSU *et al.* (1993); YOSHIZATO (1989, 1996); AZEVEDO *et al.* (2006) observaram características histológicas da pele de rã-touro. Poucos são os estudos em anuros que correlacionam morfologia do tegumento com fisiologia (de BRITO-GITIRANA e AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2007, 2009; GONÇALVES e de BRITO-GITIRANA, 2008) onde refletem a respeito da adaptação das estruturas do tegumento ao habitat aquático e terrestre.

Segundo ROBINSON e HEINTZELMAN (1987), IZUTSU *et al.* (1993), KAWAI *et al.* (1994), TAMAKOSHI *et al.* (1998) e UTOH *et al.* (2000), a epiderme passa por transformações. Varia entre apresentar epitélio simples na fase larval a epitélio estratificado queratinizado quando no clímax da metamorfose, mantendo-se com esta

característica na fase adulta. Para OHMURA e WAKAHARA (1998); KALTENBACH *et al.* (2004); KINOSHITA *et al.* (2005), o desenvolvimento das células das glândulas se inicia na pré-metamorfose, e se completa após a metamorfose. FELSEMBURGH *et al.* (2009), relatam a presença de sulcos no tegumento, que promovem a dispersão e permanência das secreções das glândulas sobre o corpo do animal.

No experimento de *Densidade laboratório e campo* inicialmente foram observados mais glândulas mucosas em quase toda a extensão do corte do tegumento, o que inferia proteção dos animais recém-metamorfoseados frente às adversidades do ambiente aquático (*e.g.* ressecamento). Ao longo do tempo, as granulares passaram a ser mais presentes no tegumento inferindo proteção frente às novas adversidades do ambiente terrestre (*e.g.* predação).

A resposta granular apresenta-se como primeira linha de ataque/defesa (HANCOCK, 2001; DIAMOND *et al.*, 2009) da pele, ou seja, de resposta rápida onde os peptídeos armazenados são descarregados via mecanismo holócrino sob estimulação adrenérgica (DOCKRAY e HOPKINS, 1975). Aos 30 dias foi observado no experimento de *Densidade laboratório*, glândulas granulares quase todas sem presença de grânulos de secreção nos animais do tratamento D200. A situação de degranulação pode indicar que as glândulas apresentaram-se exauridas frente o estressor da alta densidade (desuniformidade/confrontos agressivos). Já no experimento de *Densidade campo* o estresse apresentado foi em menor intensidade se comparado ao laboratório, observou-se glândulas granulares repletas de grânulos e a presença semelhante destas glândulas nos distintos tratamentos pode confirmar esta assertiva.

Observando as glândulas mucosas, segundo HAYES e GILL (1995), a corticosterona apresenta efeito antagonístico aos hormônios da tireóide, diminuindo o número de glândulas mucosas frente ao número de glândulas da pele. Este resultado foi

verificado *aos 30 dias* no experimento de *Densidade laboratório* para os animais do tratamento D200 se comparado aqueles do D100. Já no experimento de *Densidade campo*, o número de glândulas mucosas não mostrou alterações nos animais dos distintos tratamentos podendo indicar um estresse mais brando se comparado ao laboratório. A mucina ou acúmulo de muco foi observado claramente nos animais submetidos à maior densidade (D200) no laboratório se comparado aqueles do D100, já no campo não houve diferença para os distintos tratamentos.

No experimento de *Triagem laboratório e campo* foram observados inicialmente mais glândulas de muco do que granulares nos animais submetidos ao tratamento TT se comparado aqueles do ST. Porém, as glândulas granulares apresentaram-se mais presentes uma vez que se trataram de animais pós-metamorfoseados.

A resposta da ativação da secreção glandular frente à aplicação da noraepinefrina - NE, (noradrenalina - NA) se comporta de maneira semelhante para os anfíbios *L.chaquensis* (CASTILLO e ORCE, 1997), *R. catesbeiana* (THOMPSON e MILLS, 1983; CASTILLO e ORCE, 1995), *R. pipiens* (LINDLEY, 1969) e *X. laevis* (HOUSE, 1969). Porém, a questão de como as espécies de anfíbios variam em suas habilidades para liberar peptídeos defensivos através da pele quanto a estressores incluindo a NE ou agentes infecciosos ainda carece de elucidações (WOODHAMS *et al.*, 2007).

Aos *30 dias*, as glândulas granulares se apresentaram todas repletas de conteúdo nos animais dos distintos tratamentos no experimento de laboratório e campo, o que pode indicar que não houve tempo hábil para esvaziar estas glândulas uma vez que se tratou de um estímulo agudo.

Observando as glândulas mucosas aos *30 dias* foi verificado menor número nos animais submetidos ao tratamento TT se comparado aqueles do ST no experimento de laboratório, corroborando os resultados de HAYES e GILL (1995) que observaram a

diminuição do número das glândulas mucosas para situações mais estressantes. Já no experimento de campo, o número dessas glândulas não mostrou alterações nos distintos tratamentos podendo indicar um estresse mais brando se comparado ao laboratório.

A mucina apresentou-se mais evidente para os animais do tratamento TT se comparado aqueles do ST o que pode indicar a íntima relação entre mucina e a manipulação, que segundo DENT *et al.* (1973), LILLYWHITE e LICHT (1975) descargas de muco ocorrem quando animais são manuseados sugerindo fuga de potenciais predadores. Esta observação foi muito mais evidente no laboratório do que no campo.

