UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro e no desempenho de animais pós-metamórficos

Angela Emi Takamura
Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro e no desempenho de animais pós-metamórficos

Doutoranda: Angela Emi Takamura

Orientadora: Dra. Marta Verardino De Stéfani

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo
2015

Takamura, Angela Emi
T136t Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro e no desempenho de animais pós-metamórficos / Angela Emi Takamura. – – Jaboticabal, 2015
xiv, 80 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015
Orientadora: Marta Verardino De Stéfani
Banca examinadora: Breno Henrique Caneguim, Cláudia Máris Ferreira Mostério, Claudio Angelo Agostinho, João Batista Kochenborger Fernandes
Bibliografia

1. Glândula tireóide. 2. Composto goitrogênico. 3. Desruptor endócrino. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.21:597.851

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro e no desempenho de animais pós-metamórficos

AUTORA: ANGELA EMI TAKAMURA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARTA VERARDINO DE STEFANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARTA VERARDINO DE STEFANI
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. BRENO HENRIQUE CANEGUIM
Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Campus de Iturama-MG

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIS FERREIRA MOSTÉRIO
/ Instituto de Pesca

Prof. Dr. CLÁUDIO ÂNGELO AGOSTINHO
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. JOAO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES
Laboratório de Peixes Ornamentais, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Data da realização: 31 de julho de 2015.

Sumário

Introdução Geral **1**

Referências **9**

Artigo 1 - Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro (Lithobates catesbeianus) 17

Resumo **18**

Abstract **19**

1. Introdução 20

2. Materiais e métodos 22

2.1. Delineamento experimental e amostragens 22

2.2. Processamento das amostras e análises laboratoriais 25

2.3. Análises estatísticas 26

3. Resultados e Discussões 27

3.1. Crescimento e ganho de peso 27

3.2. Composição corporal 31

3.3. Glândula Tireóide 33

4. **Conclusões** 41

5. Referências 41

Artigo 2 – Adição de tiouréia na alimentação de girinos afeta o desempenho de rã-touro? 48

Resumo **49**

Abstract **50**

1. Introdução 51

2. Materiais e métodos 53

2.1. Delineamento experimental e amostragens 53

2.2. Processamento das amostras e análises laboratoriais 54

2.3. Análises estatísticas 54

3. Resultados e Discussões 55

3.1. Crescimento e desempenho 55

3.2. Índice Somaticos 59
3.3. Morfologia dos tecidos 60
3.3.1. Fígado 60
3.3.2. Rim 63
3.3.3. Baço 65
3.3.4. Gônadas 69
4. Conclusões 71
5. Referências 71

Índice de Figuras

Introdução Geral

Figura 1. Diagrama do eixo HPT em anfíbios, incluíndo o mecanismo de feedback que regula os níveis hormônais da tireóide (TH), T3 e T4, as funções do TH e os potenciais alvos (I-VI) dos disruptores endócrinos (ED). 4

Figura 2. Esquema de eventos e níveis hipotéticos de hormônios da pituitária e da tireóide em rãs-touro durante a metamorfose 5

Artigo 1 - Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*

Figura 1. Vista lateral do corpo de girinos indicando as marcações para mensuração do animal. 24

Figura 2. Visão geral da cavidade celomática de girino de rã-touro com ampliação da glândula tireóide (corte vertral).....26

Figura 3. Comprimento parcial e total de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) tratados com TU.....28

Figura 4. Peso (g) de girinos de rã-touro tratados com TU durante a fase pré-metamórfica. 29

Figura 3. Porcentagem de proteína bruta (PB, %), extrato etéreo (EE, %), matéria seca (MS, %) e cinzas (%) no corpo de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos avaliados. 31

Figura 6. Área da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos avaliados. 34

Figura 7. Tamanho médio dos folículos (TFol) e área luminal do folículo (AFol) da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos e dias avaliados. 35

Figura 8. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 15 dias de tratamento com tiouréia (TU). 36

Figura 9. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 30 dias de tratamento com tiouréia (TU) 38

Figura 10. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 45 dias do início do experimento. 39

Figura 11. Altura das células foliculares da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos.....40

Artigo 2 – Adição de tiouréia na alimentação de girinos afeta o desempenho de rã-touro?

Figura 1. Peso médio de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica. 55

Figura 2. CRC médio (mm) de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica 58

Figura 3. Peso médio dos órgãos internos de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica. 59

Figura 4. Fotomicrografia de secções histológicas do fígado de rã-touro corados em HE. 61

Figura 5. Fotomicrografia de secções histológicas do rim de rã-touro corados em HE. 64

Figura 6. Fotomicrografia de secções histológicas do baço de rã-touro corados com HE. 67

Figura 7. Fotomicrografia de secções histológicas de gônadas de rã-touro adultas corados com HE.....70

Índice de Tabelas

Artigo 1 - Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição nutricional da dieta utilizada 23

Tabela 2. Número médio de folículos presentes na glândula tireóide de girinos de rã-touro em função dos tratamentos e dias avaliados.....37

Siglas

ACF: Altura das células foliculares da glândula tireóide

AcoI: Área do colóide

CP: Comprimento parcial

CRC: comprimento rostro-cloacal

CRH: Hormônio liberador de corticotropina

CT: Comprimento total

D1 e D2: enzimas deiodinases

DIC: Delineamento inteiramente casualizado

EB: Energia bruta

ED: Energia digestível

EE: Extrato etéreo

HPT: Hipotálamo-pituitária-tireóide

I^-: Iodeto inorgânico

MS: Matéria seca

NIS: Iodeto de sódio simporte

PB: Proteína bruta

PD: Proteína digestível

SNC: Sistema nervoso central

T_0: Tratamento controle (0 mg TU/kg de ração)

T_1: Tratamento 1 (3 mg TU/kg de ração)

T_2: Tratamento 2 (5 mg TU/kg de ração)

T_3: Tratamento 3 (7 mg de TU/kg de ração)

T3: 3, 5, 3'–triiodotironina

T4: Tiroxina

TG: Biossíntese de tireoglobulina

TH: Hormônios da tireóide

THPB: Proteínas de ligação de hormonios da tireóide

TPO: Peroxidase da tireóide

TRH: Hormônio liberador de tirotropina

TSH: Hormônio estimulante da tieróide

TT: Transtirretina

TU: Tiouréia

Agradecimentos

Á Universidade Estadual Paulista e ao Centro de Aquicultura da UNESP pela oportunidade oferecida;

A todos docentes do Centro de Aquicultura – CAUNESP, pelos ensinamentos passados;

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, pelo espaço fornecido e uso de equipamentos;

A Dra. Ana Maria Cristina do Instituto Biológico de São Paulo pela atenção e auxílio prestados;

A prof. Dra. Mirian Harumi Tsunemi do Departamento de Bioestatística de Botucatu pela ajuda prestada;

A Prof. Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho por seus ensinamentos e amizade;

Aos companheiros de trabalho: Marcelo, Cleber, Donovan e Andres;

Aos secretários David e Veralice, por toda a atenção dispensada;

Aos funcionários Marcio (Perereca) e Valdecir do CAUNESP e Zé e Renato do IB de Botucatu por toda a ajuda;

E principalmente à,

Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani pela orientação, paciência e atenção.

A todos, o meu muito obrigado!

Dedicatória

Aos meus pais Luiz e Katsumi;

Meus irmãos Claudio e Alexandre;

Com muito carinho, dedico.

Ao Marcos Antônio de Oliveira, que sempre me apoiou, nos momentos de alegria e tristeza...

Mostrou-me muito Carinho e Paciência

Com todo amor e carinho

Ofereço!

Apoio financeiro

A Capes, pela bolsa de Doutorado concedida;

A FUNDUNESP (Proc. 0195/005/14-PROPG/CDC)

Resumo

A tiouréia (TU) é um composto orgânico, frequentemente utilizado no tratamento de hipertireoidismo. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da tiouréia sobre o crescimento e desenvolvimento de rãs-touro nas fases pré e pós-metamórficas, por meio da deposição de nutrientes corporais, desempenho e análises morfológicas da glândula tireóide, fígado, rins, baço e gônadas. Este trabalho foi dividido em duas fases. Na primeira fase, 7200 girinos foram distribuídos em 12 caixas (500L), em delineamento inteiramente casualizado, e alimentados por 30 dias com ração contendo 0 (T_0), 3 (T_1), 5 (T_2) e 7 mg TU/kg de ração (T_3) e três repetições. Na segunda fase, 696 imagos originários da primeira fase foram alojados em 12 baias de 3 m^2. A deposição de nutrientes corporais nos tratamentos avaliados encontra-se de acordo com o crescimento normal de girinos de rã-touro. O uso de 7 mg de TU/kg de ração proporcionou o melhor crescimento dos girinos. No tratamento T_0, observou-se o desenvolvimento normal da glândula tireóide e nos demais tratamentos, observou-se a hipertrofia da glândula tireóide em função, principalmente, da hipertrofia e hiperplasia das células foliculares. Na segunda fase, observaram-se diversas alterações celulares no fígado, rim e baço. Não foram observados danos celulares ou estruturais nas gônadas. A administração de 7 mg TU/kg na alimentação dos girinos resultou na obtenção de imagos maiores na recria e ao final do período de engorda. O uso de tiouréia durante a fase de girinagem, nas dosagens utilizadas, não causou toxicidade ou qualquer alteração gonadal em animais adultos.

Palavras-chave: composto goitrogênico, disruptor endócrino, glândula tireóide

Abstract

Thiourea (TU) is an organic compound often used for treatment of hyperthyroidism. This study aimed to evaluate the effects of thiourea on growth and development of bullfrogs on pre and post-metamorphic phases, by determining the deposition of body nutrients, performance and histological analysis of the thyroid gland, liver, kidneys, spleen and gonads. This work was divided into two phases. In the first phase, 7200 tadpoles were distributed in 12 boxes (500L) in a completely randomized design, and fed for 30 days with feed containing 0 (T_0), 3 (T_1), 5 (T_2), 7 mg TU/kg of feed (T_3), and three replicates. In the second phase, 696 juveniles originating from the first phase were housed in 12 pens of 3 m^2. The body nutrients deposition obtained is in accordance with the normal growth of bullfrog tadpoles. The use 7 mg TU/kg of feed provided the best growth of the tadpoles. In treatment T_0, we observed the normal development of the thyroid gland and in the other treatments there was hypertrophy of the thyroid gland due mainly hypertrophy and hyperplasia of follicular cells. In the second phase, we observed cellular changes in liver, kidney and spleen. In gonads we weren't observed any cellular or structural damage on gonads.The administration of 7 mg TU/kg in the bullfrog tadpoles feed resulted in larger animals on the growing phase and at the end of it. The use of thiourea during tadpole's phase in doses used in this study didn't cause toxicity or gonadal changes in adult animal.

Keywords: goitrogenic compound, endocrine disrupters, thyroid gland

Introdução Geral

Em função da crescente preocupação mundial com a pesca predatória e a crescente redução da população de espécies nativas, os mercados consumidores têm priorizado o consumo de animais produzidos em cativeiro.

Entre as muitas atividades inseridas na aquicultura, a ranicultura tem se destacado pelo fato de ser passível de instalação em pequenas áreas.

No Brasil, no período de 1986 a 2006, a produção de carne de rã aumentou de 10 t para 639 t, apresentando um crescimento de 6.290%, enquanto o crescimento mundial foi de 1.296%. Somos o maior produtor das Américas, tendo obtido uma participação, entre 2000 e 2006, de 58% a 68% do total produzido no continente (CRIBB, 2009).

Embora estudos de mercado tenham demonstrado crescente aceitação e procura pela carne de rã (SALVIANO et al., 2007; CARRARO, 2008), o preço do produto ainda é um fator inibitório à expansão do mercado consumidor e, consequentemente à produção (LIMA, 2005).

Como em toda criação animal intensiva, a ranicultura necessita de produção contínua de rãs para torná-la economicamente viável. Assim, é necessário o estabelecimento de novas técnicas que visem à maior produção e a regularidade da oferta.

Nos últimos anos, grandes avanços tecnológicos foram alcançados no cultivo de rãs, mas, há ainda necessidade de muitos estudos para a obtenção de sua viabilidade técnica e econômica (ABRANTES & SEIXAS FILHO, 2007).

Os anfíbios apresentam um complexo ciclo de vida, que os permitem habitar dois ambientes totalmente diferentes, o aquático (fase larval ou girinagem) e o terrestre (fase pós-metamórfica) (WASSERSUG, 1975). Girinos e adultos diferem entre si no modo de respiração, locomoção, dieta e alimentação, e essas diferenças se refletem no comportamento e na resposta aos fatores ambientais (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

A temperatura afeta diretamente o desenvolvimento dos organismos ectotérmicos, os quais não possuem mecanismos eficientes para a manutenção da temperatura corporal em níveis constantes (GRZIMEK, 2003). Extremos de temperatura podem afetar não só aspectos biológicos e funcionais dos animais

como também comportamentais, tais como: taxa de ventilação (KRUHØFFER et al., 1987), susceptibilidade a infecções (RAFFEL et al., 2006), consumo de alimentos (BRAGA & LIMA, 2001), frequência e taxa de repetição de vocalizações (SULLIVAN & MALMOS, 1994; GIACOMA et al., 1997; NAVAS & BEVIER, 2001; GUIMARÃES & BASTOS, 2003; LINGNAU & BASTOS, 2007; HADDAD et al., 2008) que, por sua vez, interferem nas relações territoriais entre machos e identificação de parceiros sexuais.

Girinos criados em ambientes com temperaturas mais baixas são, em geral, maiores do que aqueles criados em temperaturas mais elevadas (BERVEN & GILL, 1983), situação mantida inclusive após o clímax da metamorfose (PANDIAN & MARIAN, 1985).

Em muitas regiões do Brasil, em função do clima mais quente, a produção de imagos de boa qualidade é difícil de ser obtida, devido à aceleração do processo de metamorfose, que resulta em imagos pequenos e frágeis, os quais apresentam maior dificuldade de arraçoamento e também, maior susceptibilidade a doenças.

Previsões para este século indicam o aumento de dias mais quentes, maiores temperaturas mínimas, redução de dias frios, maiores precipitações em determinadas regiões e secas em outras (IPCC, 2002) e, para o início do século XXII, um aumento da temperatura média global entre 1,4°C e 5,8°C (IPCC, 2014).

Diversos estudos comprovam que tanto a temperatura (SMITH-GILL & BERVEN, 1979; NEWMAN, 1998) quanto o período de claro/escuro (KANAMORI & BROWN, 1996) interferem na síntese e liberação de hormônios da tireóide (triiodotironina, T3 e tiroxina, T4) que por sua vez, afetam o clímax da metamorfose.

A metamorfose pode ser definida como uma série de modificações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais que ocorrem, de forma abrupta, durante o período larval (DUELLMAN & TRUEB, 1994), em função do aumento nos níveis dos hormônios da tireóide (TH), e pode ser dividida em três fases: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax. A pré-metamorfose é um período de crescimento e desenvolvimento larval, mas sem modificações metamórficas e sem a influência do T4 (DODD et al., 1976). A pró-metamorfose é uma fase de crescimento contínuo, especialmente dos membros posteriores,

início da função da glândula tireóide e aumento dos níveis de T4. Nesta fase, o processo de morfogênese é dependente de T4 (DODD et al., 1976). O clímax é caracterizado pelo rápido aumento dos níveis de T4 e modificações radicais que culminam com a modificação e/ou perda da maioria das características larvais como: diferenciação do fígado (ATKINSON et al., 1998), remodelamento do intestino (FOX, 1984), dos órgãos respiratórios (DODD et al., 1976), do sistema imune (ROLLINS-SMITH, 1998), dos olhos (MANN & HOLT, 2001), da pituitária (WEBER, 1996) e de grande parte dos ossos (TRUEB & HANKEN, 1992).

Os girinos de rã-touro necessitam de seis a 10 meses para completar a sua metamorfose quando a temperatura do meio oscila entre 15°C e 18°C e de três a quatro meses quando a temperatura varia entre 21°C a 27°C (VIZOTTO, 1981).

Santos et al. (2008), após avaliarem os efeitos do fotoperíodo e da temperatura no crescimento de girinos de rã-touro, concluíram que maior ganho de peso e maior sobrevivência foram obtidos no fotoperíodo de 20L: 4E (20 horas de luz e quatro horas de escuro) e 30°C.

Baseados em dados diários de consumo de alimento e ganho de peso, Braga e Lima (2001) avaliaram o desempenho de rãs, com peso médio inicial de 37 g, em três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C). Os autores concluíram que o melhor crescimento das rãs ocorreu na faixa de temperatura entre 25°C e 30°C. Resultados semelhantes foram reportados por Figueiredo et al. (2001) ao avaliarem os efeitos do ambiente sobre o desempenho de rãs. Segundo os autores, o melhor crescimento da rã-touro foi obtido entre 28,2°C e 30,1°C.

A biossíntese de hormônios da tireóide (TH) é um processo de múltiplos passos que compreende a absorção de iodeto pelo iodeto de sódio simporte (NIS); biossíntese de tireoglobulina (TG); incorporação do iodo aos resíduos tirosila da TG pela tireóide peroxidase, obtendo TG-iodotironina e, por fim, endocitose e hidrólise do TG iodado para liberar TH (DUNN & DUNN, 2001).

Como na maioria dos vertebrados, a estrutura básica e a função dos folículos da tireóide são muito semelhantes (PARIS & LAUDET, 2008). Cada folículo é formado por uma única camada de células epiteliais, que formam o epitélio folicular, o qual delimita o lúmen central. As células foliculares obtém o iodeto inorgânico (I^-) do sangue, via simporte Na^+/I^- (NIS), e o transportam para superfície epitelial, onde é incorporado à tireoglobulina para formar tiroxina (T4),

que é armazenada como colóide no interior do lúmen do folículo (CARR & PATIÑO, 2011) (Figura 1).