A resposta granular é uma resposta mais rápida se comparada à resposta mucosa uma vez que, a extrusão das glândulas granulares é feita através de estimulação colinérgica ou adrenérgica, onde são controladas por nervos simpáticos, que terminam no interstício próximos às células mioepiteliais (BARRA e SIMMACO, 1995; SIMMACO *et al.*, 1998). Essas células situadas junto à membrana basal, são contráteis e estão diretamente relacionadas com a liberação dos grânulos, por mecanismo holócrino (TOLEDO e JARED, 1995; CLARKE, 1997; DELFINO *et al.*, 1999). As terminações nervosas das glândulas mucosas estão localizadas fora do parênquima da glândula fazendo um controle indireto via difusão (SJOBERG E FLOCK, 1976; GAMMILL *et al.*, 2012). Porém, segundo observações morfológicas de DOCKRAY e HOPKINS (1975), MILLS *et al.* (1982) e MILLS e PRUM (1984) as glândulas mucosas não apresentaram alterações morfológicamente pela estimulação de catecolaminas.

Diante dos resultados observados, a ferramenta estrutural das glândulas da pele soma-se às demais neste estudo para a obtenção de uma recomendação ao produtor para melhorar a produtividade de seus manejos de densidade e triagem.

## ***7.CONCLUSÕES***

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- O conjunto diagnóstico de corticosterona (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA). foi validado para a espécie *L. catesbeianus*;
- A corticosterona mostrou ser um bom indicador de estresse;
- Os parâmetros hematológicos da série branca mostraram ser bons indicadores de estresse;
- As alterações histológicas (células cromafins e glândulas da pele) não foram bons indicadores de estresse neste estudo;
- Situações de alta densidade no laboratório foram estressantes para os animais;
- Situações de alta densidade no campo não foram estressantes para os animais provavelmente devido a sua adaptação (homeostase);
- A manipulação no laboratório foi altamente estressante para formas juvenis de rã-touro;
- A manipulação no campo mostrou que os animais não se estressaram como no laboratório;
- Os resultados das experimentações em laboratório mostraram estresse mais expressivo do que os resultados obtidos no campo.

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



ACCORDI, F. 1988 The chromaffin cells of *Siren lacertian* (Amphibia, Urodela): cytological characteristics and evidence of exocytosis. *Journal of Anatomy* 156: 169-176.

ACCORDI, F. 1991. The chromaffin cells of urodele amphibians. *Journal of Anatomy* 179: 1-8.

ACCORDI, F. e CIANFONI, P. 1981 Histology and ultrastructure of the adrenal gland of *Rhacophorus leucomystax* (Amphibia, Anura). *Bollettino di zoologia*. (In Press).

ACCORDI, F., GALLO, V.P., GRASSI MILANO, E. e MANELLI, H. 1980 The adrenal gland of *Discoglossus pictus*: morphology and ultrastructure. *General and Comparative Endocrinology* 40: 371.

ACCORDI, F., GALLO, V.P. e GRASSI MILANO, E. 1981 The adrenal gland of *Xenopus laevis* (Daudin) (Anura, Pipidae): histological and ultrastructural observations. *Monitore zoologico italiano* 15: 163-174.

ACCORDI, F. e GALLO, V.P. 1982 Adrenaline-, noradrenaline-, and small granule containing-cells in the adrenal gland of *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). *Journal of Anatomy* 135: 5-12.

ACCORDI, F. e GRASSI MILANO, E. 1977 Catecholamine-secreting cells in the adrenal gland of *Bufo bufo* during metamorphosis and in the adult. *General and Comparative Endocrinology* 33: 187-195.

ACCORDI, F.; GRASSI MILANO, E. e GALLO, V.P. 1984 The adrenal gland of *Euproctus* (Urodela, Salamandridae): comparasion of three species and phylogenetic inferences. *Journal of Anatomy* 139: 209-214.

ALLENDER, M.C. e FRY, M.M. 2008 Amphibian Hematology. *Veterinary Clinical Exotic Animal* 11: 463-480.

AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY. Disponível em:[http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edmvac/amphibian\\_degitz\\_0405.pdf#search='amphibian%20metamorphosis%20assay%20%5B'](http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edmvac/amphibian_degitz_0405.pdf#search='amphibian%20metamorphosis%20assay%20%5B') Acesso em: 03 fev 2008.

- ANDERSEN, J.B.; JENSEN, F.B. e WANG, T. 2001 Effects of temperature and oxygen availability on circulating catecholamines in the toad *Bufo marinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129A: 473–486.
- ARNOLD, S.J. e WASSERSUG, R. J. 1978 Differential predation on metamorphic anurans by garter snakes (*Thamnophis*). *Ecology* 59: 1014-1022.
- AZEVEDO, R.A., PELLI, A.A., FERREIRA-PEREIRA, A., de JESUS SANTANA, A.S., FELSEMBURGH, F.A. e de BRITO-GITIRANA, L. 2005 Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibian, Bufonidae). *Micron* 36(1): 61–65.
- AZEVEDO, R.A., de JESUS SANTANA, A.S. e de BRITO-GITIRANA, L. 2006 Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron* 37(3): 223–228.
- BARTON, B.A. e IWAMA, G.K. 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Disease* 10: 3-26.
- BARTON, B.A. 2002 Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- BARRA, D.; SIMMACO, M. 1995 Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Tibtech* 13: 205-209.
- BELDEN, L.K.; MOORE, I.T.; MASON, R.T.; WINGFIELD, J.C. e BLAUSTEIN, A.R. 2003 Survival, the hormonal stress response and UV-B avoidance in Cascades Frog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to UV-B radiation. *Functional Ecology* 17: 409-416.
- BELDEN, L.K. e KIESECKER, J.M. 2005 Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp trematode cercariae. *Journal of Parasitology* 91: 686-688.