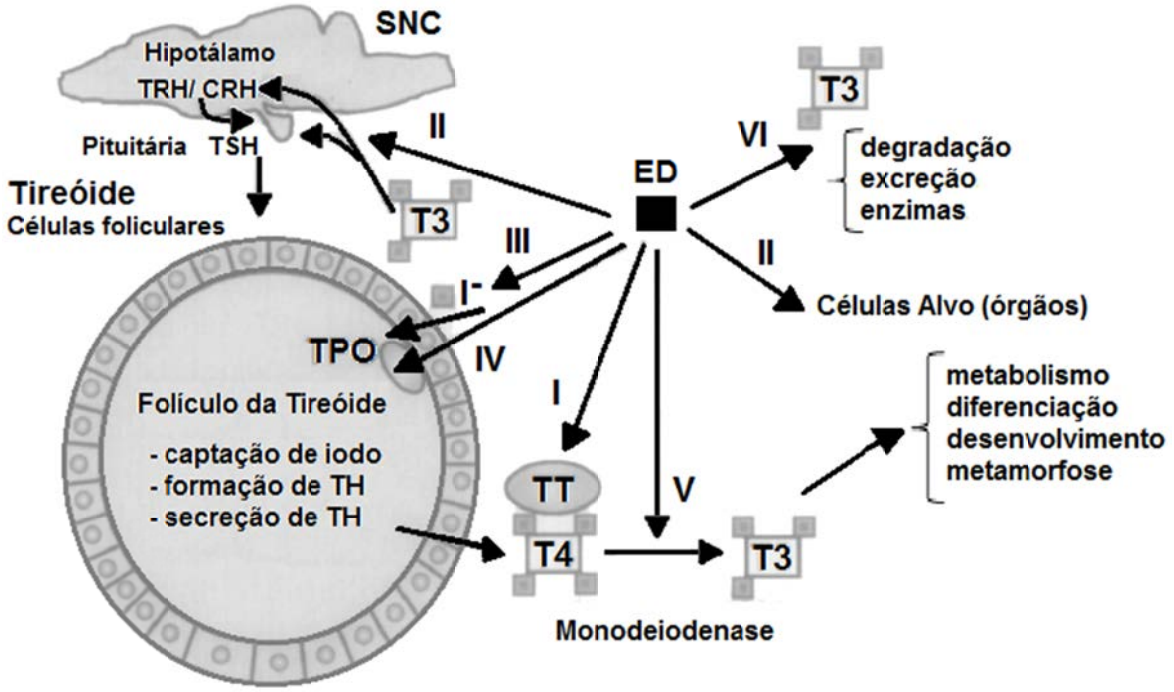

Figura 1. Diagrama do eixo HPT em anfíbios, incluindo o mecanismo de feedback que regula os níveis hormonais da tireóide (TH), T3 e T4, as funções do TH e os potenciais alvos (I-VI) dos disruptores endócrinos (ED). SNC, sistema nervoso central; CRH, hormônio liberador de corticotropina; I⁻, iodo; TH, hormônios da tireóide (T3, T4); TPO, peroxidase da tireóide; TT, transtirretina; TRH, hormônio liberador de tirotropina; TSH, hormônio estimulante da tieróide. Fonte: KLOAS (2002).

Nos anfíbios, o principal produto liberado na circulação pelos folículos da tireóide é o T4, que é carregado aos tecidos alvo ligado às proteínas de ligação de hormonios da tireóide (THPB) (DEGITZ et al., 2005). Nos tecidos periféricos, enzimas deiodinases (D1 e D2) removem um dos iodos convertendo T4 em T3 (FORT et al., 2007). A liberação do TH, pelos folículos da tireóide, é regulado pelo TSH produzido na pituitária. Quando os níveis de TH são reduzidos, a atividade do hipotálamo-pituitária aumenta com a finalidade de elevar a produção e regularizar os níveis circulantes. Logo, a regulação da atividade do eixo HTP é realizado por feedback negativo (CARR & PATIÑO, 2011).

Na maioria dos vertebrados, inclusive em anfíbios adultos, a síntese e liberação de TSH é realizado pelo TRH (hormônio liberador de tirotropina) (DEGITZ et al., 2005) mas, em girinos, o CRH (hormônio liberador de

corticotropina) é o principal sinal hipotalâmico responsável pela estimulação do TSH (OKADA et al., 2007).

Durante o período de pré-metamorfose (estágio 25 de Gosner), o cérebro exerce pouco ou nenhum controle sobre as funções adeno-hipofisárias, visto que a eminência média do hipotálamo ainda não está desenvolvida. Assim, nesse período a secreção de prolactina é alta e a de TSH é baixa, ocorrendo o crescimento e o desenvolvimento dos girinos, mas sem qualquer diferenciação de órgãos e tecidos. No final da pré-metamorfose a secreção de TSH começa a aumentar e a de prolactina a reduzir (Figura 2) (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

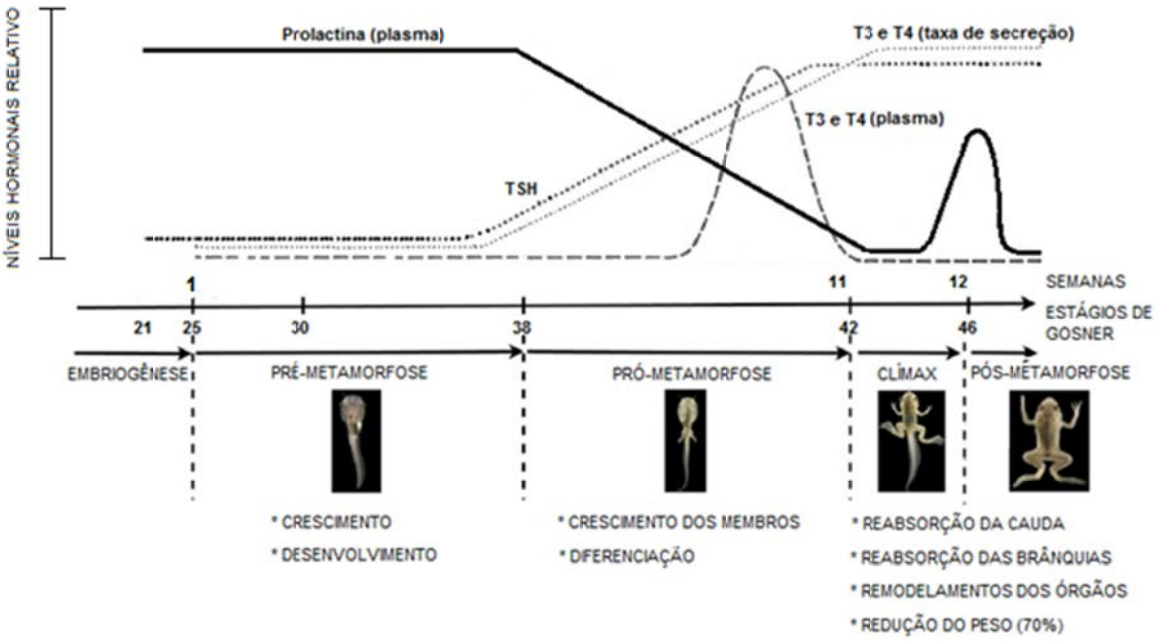

Figura 2. Esquema de eventos e níveis hipotéticos de hormônios da pituitária e da tireóide em rãs-touro durante a metamorfose. Adaptação: DUELLMAN & TRUEB (1994) e BROWN & CAI (2007).

No inicio da pró-metamorfose (estágio 38 de Gosner), a secreção de TH é alta, devido a estimulação do TSH, mas ainda não se reflete no plasma, provavelmente em função da rápida eliminação do TH nessa fase inicial. No final da pró-metamorfose, o aumento continuo do TH e a consequente saturação dos sítios de ligação nos tecidos, resulta no seu aparecimento no plasma. A elevação dos níveis de TH promovem o desenvolvimento da eminência média e o estabelecimento da conecção entre hipotálamo e adenohipófise. Enquanto o controle hipotalâmico sobre a pituitária se desenvolve, os níveis circulantes de prolactina diminuem progressivamente. No final da pró-metamorfose, os níveis

plasmáticos de TH encontram-se no seu ponto máximo e os de prolactina bastante reduzidos (11º semana), o que leva a completa transformação dos girinos em imagos (clímax, 12º semana) (Figura 2) (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Pesquisas demonstraram a eficácia do uso de esteróides (corticosterona e estradiol) como moduladores dos hormônios da tireóide (GRAY & JANSSEN, 1990; HAYES, 1995a; HAYES, 1995b; HAYES, 1997). Todavia, devido aos efeitos negativos destes compostos como: desmasculinização e alterações gonadais, em machos (McCOY et al., 2008; HAYES et al., 2011); hermafroditismo, redução do tamanho normal dos testículos, comprometimento do funcionamento normal das células de Leydig, redução de quantidade e qualidade de espermatozoides (LATHERS, 2002; WITORSCH, 2002); alterações na diferenciação gonadal em larvas (MACKENZIE et al., 2003); diminuição da taxa de crescimento e depressão da resposta imunológica (SAPOLSKY, 2002), surge a necessidade de novas pesquisas, utilizando substâncias menos invasivas e poluentes.

A tiouréia (CSN2H4), também conhecida como isotiouréia ou pseudotiouréia, é um composto sólido, solúvel em água e etanol, com uma ampla aplicação em diversos setores industriais (têxtil, de imagem, produtos de limpeza e explosivos) e farmacêuticos (sulfatiazóis, tiouracilos, tetramisole e cefalosporinas) (International Agency for Research on Cancer- IARC, 2012).

Pertencente a uma classe de drogas comumente utilizadas para o tratamento de hipertireoidismo, a tiouréia (TU) age por meio da inibição da peroxidase tireoidiana que resulta na redução da produção dos hormônios da tireóide e aumento da secreção de hormônio estimulante da tireóide (TSH) pela pituitária. O aumento dos níveis de TSH leva a hipertrofia, hiperplasia e hiperemia da tireóide e liberação de colóides intrafoliculares. Assim, os efeitos goitrogênicos da tiouréia (inibição da síntese e liberação dos hormônios da tireóide) são resultado, principalmente, da estimulação da pituitária do que devido à ação direta da droga (DENT & LYNN, 1958; IARC, 2012).

A ação de disruptores endócrinos, compostos orgânicos capazes de interferir no sistema endócrino, sobre a função normal da glândula tireóide pode afetar de forma permanente o sistema reprodutivo de anfíbios (GOLEMAN et. al., 2002), uma vez que os hormônios tireoidianos têm se revelado de fundamental importância nas etapas iniciais do processo de diferenciação gonadal (FLOOD et

al., 2013). Além disso, evidências recentes mostram que os hormônios tireoidianos também regulam a biossíntese de andrógenos através da regulação gênica das enzimas envolvidas nesta via bioquímica (FERNANDINO et al., 2012).

Relatos na literatura, demonstram que a deficiência dos hormônios da tireóide durante a fase larval, em *Xenopus laevis*, inibem o desenvolvimento de características secundárias em machos, como por exemplo, dos músculos da laringe, importantes para a vocalização (ROBERTSON & KELLEY, 1996). Esta por sua vez desempenha inúmeras funções comportamentais importantes associadas a reprodução, socialização e desfesa de território (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Kurian e Saidapur (1985) avaliaram os efeitos da tiouréia (25µg de TU) na atividade espermatogênica de *Rana tigerina* e relataram que este composto afeta de forma severa a espermatogênese desses animais. Segundo os autores, o funcionamento normal da glândula da tireóide é essencial para a espermatogênese de rãs.

Todavia, van der Ven et al. (2006), ao avaliarem os efeitos de propiltiouracila (PTU) no ciclo de vida de *Danio rerio* (zebrafish) expostos por 21 dias a 1, 10 e 100 mg/L verificaram que, nas concentrações avaliadas a PTU não apresentou riscos à vida ou à reprodução dos animais uma vez que, não foram observadas reduções na taxa de sobrevivência, fertilização e desova. A PTU ($C_7H_{10}N_2OS$) é um composto semelhante à tiouréia que atua também sobre a peroxidase tireoidiana inibindo a síntese dos hormônios da tireóide (KLOAS, 2002).

Trabalhos utilizando diferentes concentrações de TU, em diferentes fases de desenvolvimento, têm demonstrado a sua eficiência goitrogênica sem consequência a vida do animal. Swapna et al. (2006), investigando os efeitos da redução dos hormônios da tireóide no sistema reprodutivo de machos de *Clarias gariepinus (catfish)*, durante o período de recrudescência testicular, determinaram que para essa espécie e nas condições por eles avaliadas, a concentração de 0,03% de tiouréia é suficiente para a inibição da glândula tireóide.

Degitz et al. (2005) compararam três diferentes disruptores do eixo da tireóide sendo estes, o metimazole (controle; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L), 6-propiltiouracil (PTU) (controle; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/L) e tiroxina (T_4) (0,25; 0,5;

1; 2 e 4 mg/L) nos estágios larvais pré e pós-metamórficos de *Xenopus laevis.* Os autores relataram que tanto o metimazole quanto a PTU induziram a redução do desenvolvimento larval (relação dose-dependente), enquanto que, o tratamento com T_4 resultou em aumento da taxa de desenvolvimento.

Em humanos, a tiouréia é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal e eliminada quase que completamente do sangue após 24 horas da administração, sendo que, 15% a 20% são degradados no intestino, 30% a 50% em outros tecidos e fluidos corporais, e o restante (cerca de 30%) na urina (WILLIAMS & KAY, 1947). A administração oral de uma única dose de tiouréia (30 mg/kg de peso) foi completamente eliminada, via urina, após 48 horas de sua administração, com o pico de concentração após 30 minutos de sua administração (ZIEGLER-SKYLAKAKIS et al., 2003).

Ao se avaliar a meia vida da tiouréia em ratos foi verificado que após 3 horas da administração intravenosa de 5mg da droga, apenas 30% do composto foi encontrado na carcaça e após 25 horas, apenas traços foram encontrados (WILLIAMS & KAY, 1947).

Em função da baixa toxicidade tanto para animais quanto para o meio ambiente, da facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal, eliminação pelos tecidos e urina, e do grande potencial de inibição da síntese dos hormônios da tireóide, a administração da tiouréia se torna uma alternativa viável para o estudo de novas técnicas visando retardar o processo de metamorfose obtendo-se imagos de boa qualidade, ou seja, animais maiores, o que facilita o arraçoamento, e saudáveis, com menor predisposição a doenças.

Com base nessas informações, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o uso de um composto goitrogênico, a tiouréia, no desenvolvimento de animais pré-metamórficos, com a finalidade de se obter imagos de boa qualidade e avaliar os possíveis efeitos sobre os animais pós-metamórficos. Este trabalho foi divido em dois capítulos, na forma de artigos científicos. O primeiro intitulado “Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)” e o segundo “Adição de tiouréia na alimentação de girinos afeta o desempenho de rã-touro?”.

Referências

ABRANTES J and SEIXAS FILHO JT 2007. A parceria entre Universidade, Governo e Empresa, aplicada ao aumento da produtividade da ranicultura, no Estado do Rio de Janeiro. Centro Universitário Augusto Motta – UNISUAM. 10p.

ATKINSON B, WARKMAN A and CHEN Y 1998. Thyroid hormones induces a reprogramming of gene expression in the liveer of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles. Wound Repair and Regeneration 6, 323-337.

BERVEN K and GILL D 1983. Interpreting geographic variation in life-history traits. American Zoologist 23, 85-97.

BRAGA LGT and LIMA SL 2001. Influência da temperatura ambiente no desempenho de rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. Revista Brasileira de Zootecnia 30, 1659-1663.

BROWN D and CAI L 2007. Amphibian metamorphosis. Developmental Biology 306, 20-33.

CARR JÁ and PATIÑO R 2011. The hypothalus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. General and Comparative Endcrinology 17*0*, 299-312.

CARRARO KC 2008. Ranicultura: um bom negocio que contribui para a saúde. Revista FAE 11, 111-118. Retrieved January 03, 2012 from http://www.fae.edu/publicacoes/pdf/revista_da_fae/fae_v11_n1/10_karen.pdf.

CRIBB AY 2009. Projeto para fortalecer a ranicultura na região sudeste. Embrapa Agroindústria de Alimentos. 2009. Retrieved January 03, 2012 from http://agronegociar.com/pecuaria/30502-projeto-para-fortalecer-a- ranicultura-na-regiao-sudeste.html

DEGITZ SJ, HOLCOMBE GW, FLYNN KM, KOSIAN PA, KORTE JJ and TIETGE JE. 2005. Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. Toxicological Sciences 87, 353–364.

DENT LM and LYNN WG 1958. A comparison of the effects of goitrogens on thyroid activity in *Triturus viridescens* and *Desmognathus fuscus*. Biological Bulletin 115, 411-420.

DODD M, DODD J and LOFTS B 1976. The biology of metamorphosis. In: Physiology of Amphibia (ed. B. LOFTS) pp. 467-599. Academy Press, New York, USA.

DUELLMAN W E and TRUEB L 1994. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MA, USA.

DUNN JT and DUNN AD 2001. Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyroid 11, 407-414.

FERNANDINO J, HATTORI R, KISHII A, STRUSSMANN C and SOMOZA G 2012. The cortisol and androgen pathways cross talk in heigh temperature-induced masculinization: The 11β-hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. Endocrinology 153, 6003-6011.

FIGUEIREDO MRC, LIMA SL, AGOSTINHO CA, BAÊTAS FC and WEIGERT SC 2001. Estufas climatizadas para experimentos ambientais com rãs, em gaiolas. Revista Brasileira de Zootecnia 30, 1135-1142.

FLOOD D, FERNANDINO J and LANGLOIS V 2013. Thyroid hormones in male reproductive development: Evidences for direct crosstalk between the androgen and thyroid axes. General and Comparative Endocrinology 192, 2-14.

FORT D, TIETGE J and TOUART L 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HTP) axis in frogs and its role in frog development and reproduction. Critical Review in Toxicology 37, 117-161.

FOX H 1984. Amphibian Morphogenesis. Humana Press, New Jersey, USA.

GIACOMA C, ZUGOLARO C and BEANI L 1997. The advertisement calls of the green toad (*Bufo viridis*): variability and role in mate choice. Herpetologica 53, 454–464.

GRAY K and JANSSEN P 1990. Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles *in vivo*, but not *in vitro*. General and Comparative Endocrinology 77, 202-211.

GRZIMEK B 2003. Amphibians. In Grzimek's animal life encyclopedia vol. 6 (ed. M Hutchins, WE Duellman, N Schlager), pp. 1-507. Gale Group, Farmington Hills, MI, USA.

GUIMARÃES LD and BASTOS RP 2003. Vocalizações e interações acústicas em *Hyla raniceps* (Anura Hylidae) durante a atividade reprodutiva. Iheringia Série Zoologia 93,149-158.