- BELDEN, L.K.; RUBBO, M.J.; WINGFIELD, J.C. e KIESECKER, J.M.. 2007 Searching for the physiological mechanism of density-dependence: does corticosterone regulate tadpole responses to density? *Physiological and Biochemical Zoology* 80: 444–451.
- BELDEN L.K. e WINGFIELD J.C. 2010 Variation in the hormonal stress response among larvae of three amphibian species. *Journal of Experimental Zoology* 313A.
- BENNETT, M.F., GAUDIO, C.A., JOHNSON, A.O. e SPISSO, J.H. 1972 Changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, following administration of hydrocortisone. *Journal of Comparative Physiology* 80A: 233–237.
- BERNIER, N.J.; BEDARD, N.; PETER, R.E. 2004 Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 135: 230–240.
- BIER, J.R. 1978 Growth rates and sizes at metamorphosis of high elevation populations of *Ambystoma tigrinum*. *Oecologia* 34: 175-184.
- BOORSE, G.C. e DENVER, R.J. 2003 Endocrine mechanisms underlying plasticity in metamorphic timing in spadefoot toads. *Integrative and Comparative Biology* 43: 646–657.
- BOUTILIER, R.G. e LANTZ, C.J. 1989 The effects of forced and voluntary diving on plasma catecholamines and erythrocyte pH in the aquatic anuran, *Xenopus laevis*. *Journal Experimental of Biology* 48: 83–88.
- BRIZZI, R.; DELFINO, G. e PELLEGRINI, R. 2002 Specialized Mucous Glands and Their Possible Adaptative Role in the Males of Some Species of *Rana* (Amphibia, Anura). *Journal of Morphology* 254: 328-341.
- BUENO-GUIMARÃES, H.M. 1999 *Avaliação da resposta da Rana catesbeiana frente às variações ambientais: determinação das condições ideais de manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos*. São Paulo. 180p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- CAMPBELL, T.W. 1995 *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- CAMPBELL, T.W. 1996 Clinical pathology. In: Mader, D.R.(ed), *Reptile Medicine and Surgery*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 248–257.
- CAPALDO, A.; GAY, F.; de FALCO, M.; VIRGILIO, F.; LAFORGIA, V. e VARANO, L. 2006 The adrenal gland of newt *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela) following in vivo betamethasone administration. *Anat Embryol* 211: 577–584.
- CAPALDO, A.; GAY, F.; VALIANTE, S.; LAFORGIA, V.; VARANO, L. e de FALCO, M. 2008a Dopamine effects on the adrenal gland of the newt *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). In: Watanabe, A. (ed.), *Dopamine Research Advances*. Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc. 113–129.
- CAPALDO, A.; de FALCO, M.; LAFORGIA, V. E GAY, F. 2008b Morphological and functional evidence of paracrine interactions in the adrenal gland of the newt *Triturus carnifex*. In: Capaldo, A. (ed.), *Recent Advances in Non-Mammalian Adrenal Gland Research*. Kerala: Research Signpost. 223–242.
- CARR, J.A. e NORRIS, D.O. 1988 Interrenal activity during metamorphosis of the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *General and Comparative Endocrinology* 71: 63-69.
- CARR, J.A. 2002 Stress, Neuropeptides, and Feeding Behaviour: A Comparative Perspective. *Integrative and Comparative Biology* 42: 582-590.
- CASTILLO, G.A. e ORCE, G.G. 1995 Metabolic inhibition and chloride transport in isolated toad skin. *Archives of Physiology and Biochemistry* 103: 149-159.
- CASTILO, G.A. e ORCE, G.G. 1997 Response of frog and toad skin to norepinephrine. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118A(4): 1145-1150.
- CATHERS, T.; LEWBART, G.A.; CORREA, M. e STEVENS, J.B. 1997 Serum chemistry and hematology values for anesthetized American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28: 171-174.

- CHIMENTI, C. e ACCORDI, F. 2008 Development and evolution of the adrenal gland and its homologs in teleosts, anurans, chelonians and birds. In: Capaldo, A. (ed.), *Recent Advances in Non-Mammalian Adrenal Gland Research*. Kerala: Research Signpost. 1–29.
- CLARKE, B.T. 1997 The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biology Review* 72: 365–379.
- CODDINGTON, E.J. e CREE, A. 1995 Effect of acute captivity stress on plasma concentrations of corticosterone and sex steroids in female whistling frogs *Litoria ewingi*. *General and Comparative Endocrinology* 100: 33–38.
- CONLON, J.M. 2008 Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides* 29: 1815–1819.
- CONLON, J.M.; KOLODZIEJEK, J. e NOWOTNY, N. 2009 Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 1556–1563.
- CONLON, J.M. 2011 The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell and Tissue Research* 343: 201–212.
- COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; FIORANELLI, S.A. e ZEINSTEGER, P.A. 2005 Blood and urine physiological values in captive bullfrog *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Analecta Veterinaria* 25: 15–17.
- CRESPI, E.J. e DENVER, R.J. 2004a Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide-y, and corticosterone in the regulation food intake in *Xenopus laevis*. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 279–288.
- CRESPI, E.J. e DENVER, R.J. 2004b Ontogeny of corticotropin-releasing factor on locomotion and foraging in the western spadefoot toad, *Spea hammondi*. *Hormone and Behavior* 46: 399–410.
- CRESPI, E.J. e DENVER, R.J. 2005 Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 141A: 381–390.