HADDAD CFB, GIOVANELLI JGR and ALEXANDRINO J 2008. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. In Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil (ed. MS Buckeridge), pp. 195-206. Rima Editora, São Carlos, SP, Brazil.

HAYES TB 1995a. An histological examination of the effects of corticosterona in larvae of the western toad, *Bufo boreas* (Anura: Bufonidae), and the oriental fire-bellied toad, *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). Journal of Morphology 226, 297-307.

HAYES TB 1995b. Interdependence of corticosterona and thyroid hormones in larval growth and development in western toad (*Bufo boreas*). I. Thyroid hormone dependent and independent effects of corticosterona on growth and development. Journal of Experimental Zoology 271, 95-102.

HAYES TB 1997. Steroid modulator oh thyroid hormone activity. American Zoologist 37, 185-194.

HAYES TB, ANDERSONB LL, BEASLEYC VR, SOLLA SR, IGUCHIE T, INGRAHAM H, KESTEMONT P, KNIEWALD J, KNIEWALD Z, LANGLOIS VS, LUQUE E H, MCCOY, KA, MUÑOZ-DE-TORO M, OKA T, OLIVEIRA CA, ORTON F, RUBY S, SUZAWA M, TAVERA-MENDOZA LE, TRUDEAU VL, COSTA ABV and WILLINGHAM E 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 127, 64-73.

IARC 2012. International Agency for Research on Cancer 2012. Retrieved May 03, 2012 from http://www.iarc.fr

IPCC 2002. International Panel on Climate Change 2002: Climate Change and Biodiversity. Retrieved April 03, 2015.

IPCC 2014. International Panel on Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Retrieved April 03, 2015.

KANAMORI A and BROWN DD 1996. The analysis of complex developmental programmes: amphibian metamorphosis. Genes Cells 1, 429-435.

KLOAS W 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. International Reviews of Cytology 216, 1-35.

KRUHØFFER M, GLASS ML, ABE AS and JOHANSEN K 1987. Control of breathing in an amphibian *Bufo paracnemis*: effects of temperature and hypoxia. Respiration Physiology 69, 267-275.

KURIAN T and SAIDAPUR SK 1985. Effect of thiourea on chorionic gonadotrophin (hCG) induced spermatogenesis in the frog *Rana tigerina* during the postbreeding regression phase. Current Science 54, 1251-1253.

LATHERS CM. 2002. Endocrine Disruptors: A new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. The Journal of Clinical Pharmacology 42, 7-23.

LIMA SL 2005. Situação atual e perspectiva da ranicultura. Panorama da aquicultura 15, 32-34.

LINGNAU R and BASTOS R 2007. Vocalizations of the Brazilian torrent frog *Hylodes heyeri* (Anura: Hylodidae): Repertoire and influence of air temperature on advertisement call variation. Journal of Natural History 41, 1227–1235.

MACKENZIE CA BERRILL M, METCALFE C and PAULI BD 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2466–2475.

MANN F and HOLT C 2001. Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. BioEssays 23, 319-326.

McCOY KA, BORTNICK LJ, CAMPBELL CM, HAMLIN HJ, GUILLETTE JR and MARY C 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. Environmental Health Perspectives 116, 1526–1532.

NAVAS CA and BEVIER CR 2001. Thermal dependency of calling performance in the eurythermic frog *Colostethus subpunctatus*. Herpetologica 57, 384-395.

NEWMAN RA 1998. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. Oecologia 115, 9-16.

OKADA R, MILLER M, YAMAMOTO K, De GROEF B, DENVER R and KIKUYAMA S 2007. Involvement of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor in CRF-induced thyrotropin release by the amphibian pituitary gland. General and Comparative Endocrinology 150, 437-444.

PANDIAN T and MARIAN M 1985. Predicting anuran metamorphosis and energetics. Physiology and Zoology 58, 538-552.

PARIS M and LAUDET V 2008. The history of a developmental stage: metamorphosis in chordates. Genesis 46, 657-672.

RAFFEL TR, ROHR JR, KIESECKER JM and HUDSON PJ 2006. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. Functional Ecology 20, 819–828.

ROLLINS-SMITH L 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. Immunology Review 166, 221-230.

SALVIANO ATM, BATISTA ES and MOREIRA RT 2007. Perfil do consumidor da carne de rã (*Rana catesbeiana*) e produtos derivados. II Jornada Nacional da Agroindustria. 2007. Retrieved January 03, 2012 from http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados/2jornada/02ciencia_e_tecnologia_de_alimentos/39cta.pdf.

SANTOS AJG, MELO CL and MACEDO PB 2008. Efeitos do fotoperíodo e temperatura no crescimento de girinos da rã-touro gigante. Revista Brasileira de engenharia da Pesca 3, 92-99.

SAPOLSKY RM 2002. Endocrinology of the stress-response. In: Behavioral endocrinology (ed. JB BECKER, SM BREEDLOVE, D CREWS, MM McCARTHY), pp. 409-450. The MIT Press, London, UK.

SMITH-GILL SJ and BERVEN KA 1979. Predicting Amphibian Metamorphosis in the American Naturalist (ed. JL BRONSTEIN, S KALISZ), pp. 563-585. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

SULLIVAN BK and MALMOS KB 1994. Call variation in the Colorado river toad (*Bufo alvarius*): behavioral and phylogenetic implications. Herpetologica 50, 146–156.

SWAPNA I, RAJASEKHAR M, SUPRIYA A, RAGHUVEER K, SREENIVASULU, G, RASHEEDA MK, MAJUMDAR KC, KAGAWA H, TANAKA H, DUTTA-GUPTA A and SENTHILKUMARAN B 2006. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A 144, 1–10.

TRUEB L and HANKEN J 1992. Skeletal development in *Xenopus laevis*. Journal of Morphology 214, 1-41.

van der VEN LTM, van der BRANDHOF E, VOS JH, POWER DM and WESTER P W 2006. Effects of the antithyroid agent propylthiouracil in a partial life cycle assay with Zebrafish. Environmental Science and Technology 40, 74-81.

VIZOTTO LD 1981. Produção de girinos. In Proceeding of ABRAQ (Simpósio Brasileiro sobre Aquicultura) and 20th ABCR (Encontro Nacional de Ranicultores), Brasília, DF, Brazil, pp. 125-152.

WASSERSUG R 1975. The adaptative significance of the tadpole stage with comments on the maintenance fo complex life cicle in anurans. American Zoologist 15, 405-407.

WEBER R 1996. Switching of globim genes during anuran metamorphosis. In: Metamorphosis (ed. : L. GILBERT, J. TATA, B. ATKINSON) pp. 567-597. Academy Press, New York, USA.

WILLIAMS RH and KAY GA 1947. Thiouracils and thioureas: Comparisons of the absortion, distribution, destruction and excretion. Archives International Medicine 80, 37-52.

WITORSCH RJ 2002. Endocrine disruptors: Can biological effects and environmental risks be predicted? Regulatory Toxicology and Pharmacology 36, 118-130.

ZIEGLER-SKYLAKAKIS K, KIELHORN J, KÖNNECKER G, KOPPENHÖFER J and MANGELSDORF I 2003. Thiourea. World Healt Organization, Geneva, Switzerland.

Artigo 1 - Tiouréia no desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

A.E. Takamura[1], M.A. Oliveira[1a], C.F.M. Mansano[1] and M.V. De Stéfani[1]

[1]*Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14883-900, Jaboticabal, SP, Brazil*

[a]*Present adress: Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – campus Botucatu, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil*

Corresponding author: Angela Emi Takamura. E-mail: emitakamura@gmail.com

Normas de referência, de acordo com o periódico "Animal".

Resumo

A tiouréia é um potente disruptor endócrino capaz de alterar os níveis circulates dos hormônios da tireóide. O presente estudo avaliou os efeitos da tiouréia (TU) sobre o desenvolvimento de girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), por meio do peso, crescimento, deposição de nutrientes corporais e análises morfológicas da glândula tireóide. Foram utilizados 7200 girinos, distribuídos em 12 caixas (500L), alimentados por 30 dias, com ração contendo 27% de proteína digestível e 0, 3, 5, 7 mg de TU/kg de ração. Após esse período, os animais receberam apenas ração sem TU até atingirem o clímax de metamorfose. A cada 15 dias, uma amostragem (± 35 g) foi retirada para análise dos nutrientes corporais e morfologia da tireóide e, mensalmente, uma amostragem de 10% dos animais foi pesada e medida individualmente. Os animais tratados com 7 mg TU/kg de ração apresentaram maior peso e maior comprimento total e parcial. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos avaliados quanto à composição corporal. A deposição de nutrientes corporais, obtida durante o período experimental, encontra-se de acordo com o crescimento normal de girinos de rã-touro. A área da glândula tireóide foi maior nos animais tratados com 7 mg TU/kg de ração. A tiouréia pode ser utilizada na alimentação de girinos de rã-touro visando o maior crescimento dos mesmos, sem alterar a deposição de nutrientes corporais. Nas condições utilizadas neste trabalho, o uso de 7 mg TU/kg de ração, por um período de 30 dias, apresentou melhores resultados com relação a crescimento e ganho de peso.