- DAVIS, A.K., COOK, K.C. e ALTIZER, S. 2004 Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *Ecohealth 1*: 362–373.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L. e MAERZ, J.C. 2008 The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology 22*: 760-772.
- DAVIS, A.K. 2009 Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) *Comparative Clinical Pathology 18*: 181–186.
- DAVIS, A.K. e MAERZ, J.C. 2009 Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. *Journal of Experimental Zoology A, 311*(9): 697–704.
- DAVIS, A.K. e MAERZ, J.C. 2010 Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *International Journal of Zoology 10*, 8pags.
- DAVIS, A.K., KEEL, M.K., FERREIRA A. e MAERZ, J.C. 2010 Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) *Comparative Clinical Pathology 19*(1): 49–55.
- de BRITO-GITIRANA, L. e AZEVEDO, R.A. 2005 Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). *Micron 36*(6): 532–538.
- DELARUE, C.; LEBOULENGER, F.; NETCHITAILO, P.; LIHRMANN, I.; FEUILLOLEY, M.; IDRES, S.; LARCHER, A.; MORA M.; LEFEBVRE, H.; PELLETIER, G. e VAUDRY, H. 1990 Neuroendocrino regulation of adrenocortical cells in amphibians. In: Hanke, W. (ed). *Biology and physiology of amphibians. Fortschr Zoo 38*: 193-207.
- DELFINO, G.; BRIZZI, R.; ALVAREZ, B.B. e GENTILI, M. 1999 Granular cutaneous glands in the frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): comparison between ordinary serous and ‘inguinal’ glands. *Tissue & Cell 31*(6): 576-586.

- DENT, J.N.; LUDEMAN ENG, L.A.; FORBES, M.S. 1973 Relations of prolactin and thyroid hormone to molting, skin texture and cutaneous secretion in the red-spotted newt. *Journal of Experimental Zoology* 184: 369-382.
- DENVER, R.J., 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormone Behavior* 31: 169–179.
- DENVER, R.J.; BOORSE, G.C.; GLENNEMEIER, K.A, 2002 Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In: Pfaff, D., Arnold, A., Etgen, A., Fahrbach, S., Moss, R., Rubin, R. (eds.). *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 2. San Diego: Academic Press. 469– 513.
- DENVER, R.J. 2009 Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology* 164: 20–31.
- DIAMOND, G.; BECKLOFF, N.; WEINBERG, A. e KISICH, K.O. 2009 The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current Pharmaceutical Design* 15: 2377–2392
- DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SANTOS, A.A. 2009 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research* 41(7): 1064-1071.
- DOCKRAY, G.J. e HOPKINS, C.R. 1975 The caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*. *The Journal of Cell Biology* 64: 724-733.
- DUELLMAN, W.E. e TRUEB, L. 1986 *Biology of amphibians*, Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 613p.
- FEDER, M.E. e BURGGREN, W.W. 1992 *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press. 472p.
- FELSEMBURGH, F.A.; CARVALHO-e-SILVA, S.P. e de BRITO-GITIRANA, L. 2007 Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Micron* 28(5): 139–435.

- FELSEMBURGH, F.A.; ALMEIDA, P.G.; CARVALHO-e-SILVA, S.P. e BRITO-GITIRANA, L. 2009 Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornate*. *Micron* 40: 198-205.
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* 33: 1-15.
- FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TEIXEIRA, P.C.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M. 2003 I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* 34: 1-95.
- FIGUEIREDO, M.R.C.; LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A.; BAETA, F.C.; WEIGERT, S.C. 2001 Estufas climatizadas para experimentos ambientais com rãs, em gaiolas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(4): 1135 - 1142.
- FONTANELLO, D.; WIRZ, R.R.; ARRUDA SOARES, E.; de FREITAS, E.A.N.; de CAMPOS, B.L.S.; FERREIRA, C.M. 1993 Comparação de quatro sistemas de engorda de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802): Tanque-ilha, Confinamento, Anfigranja e Gaiolas. 1-Desenvolvimento ponderal; 2-Custo operacional. *Boletim do Instituto de Pesca* 20: 1-16.
- FORBES, M.R.; McRUER, D.L. e SHUTLER, D. 2006 Whiteblood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size. *Comparative Clinical Pathology* 15: 155-159.
- FOX H. 1986a Epidermis. In: Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. e Richards, K.S. (eds), *Biology of the Integument*. Berlin: Springer. 78–110.
- FOX H. 1986b Dermal glands. In: Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. e Richards, K.S. (eds), *Biology of the integument*, vol. 2. Vertebrates. Berlin: Springer. 116–135.
- FRANÇA, F.M.; DIAS, D.C.; TEIXEIRA, P.C.; MARCANTÔNIO, A.S.; STÉFANI, M.V.; ANTONUCCI, A.M.; ROCHA, G.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e FERREIRA, C.M. 2008



Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca* 34(3): 403 – 412.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; DE SA, R.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M. AND WHEELER, W.C. 2006 The amphibian tree of life. *Bulletin of American Museum of Natural History* 297: 1-370.