Palavras-chave: composto goitrogênico, glândula tireóide, metamorfose

Abstract

Thiourea is a potent endocrine disruptor able to alter circulates levels of the thyroid hormones. This study evaluated the effects of thiourea (TU) on the development of bullfrog's tadpoles (*Lithobates catesbeianus*), by measurements of weight, growth, nutrients deposition on body and analyzes of the thyroid gland morphology. 7200 tadpoles were distributed in 12 boxes (500L), fed for 30 days with diets containing 27% of digestible protein and 0, 3, 5, 7 mg TU/kg of feed. After this period, animals received only diet without TU until they reach the metamorphosis climax. Every 15 days, a sampling (± 35 g) was removed for analysis of body nutrients and thyroid morphology and monthly a sampling of 10% of the animals was weighed and measured individually. At the end of this period, the animals treated with 7 mg TU/kg of feed showed greater weight and higher total and partial length. There were no significant differences among the treatments for body composition. The deposition of nutrients in the body obtained during the experimental period is in accordance with the normal growth of bullfrog tadpoles. The area of the thyroid gland was greater in animals treated with 7 mg TU/kg of feed. The thiourea can be used in bullfrog tadpole's feed aiming at further growth thereof, without changing the body's nutrient deposition. Under the conditions used in this study, using 7 mg of TU per kg of feed for a period of 30 days, showed the best results with respect to growth and weight gain.

Keywords: goitrogenic compound, thyroid gland, metamorphosis

1. Introdução

Estudos têm apresentado evidências de que um grande número de espécies têm sido e serão afetadas pela rápida alteração da temperatura (TOMAS et al., 2004), e supõe-se que essas alterações afetem principalmente os animais ectotérmicos, em função de sua dependência fisiológica e comportamental às condições de temperatura do ambiente (ROME et al., 1992; LIPS et al., 2006; POPESCU & GIBBS, 2009). Dentre essas alterações podemos citar: antecipação da reprodução (READING, 1998), diminuição da fertilidade em função da redução do tamanho corporal (READING, 2007) e menor produção de ovos e larvas (GALLOY & DENOËL, 2010).

Projeções climáticas para os próximos 100 anos preveem um aumento acelerado na temperatura global, com aumentos previstos de 1,4°C a 5,8°C, para o ano de 2100 (IPCC, 2014).

A temperatura é um dos principais fatores externos responsável pelo desenvolvimento e duração do período larval (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Embora o aumento da temperatura acelere a taxa de crescimento e desenvolvimento dos girinos no clímax da metamorfose, o resultado frequentemente obtido são imagos menores e mais susceptíveis a doenças (KLOAS, 2002), o que leva ao aumento da mortalidade e do tempo necessário para a engorda dos animais.

A adição de compostos goitrogênicos (inibidores da tireóide) na alimentação de girinos, mantidos em ambientes com temperatura de conforto pode levar a obtenção de girinos maiores e mais resistentes e, consequentemente, imagos maiores, reduzindo a taxa de óbito e o tempo necessário para a engorda dos animais se alimentados de forma adequada.

O hormônio estimulante da tireóide (TSH) é o principal hormônio regulador do crescimento e da função da glândula tireóide (DUMONT *et al*., 1992; VASSART & DUMONT, 1992). Em resposta à estimulação do TSH, o tecido tireoidiano, de todos os vertebrados, produz e libera os hormônios da tireóide (TH), tiroxina (T4) e 3,5,3'–triiodotironina (T3), que desempenham um papel importante no desenvolvimento, crescimento e metabolismo geral (LEATHERLAND, 1982; SHI, 1999; YEN, 2001, McNABB, 2007).

Em anfíbios anuros, o TH desempenha papel fundamental no desenvolvimento metamórfico, regulando diversos processos associados a modificações de órgãos e tecidos, durante as transformações que ocorrem na transição da fase larval para fase adulta (SHI, 1999; FURLOW & NEFF, 2006).

Apesar de pesquisas demonstrarem a eficácia do uso de estereóides (corticosterona e estradiol) como moduladores dos hormônios da tireóide (GRAY & JANSSEN, 1990; HAYES, 1995a; HAYES, 1995b; HAYES, 1997), vários efeitos negativos foram observados: regressão do sistema imune larval (corticosterona), hipertrofia da glândula da tireóide (HAYES, 1997) e poluição dos recursos hídricos (estradiol) (REIS FILHO et al., 2006), surgindo a necessidade de novas pesquisas, utilizando substâncias menos invasivas e poluentes.

A tiouréia (TU) é um composto solúvel em água, facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal, de rápida eliminação pelos tecidos e urina e com grande potencial para inibição da síntese de hormônios da tireóide. Como na maioria dos disruptores endócrinos, a TU altera os níveis circulantes de TH por meio da inibição da atividade da peroxidase da tireóide, responsável pela iodação de resíduos de tirosina (organificação do iodo), que resultam na formação de T3 e T4 (KANKI & WAKAHARA, 2000; KLOAS, 2002).

Em humanos, a TU é eliminada quase que completamente, do sangue, após 24 horas da administração, sendo 15% a 20% degradados no intestino, 30% a 50% em outros tecidos e fluidos corporais e o restante na urina (WILLIAMS & KAY, 1947).

Em função dessa baixa toxicidade e grande potencial goitrogênico, devidamente comprovada em estudos anteriores, o uso da tiouréia na alimentação durante a fase larval pode induzir um retardo no clímax de metamorfose, permitindo um maior desenvolvimento e crescimento dos girinos, obtendo-se assim imagos maiores e mais saudáveis, reduzindo a mortalidade e a morbidade dos animais e, possivelmente, o tempo de engorda e os custos de produção.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de TU no desenvolvimento de girinos de rã-touro, por meio da avaliação do crescimento e ganho de peso, deposição de nutrientes corporais e análise morfológica da glândula tireóide.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Setor de Ranicultura, por um período de 90 dias, com início na quarta semana de janeiro e término na terceira semana de abril.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, (Protocolo nº 019715/14) e, foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1. Delineamento experimental e amostragens

Foram utilizados 7.200 girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 26 de Gosner (1960), procedentes de uma mesma desova, oriundos da Ranicultura Ranamat, Matão, SP. Os animais foram alojados em 12 caixas de fibrocimento, com capacidade de 500L, na densidade inicial de 1,2 girinos/L, com abastecimento em linha, com entrada individual e fluxo contínuo proveniente de poço artesiano e escoamento superficial. Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação às instalações e à alimentação antes do início do experimento. O peso médio, comprimento total e comprimento parcial e respectivos desvios padrões foram, respectivamente, 0,019 ± 0,004 g; 10,76 ± 0,72 mm; 4,38 ± 0,35 mm.

Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos (0, 3, 5 e 7 mg de TU/kg de ração) e três repetições.

As caixas foram sifonadas semanalmente para retirada de fezes e da ração não consumida, contribuindo com a manutenção da qualidade da água, que foi monitorada semanalmente avaliando os seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido (oxímetro YSI linha profissional), pH (peagâmetro pH-100-PHTEK) e condutividade elétrica (condutivímetro CD-203-PHTEK). A temperatura da água

nas caixas foi aferida diariamente, duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde (termômetro digital Incoterm).

Os valores médios observados durante o período experimental para os parâmetros físicos e químicos da água foram: pH 7,43 ± 0,08; condutividade 184,15 ± 9,21 µS/cm; O_2D 5,5 ± 0,78 mg/L e temperatura no período da manhã de 29,7 ± 3,26°C e no período da tarde de 31,9 ± 2,78°C.

Os girinos foram alimentados com dieta farelada contendo 27% de proteína digestível e 3676 kcal/kg de energia digestível (Tabela 1), três vezes ao dia, evitando-se sobras, de forma que a quantidade oferecida foi considerada a consumida (SOLOMON & TARUWA, 2011).

Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição nutricional da dieta utilizada

Ingredientes	(%)
Farinha de peixes	15,5
Farinha de vísceras de aves	12,5
Farelo de soja	17,3
Milho	31,0
Farelo de trigo	15,0
Amido	6,6
Óleo de soja	1,6
Suplemento mineral e vitamínico[1]	0,48
Bht	0,02
Proteína digestível[2] (%)	27
Energia digestível[2] (kcal kg^{-1})	3676
Matéria mineral (%)	7,8
Extrato etéreo (%)	9

[1]Umidade (%) 2,0, Cinzas (%) 71,6442, Vitamina A (min) 35.000 U.I., Vitamina D3 (min) 2.000 U.I., Vitamina E (min) 120 U.I., Vitamina K3 (min) 800 mg, Ácido Fólico (min) 10 mg, Biotina (min) 10 mg, Tiamina, B1 (min) 25 mg, Riboflavina, B2 (min) 35 mg, Piridoxina, B6 (min) 40 mg, Vitamina B12 (min) 100 mg, Niacina (min) 350 mg, Ácido Pantotênico (min) 150 mg, Colina (min) 2.500 mg, Cobre (min) 25 mg, Ferro (min) 150 mg, Manganês (min) 75 mg, Selênio (min) 1 mg, Zinco (min) 140 mg, Mananoligossacarídeo (min) 60 mg.
[2]Valores calculados a partir do coeficiente de digestibilidade por Secco et al. (2005).
Fonte: Pinto (2014).

Nos 30 primeiros dias (Fase 1), a alimentação consistiu dos quatro tratamentos citados anteriormente (0, 3, 5 e 7 mg de TU/kg de ração). A tiouréia, previamente processada em moinho de bola, foi adicionada a ração durante seu preparo e, em seguida, homogeneizada.

Após 30 dias, todos os animais passaram a consumir apenas ração sem adição de tiouréia, até atingirem o clímax da metamorfose (Fase 2).

Mensalmente, 10% dos girinos de cada caixa experimental foram, individualmente, pesados (balança eletrônica digital) e medidos (paquímetro digital) para obtenção do peso médio, comprimento total (início da cabeça até o final da cauda) e o comprimento parcial (início da cabeça até inserção da cauda) (Figura 1).

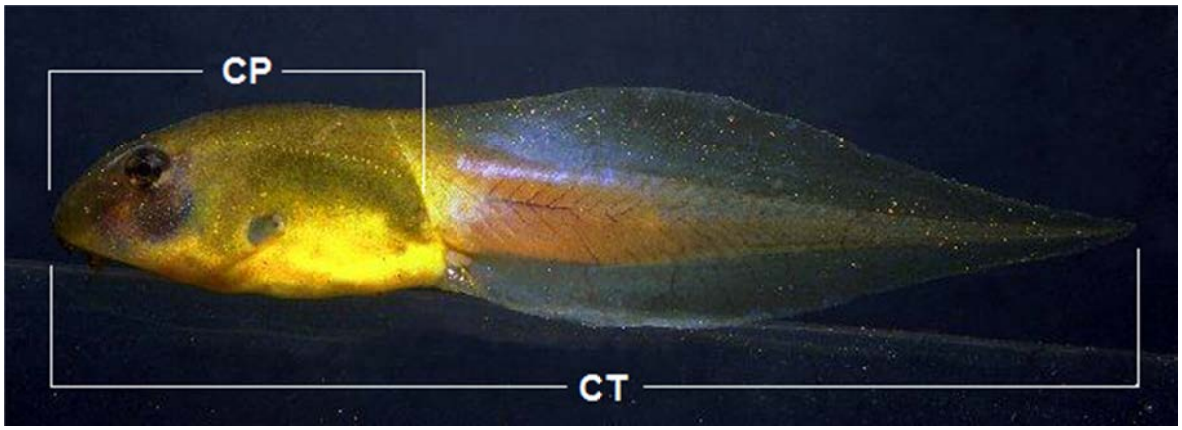

Figura 1. Vista lateral do corpo de girinos indicando as marcações para mensuração do animal. CP= comprimento parcial; CT= comprimento total.

No início e em seguida quinzenalmente, uma amostragem dos girinos, com aproximadamente 35 g de peso vivo, foi abatida para análise de composição corporal (proteína bruta, extrato etéreo, matéria seca e cinzas).

Os girinos amostrados foram colocados em recipientes com gelo para insensibilização e posteriormente eutanasiados (imersão em solução de benzocaína, 10%). Em seguida, foi realizada abertura da cavidade celomática-visceral para esvaziamento do conteúdo do trato gastrointestinal. Os animais foram, então, acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados e congelados para o processamento posterior e obtenção das amostras laboratoriais para determinação da composição corporal.

Além dos girinos amostrados citados anteriormente, mais três animais por tratamento foram coletados ao acaso em intervalos de 15, 30 e 45 dias do início do experimento para análises morfológicas da glândula tireóide.

2.2. Processamento das amostras e análises laboratoriais

Para análise da composição corporal, os girinos congelados foram moídos em processador de alimentos para obtenção de amostras homogêneas, e acondicionadas em placas de Petri de plástico descartável para posterior liofilização a -50°C, em equipamento Thermo VLP200, para obtenção da matéria pré-seca. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho de bola e encaminhadas ao laboratório para análises de proteína, por meio do método de Dumas em aparelho Leco 528 LC (ETHERIDGE et al., 1998); extrato etéreo por meio do extrator Ankom XT-15 (Ankon Technology, Macedon, NY), utilizando o éter como solvente; cinzas por incineração em mufla a 550°C; e a matéria seca por meio de secagem em estufa a 105°C, por 12 horas.

Para análise morfológica da glândula tireóide (Figura 2), os girinos foram sacrificados e fixados inteiros em solução de Karnovsky, descalcificados (EDTA 0,25M) e incluídos em historesina. Secções longitudinais de 5µm de espessura foram realizadas em série, a partir da porção dorsal para ventral. Em seguida, os cortes foram corados com solução de azul de toluidina. Para cada girino, cinco secções da porção mediana da tireóide foram avaliadas, por tratamento, quanto aos seguintes parâmetros: tamanho geral da glândula tireóide (aumento ou redução da área), tamanho (perímetro) e formato (regular, irregular, uniforme ou não) dos folículos, área luminal do folículo, formato das células foliculares (cubóide, colunar ou achatado), estrutura do epitélio (única camada de células ou estratificada com formação de múltiplas camadas) e altura das células foliculares. Os perímetros, áreas e alturas foram obtidos com o auxilio do software Image J 1.49 (National Institute of Health (NHI), Bethesda, Maryland, USA, http//:imagej.nih.gov/ij).

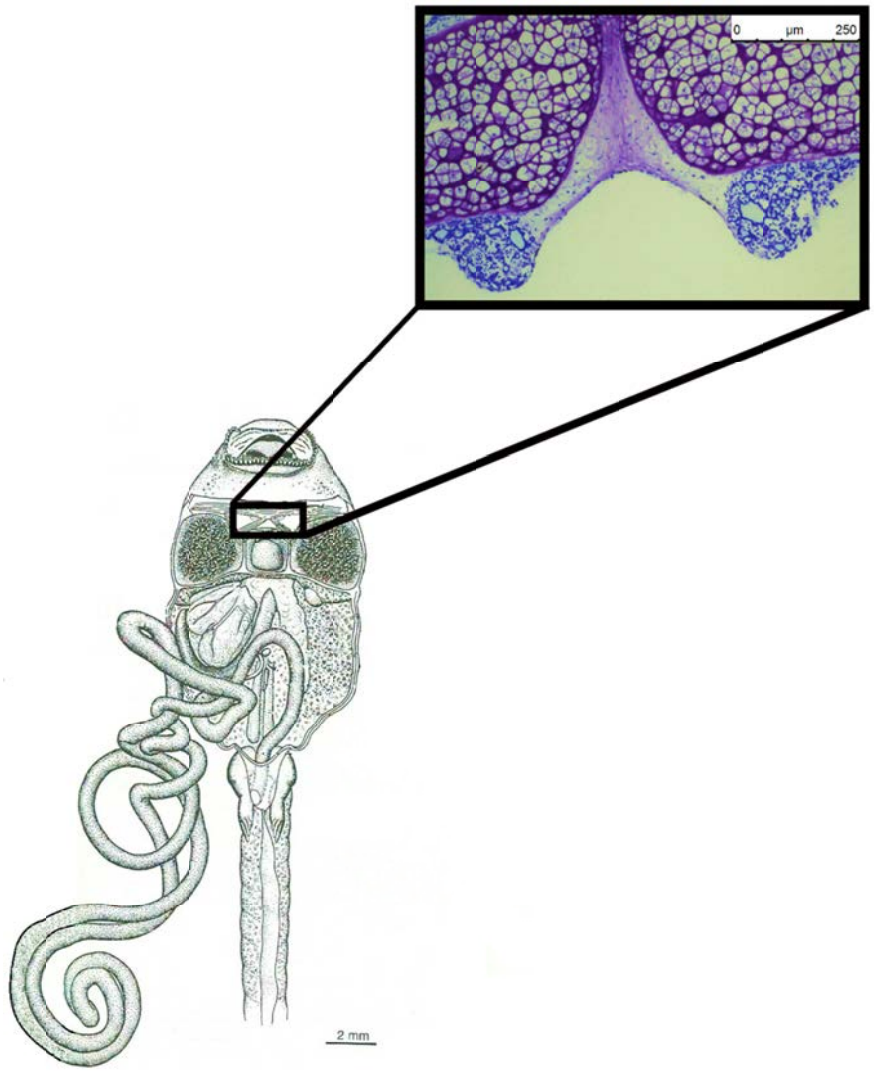

Figura 2. Visão geral da cavidade celomática de girino de rã-touro com ampliação da glândula tireóide (corte ventral). Adaptação: McDIARMID & ALTIG (1999).

2.3. Análises estatísticas

Os dados obtidos inicialmente foram analisados quanto à normalidade e, de acordo com os resultados, procedeu-se a análise de variância e os testes de comparação entre médias (paramétricos e não paramétricos). Os resultados apresentados estão expressos através de média ± EP (erro padrão). Comparações entre as médias (entre e dentro dos diferentes grupos) foram realizadas utilizando two-way ANOVA ou one-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni ($p<0,05$), para dados paramétricos e pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn. Os softwares SAS 9.0 e

Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, http://www.graphpad.com) foram utilizados para todas as análises estatísticas.

3. Resultados e Discussões

3.1. Crescimento e ganho de peso

Em geral, o crescimento de girinos pode ser dividido em duas fases: na primeira observa-se o máximo de crescimento e o mínimo de desenvolvimento (passagem da embriogenese para a fase larval) e na segunda, pequeno crescimento e significativo desenvolvimento (metamorfose) (ALTIG & McDIARMID, 1999).