GAMMILL, W.M.; FITES, J.S.; ROLLINS-SMITH, L.A. 2012 Norepinephrine depletion of antimicrobial peptides from the skin glands of *Xenopus laevis*. *Developmental and Comparative Immunology*, doi: 10.1016/j.dci.2011.12.012.

GENTZ, E.J. 2007 Medicine and surgery of amphibians. *Ilar Journal* 48: 255-259.

GILMOUR, K.M. 1997 Gas exchange. In Evans, D.H. (Ed), *The Physiology of Fishes*. New York: CRC Press. 101-127.

GLENNEMEIER, K.A. e DENVER, R.J. 2002a Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and Comparative Endocrinology* 127: 16-25.

GLENNEMEIER, K.A e DENVER, R.J 2002b Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology* 292: 32–40.

GLENNEMEIER, K.A. e DENVER, R.J. 2002c Developmental changes in Interrenal Responsiveness in Anuran Amphibians. *Integrative and Comparative Biology* 42: 565-573.

GONÇALVES, V.F. e de BRITO-GITIRANA, L. 2008 Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron* 39(1): 32–39.

GORAYA, J.; WANG, Y.; LI, Z.; O’FLAHERTY, M.; KNOOP, F.C.; PLATZ, J.E. e CONLON, J.M. 2000 Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated

from the skins of the North American frogs, *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *European Journal of Biochemistry* 267: 894–900

GOSNER, K.L. 1960 A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

GOULET, B.N. e HONTELA, A. 2003 Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environmental Toxicology Chemistry* 22: 2106–2113.

HANCOCK, R.E. 2001 Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet. Infect Disease* 1: 156–164.

HAYES, T.; CHAN, R. e LICHT, P. 1993 Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in toad (*Bufo boreus*). *Journal of Experimental Zoology* 266: 206-215.

HAYES, T.B. e GILL, T.N. 1995 Hormonal Regulation of Skin Gland Development in the Toad (*Bufo boreas*): The Role of the Thyroid Hormones and Corticosterone. *General and Comparative Endocrinology* 99: 161-168.

HAYES, T.B. 1997 Hormonal Mechanisms as Potential Constraints on Evolution: Examples from the Anura. *American Zoologist* 37: 482-490.

HERMAN, C.A. e SANDOVAL, E.J. 1983 Catecholamine effects on blood pressure and heart rate in the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology* 52: 142–148.

HOURDRY, J.; L'HERMITE, A. e FERRAND, R. 1996 Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis. *Physiological Zoology* 69(2): 219-251.

HOUSE, C.R. 1969 Secretory response to the stimulation of amphibian skin glands. *Biochim. Biophys. Acta* 173: 344-347.

- HU F, CRESPI EJ, DENVER RJ. 2008 Programming neuroendocrine stress axis activity by exposure to glucocorticoids during postembryonic development of the frog *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 149: 5470–5481.
- IZUTSU, Y.; KAIHO, M. e YOSHIKATO, K. 1993 Different distribution of epidermal basal cells in the anuran larval skin correlates with the skin's region-specific fate at metamorphosis. *Journal of Experimental Zoology* 267: 605–615.
- JAFFE, R.C. 1981 Plasma concentration of corticosterone during *Rana catesbeiana* tadpole metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 44: 314-318.
- JAIN, N.C. 1993 *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA.
- JOLIVET-JAUDET, G. e LELOUP-HATEY, J. 1984 Variations in aldosterone and corticosterone plasma levels during metamorphosis in *Xenopus laevis* tadpoles. *General and Comparative Endocrinology* 56: 59–65.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 1999 *Histologia Básica*. 9<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 427p.
- KALTENBACH, J.C.; FASZEWSKI, E.E.; NYTCH, K.E.; POTTER, C.H.; SHANTHAKUMAR, N. e FAKIN, A. 2004 Glycoconjugate localization in larval and adult skin of the bullfrog, *Rana catesbeiana*: a lectin histochemical study. *Journal of Morphology* 261: 184–195.
- KATAOKA, K., YAMAMOTO, T., SHIMIZU, K. & OCHI, Y. 1979 Adrenalin-storing, noradrenalin-storing and small granule chromaffin cells in the bull frog adrenal. Comparative fluorescence and electron microscopy on the identical section. *Acta histochemica et cytochemica* 12: 565.
- KARNOVSKY, M.J. 1965 A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology* 27: 137-152.

- KAWAY, A.; IKEYA, J.; KINOSHITA, T. e YOSHIZATO, K. 1994 A three-step mechanism of action of thyroid hormone and mesenchyme in metamorphic changes in anuran larval skin. *Developmental Biology* 166: 477-488.
- KIANK, C.; HOLTGRETER, B.; STARKE, A.; MUNDT, A.; WILKE, C. e SCHUTT, C. 2006 Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain, Behavior and Immunity* 20: 359–368.
- KIESECKER, J.M. 2002 Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900–9904.
- KIKUYAMA, S.; SUZUKI, M.R. e IWAMURO, S. 1986 Elevation of plasma aldosterone levels of bullfrog tadpoles at metamorphic climax. *General and Comparative Endocrinology* 63: 186-190.
- KIKUYAMA, S.; KAWAMURA, K.; TANAKA, S. e YAMAMOTO, K. 1993 Aspects of amphibian metamorphosis: Hormonal Control. *International Review and Cytology* 145: 105-148.
- KINOSHITA, T.; SASAKI, F. e WATANABE, K. 2005 Regional specificity of anuran larval skin during metamorphosis: transdifferentiation of tadpole tail-epidermis. *Journal of Experimental Zoology* 238: 201–210.
- KLOAS, W.; REINECKE, M. e HANKE, W. 1997 Stage-dependent changes in adrenal steroids and catecholamines during development in *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology* 108: 416–426.
- KNOOP, R.; FERREIRA, C.M.; TAKAHASHI, N.S.; FRANÇA, F.M.; ANTONUCCI, A.M.; TEIXEIRA, P.C.; SUGOHARA, A.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; HIPOLITO, M. 2011 Influência da incorporação de vitamina C á dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. *Boletim do Instituto de Pesca* 37(4): 383-391.
- KOLIAS, G.V. 1984 Immunologic aspects of infectious diseases. In Hoff, G.; Frye, F. and Jaconson, E., (eds). *Diseases of amphibians and reptiles*. New York: Plenum Press. 661-691

- KRAIN, L.P. e DENVER, R.J. 2004 Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Journal of Endocrinology* 181: 91–104.
- KRUG, E. C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J. e NICOLL, C.S. 1983 Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 52: 232-241.
- KUPFERBERG, S.; MARKS, S. e POWER, M.E. 1994 Effects of variation in natural algal and detrital diets on larval anuran (*Hyla regilla*) life history traits. *Copeia* 1994(2): 446-457.
- KURAMOTO, H. 1987 An immunohistochemical study of chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of the bull-frog, *Rana catesbeiana*. *Arch. Hist. Jap* 50(1): 15-38.
- LANGKILDE, T. e SHINE, R. 2006 How much stress do researchers inflict on their study animals? A case study using a scincid lizard, *Eulamprus heatwolei*. *Journal of Experimental Biology* 209: 1035–1043.
- LILLYWHITE, H.B. e LICHT, P. 1975 A comparative study of integumentary mucous secretions in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* 51 A: 937-941.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C.A. 1992 *A tecnologia da criação de rãs*. Viçosa: Imp. Universitária. 168p.
- LIMA, S.L.; CASALI, A.P. e AGOSTINHO, C.A. 2003 Desempenho Zootécnico e Percentual de Consumo de Alimento de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*) na Fase de Recria (Pós-Metamorfose) do Sistema Anfigranja. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32(3): 505-511.
- LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. 2006 Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30 (3/4): 113-117.
- LINDLEY, B.D. 1969 Nerve stimulation and electrical properties of frog skin. *J. Gen. Physiol.* 53:427-449.

- LOMAN, J. 2004 Density regulation in tadpoles of *Rana temporaria*: a full pond field experiment. *Ecology* 85: 1611–1618.
- MANIERO, G.D. e CAREY, C. 1997 Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Journal of Comparative Physiology* 167B: 256–263.
- MARTIN, L.B.; GILLIAM, J.; HAN, P.; LEE, K. e WIKELSKI, M. 2005 Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* 140: 126–135.
- MAULE, A.G. e VANDERKOOI, S.P. 1999 Stress-induced immune–endocrine interaction. In: Balm, P.H.M. (ed), *Stress Physiology in Animals*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press. 205–245.
- McEWEN, B.S. e WINGFIELD, J.C. 2003 The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormone and Behavior* 43: 2–15.
- McDIARMID, R.W e ALTIG, R. 1999 *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. Chicago: The University of Chicago Press. 444p.
- MILANO, E.G. e ACCORDI, F. 1983 Comparative morphology of the adrenal gland of anuran Amphibia. *Journal of Anatomy* 136(1): 165-174.
- MILANO E.G. e ACCORDI, A. 1986 Evolutionary trends in adrenal gland of anurans and urodeles. *Journal of Morphology* 189: 249–259.
- MILLS, J.W.; RICK, R.; DOERGE, A. e THURAU, K. 1982 Intracellular electrolyte concentrations in the resting and isoproterenol stimulated exocrine glands of the frog skin. *Journal Cell Biology* 95: 268a (abstract).
- MILLS, J.W. e PRUM, B.E. 1984 Morphology of the Exocrine Glands of the Frog Skin. *The American Journal of Anatomy* 171: 91-106.

- MOBERG, G.P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: Moberg, G.P.; Mench, J.A. (eds) *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing. 1-22
- MOORE, M.C.; THOMPSON, C.W. e MARLER, C.A. 1991 Reciprocal changes in corticosterone and testosterone levels following acute and chronic handling stress in the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology* 81: 217-226.
- MOORE, F.L.; LOWRY, C.A. e ROSE, J.D. 1994 Steroid-neuropeptide interactions that control reproductive behaviors in an amphibian. *Psychoneuroendocrinology* 19: 581-592.
- NORRIS, D.O.; FELT, S.B.; WOODLING, J.D.; DORES, R.M. 1997 Immunocytochemical and Histological Differences in the Interrenal Axis of Feral Brown Trout, *Salmo trutta*, in Metal-Contaminated Waters. *General and Comparative Endocrinology* 108: 343-351.
- OHMURA, H. e WAKAHARA, M. 1998 Transformation of skin from larval to adult types in normally metamorphosing and metamorphosis-arrested salamander, *Hynobius retardatus*. *Differentiation* 63: 237-246.
- PAULSON, R.B.; ALLEY, K.E.; SALATA, L.J. e WHITMYER, C.C. 1995 A scanning electron-microscopic study of tongue development in the frog *Rana pipiens*. *Archives of Oral Biology* 40(4): 311-319.
- RIBEIRO-FILHO, O.P. 1998 Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário. *Revista Brasileira de Zootecnia* 27(4): 658-663.
- ROBINSON, D.H. e HEINTZELMAN, M.B. 1987 Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana*. *The Anatomical Record* 217: 305-317.
- ROCHA, G.C.; FERREIRA, C.M.; TEIXEIRA, P.C.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; ANTONUCCI, A.M.; MARCANTÔNIO, A.S. e LAURETO, M. 2010 Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30: 891-896.

- ROCHA, R.M.; LEME DOS SANTOS, H.S.; VICENTINI, C.A.; CRUZ, C. 2001 Structural and ultrastructural characteristics of interrenal gland chromaffin cell of matrinxa, *Brycon cephalus* Gunther 1869 (Teleostei-Characidae). *Anatomy, Histology and Embriology* 30: 335-355.
- ROHR, J.R.; SCHOTTHOEFER, A.M.; RAFFEL, T.R. 2008 Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* 455(7217): 1235–1239.
- ROLLINS-SMITH, L.A.; BARKER, K.S. e DAVIS, A.T. 1997 Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. *Developmental Immunology* 5: 145-152.
- ROMANOVA, E.B. e ROMANOVA, O.Y. 2003 Peculiarities of leukocytic formula of peripheral blood of green frogs under conditions of anthropogenic load. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 39: 480-484.
- ROMERO, L.M. 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128: 1–24.
- ROMERO, L.M. 2004 Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Ecology and Evolution* 19(5):
- ROMERO, S.M.B.; FIMPEREIRA, A.; RISSATO GAROFALO, M.A. e HOFFMANN, A. 2004 Effects of exercise on plasma catecholamine levels in the toad, *Bufo paracnemis*: role of the adrenals and neural. *Control. Journal of Experimental Zoology* 301: 911–918.
- ROMERO, L.M. e REED, J.M. 2005 Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology* 140: 73–79.
- ROSENFELD, G. 1949 Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan* 20: 329-334.



- ROSENTHAL, E.J.; ROSS, R. 1984 Elevation of plasma glucose, alanine, and urea levels by mammalian ACTH in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology* 59(2): 199-20.
- ROTHENBERG, M.E. e HOGAN, S.P. 2006 The eosinophil. *Annual Review of Immunology* 24: 147–174.
- ROT-NIKCEVIC I., DENVER, R.J. e WASSERSUG, R.J. 2005 The influence of visual and tactile stimulation on growth and metamorphosis in anuran larvae. *Functional Ecology* 19: 1008–1016.
- ROVIRA, J.; VILLARO, A.C.; BODEGAS, M.E.; VALVERDE, E. e SESMA, P. 1995 Metamorphic changes in the stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles. *Tissue & Cell* 27(1): 13-22.
- RUPLEY, A.E. 1997 *Manual of Avian Practice*. W.B. Saunders Company, Philadelphia PA.
- SAHIN, M.; GUMUS, A. e BALCAN, E. 2008 Glycoconjugate histochemistry of mucous glands in the skin of metamorphosing *Bufo viridis*. *Biologia* 63(3): 444-449.
- SAPOLSKY, R.M. 1993 Neuroendocrinology of the stress-response. *In*: Becker, J.B.; Breedlove, S.M. e Crews, D. (eds.). *Behavioral Endocrinology*. Cambridge: MIT Press. 287–324
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M. e MUNCK, A.U. 2000 How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21: 55– 89.
- SAPOLSKY, R.M.; BECKER, J.B.; BREEDLOVE, S.M.; CREWS, D. e McCARTHY, M.M. 2002 Endocrinology of the stress response. *Behavioral Endocrinology*. Cambridge: MIT Press. 409–450.
- SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; HAUSER, F.; PROBST, J.C. e HOFFMAN, W. 1994 Molecular Anatomy of a Skin Gland: Histochemical and Biochemical Investigations on the Mucous Glands of *Xenopus laevis*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42(1): 57-65.
- SEMLITSCH, R.D. e CALDWELL, J.P. 1982 Effects of density on growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrooki*. *Ecology* 63: 905–911.

- SHUTLER, D.; SMITH, T.G. e ROBINSON, S.R. 2009 Relationships between leukocytes and *Hepatozoon* spp. in green frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Diseases* 45(1): 67-72.
- SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. 1998 Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers (Peptide Science)* 47: 435-450.
- SJÖBERG, E. e FLOCK, A. 1976 Innervation of skin glands in the frog. *Cell and Tissue Research* 172: 81-91.
- TALBOT, C.R. e STIFFLER, D.F. 1991 Effects of hypoxia on acid-base balance, blood gases, catecholamines, and cutaneous ion exchange in the larval tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Journal of Experimental Zoology* 257: 299-305.
- TAMAKOSHI, T.; OOFUSA, K. e YOSHIKATO, K. 1998 Visualization of the initiation and sequential expansion of the metamorphic conversion of anuran larval skin into the precursor of adult type. *Develop. Growth Differ.* 40: 105-112.
- TAMORI, Y. e WAKAHARA, M. 2000 Conversion of red blood cells (RBCs) from the larval to the adult type during metamorphosis in *Xenopus*: specific removal of mature larval type RBCs by apoptosis. *International Journal of Developmental Biology* 44: 373-380.
- THOMAS, E.O. TSANG, L. e LICHT, P. 1993 Comparative histochemistry of the sexually dimorphic skin glands of anuran amphibians. *Copeia* 1993: 133-143.
- THOMPSON, I.G. e MILLS, J.W. 1983 Chloride transport in glands of frog skin. *American Journal of Physiology* 244:C221-C226.
- THRALL, M.A. 2004 Hematology of amphibians, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- TOLEDO, R.C. e JARED, C. 1995 Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A(1): 1-29.

- TUFTS, B.L.; MENSE, D.C. e RANDALL, D.J. 1987a The effects of forced activity on circulating catecholamines and pH and water content of erythrocytes in the toad. *Journal of Experimental Biology* 128: 411–418.
- USSING, A.P. e ROSENKILDE, P. 1995 Effect of induced metamorphosis on the immune system of the Axotil, *Ambyostoma mexicanum*. *General and Comparative Endocrinology* 97: 308-319.
- UTOH, R.; ASAHINA, K.; SUZUKI, K. e KOTANI, K. 2000 Developmentally and regionally regulated participation of epidermal cells in the formation of collagen lamella of anuran tadpole skin. *Develop. Growth Differ.* 42: 571-580.
- VOLK, T.L. 1972 Ultrastructure of the Cortical Cell of the interrenal Gland of the American Bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Z. Zellforsch* 123: 470-485.
- WADA, H 2008 Glucocorticoids: mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology* 156(3): 441-453.
- WAKAHARA, M. E YAMAGUCHI, M. 2001 Erythropoiesis and conversion of RBCs and hemoglobins from larval to adult type during amphibian development. *Zoological Science* 18: 891-904.
- WARBURGH, M.R.; ROSENBERG, M.; ROBERTS, J.R. e HEATWOLE, H. 2000 Cutaneous glands in the australian hylid *Litoria caerulea* (Amphibia, Hylidae). *Anatomy and Embryology* 201: 314–348.
- WASSERSUG, R.J. e SPERRY, D.G. 1977 The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology* 58: 830-839.
- WENDELAAR BONGA, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77(3): 592-625.
- WICK, G.; HU, Y.; SCHWARTZ, S. e KROEMER, G. 1993 Immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary adrenal axis in autoimmune disease. *Endocrine Reviews* 14: 539-563.
- WILBUR, H.M. e COLLINS, J.P. 1973 Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305–1314.

- WILBUR, H.M. 1977 Density dependent aspects of growth and metamorphosis in *Bufo americanus*. *Ecology* 58: 196-200.
- WINGFIELD, J.C. e ROMERO, L.M. 2001 Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In: McEwen, B.S. e Goodman, H.M. (eds). *Handbook of Physiology: the Endocrine System*. New York: Oxford University Press. 211–234
- WITHERS, P.C.; HILLMAN, S.S. e KIMMEL, P.B. 1988 Effects of activity, hemorrhage, and dehydration on plasma catecholamine levels in the marine toad (*Bufo marinus*). *General and Comparative Endocrinology* 72: 63–71.
- WOODHAMS, D.C.; ARDIPRADJA, K.; ALFORD, R.A.; MARANTELLI, G.; REINERT, L.K. e ROLLINS-SMITH, L.A. 2007 Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10: 409-417.
- WRIGHT, M.L.; CYKOWSKI, L.J.; LUNDRIGAN, L.; HEMOND, K.L.; KOCHAN, D.M.; FASZEWSKI, E.E. e ANUSZEWSKI, C.M. 1994 Anterior pituitary and adrenal cortical hormones accelerate or inhibit tadpole hind limb growth and development depending on stage of spontaneous development or thyroxine concentration in induced metamorphosis. *Journal Experimental of Zoology* 270: 175-188.
- WRIGHT, K.M. 2001 Amphibian hematology. In Wright, K..M. e Whitaker, B.R. (eds). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar FL: Krieger. 111-122
- YAO, M.; WESTPHAL, N.J. e DENVER, R.J. 2004 Distribution and acute stressor-induced activation of corticotrophin-releasing hormone neurones in the central nervous system of *Xenopus laevis*. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 880–893.
- YOSHIZATO, K. 1989 Biochemistry and cell biology of amphibian metamorphosis with a special emphasis on the mechanism of removal of larval organs. *International Review of Cytology* 119: 97–149.

YOSHIZATO, K. 1996 Cell death and histolysis in amphibian tail during metamorphosis. In: Gilbert, L.I.; Tata, J.R. e Atkinson, B.G. (eds). *Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. San Diego: Academic Press. 647–671.

ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. New Jersey, Prentice Hall, 718p.

ZERANI, M.; AMABILI, F.; MOSCONI, G. e GOBBETTI, A. 1991 Effects of captivity stress on plasma steroid-levels in the green frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98A: 491–496.