Ao longo do experimento os animais tratados com 7 mg TU/kg de ração apresentaram maior comprimento parcial (CP) (Figura 3A). Após 30 dias do início do experimento, os animais do tratamento controle (T_0) apresentaram o menor CP, seguido pelo T_2, com diferença de 19% e 17% com relação a T_3, respectivamente (Figura 3A).

Aos 60 dias, embora não tenham sido observadas diferenças significativas com relação ao CP entre os girinos dos tratamentos T_3 e T_0 e, entre T_3 e T_1, pelo teste de Bonferroni ($p>0,05$), os girinos de T_0 e T_1 apresentaram CP 3% menor do que o obtido em T_3 (Figura 3A).

Na última mensuração (Figura 3A), diferenças significativas foram observadas entre todos os tratamentos avaliados. Os girinos que não receberam tiouréia (T_0) apresentaram o menor CP (30,51 mm), uma diferença de 7% em relação ao CP dos girinos do tratamento T_3, que obteve o maior CP.

Com relação ao comprimento total (CT), diferenças significativas entre os tratamentos foram observados aos 30 e 60 dias (Figura 3B), sendo que os animais que receberam 7 mg TU/kg de ração apresentaram os maiores comprimentos totais.

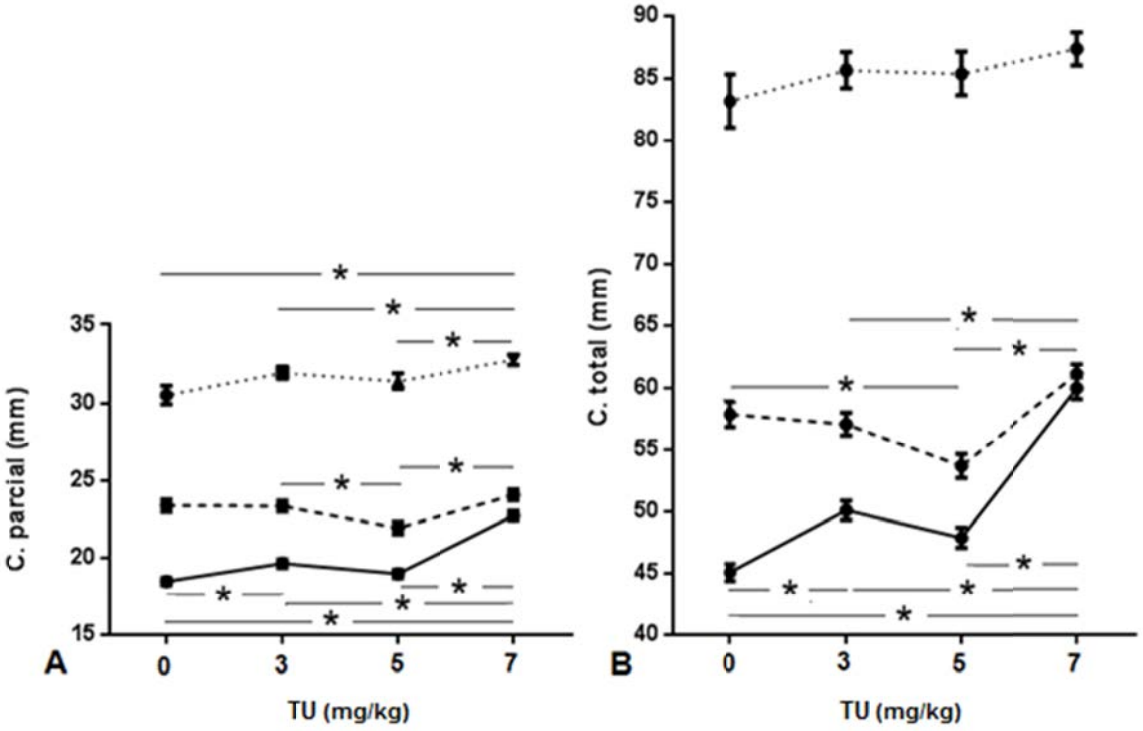

Figura 3. Comprimento parcial e total de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) tratados com TU. (A): comprimento parcial (mm); (B): comprimento total (mm). 30 dias (linha contínua); 60 dias (linha tracejada) e 90 dias (linha pontilhada). Pontos representam as médias ± EP. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

Aos 90 dias, embora os animais do tratamento T_3 apresentassem o maior comprimento total (87,36 mm), 5% maior do que o observado nos animais controle (T_0), não foram observados diferenças significativas ($p>0,05$) para este parâmetro (Figura 3B).

Com relação ao peso dos girinos, aos 30 dias (Figura 4), o peso médio dos animais que receberam alimentação contendo 7 mg TU/kg de ração (2,18 g) foi significativamente maior ($p<0,05$) do que o observado nos demais tratamentos, apresentando uma diferença de 93% com relação ao peso dos girinos que não receberam tiouréia (1,13 g).

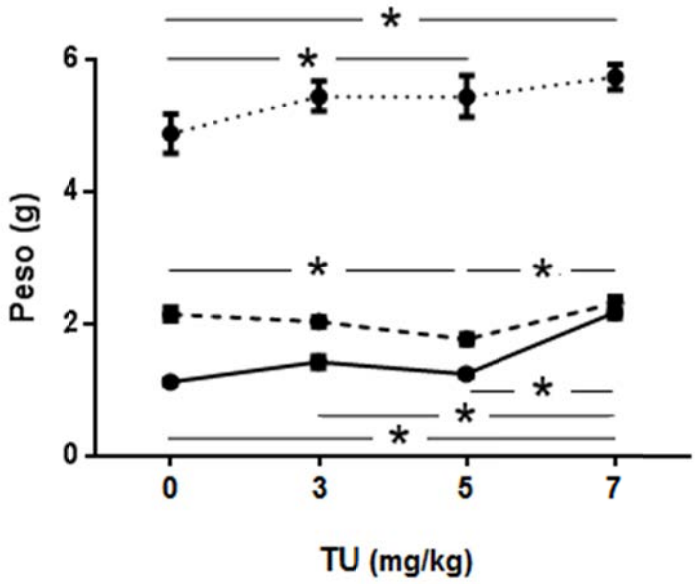

Figura 4. Peso (g) de girinos de rã-touro tratados com TU durante a fase pré-metamórfica. 30 dias (linha contínua); 60 dias (linha tracejada) e 90 dias (linha pontilhada). Pontos representam as médias ± EP. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

Aos 60 dias, podemos observar que os animais do grupo controle, que aos 30 dias apresentaram o menor peso, obtiveram um grande ganho de massa com um aumento de 90% no peso médio, não diferindo do peso médio dos girinos do T_3 (2,31 g). Os girinos que receberam 5 mg TU/kg de ração apresentaram o menor peso (Figura 4).

Aos 90 dias, verificou- se que o peso médio dos girinos do T_3 (5,64 g) foi maior do que o dos girinos que não receberam tiouréia. Embora neste período o peso médio dos girinos no tratamento T_3 não tenha diferido significativamente ($p>0,05$) aos do tratamento T_2 e T_1, o peso médio dos animais em T_3 foi 5,5% maior do que o observado nos outros dois tratamentos (Figura 4).

O comprimento parcial que representa apenas o tamanho do corpo do girino, sem considerar a cauda, é um indicador do tamanho que o animal vai alcançar após a metamorfose (ALTIG & McDIARMID, 1999). No final do período avaliado não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com relação ao comprimento total, mas houve em relação ao comprimento parcial.

Durante o processo de transição da vida aquática para a terrestre, os girinos podem perder até 70% do seu peso total (BROWN & CAI, 2007), em função da absorção da cauda e das modificações morfofisiológicas que ocorrem

nesse período (por exemplo, alteração das mandíbulas e sistema digestório), fazendo que os animais parem de se alimentar.

Logo, nessa fase final da metamorfose, que antecede ao clímax, é desejável a obtenção de animais maiores, principalmente com relação ao tamanho do corpo, e com maior peso.

Neste contexto, uma vez que os animais tratados com 7 mg/kg de TU apresentaram maior comprimento parcial e maior peso ao final do período experimental, acredita-se que estes venham a apresentar maior tamanho após a metamorfose.

O clímax da metamorfose foi observado pela primeira vez após 45 dias do início da Fase 1.

Após 60 e 90 dias, grande parte dos animais atingiu o clímax de metamorfose, 30% a 40% dos girinos no primeiro período e 50% a 75% dos animais no segundo. Observamos também, que os animais tratados com 7 mg de TU apresentaram maior número de animais pós-metamórficos 32% versus 25%, em T_0, 25,5%, em T_1 e 17,5%, em T_2.

Ao adicionarmos TU na alimentação dos girinos na dosagem de 7 mg TU/kg durante a fase pré-metamórfica, nós prolongamos essa fase e estimulamos um maior crescimento e desenvolvimentos dos animais e impedimos temporariamente a diferenciação, mantendo baixos os níveis hormonais de TH e mais altos de prolactina, uma vez que, esta inibe a metamorfose bloqueando os efeitos do TH (TATA et al., 1991; TATA 1997). Quando a alimentação com TU cessa, os níveis baixos de TH são ainda mantidos por um curto período de tempo, mas logo a produção de TSH que vinha crescendo ao longo do período estimula a síntese e liberação de TH, favorecendo a rápida diferenciação e clímax.

Existem diversos trabalhos que demostram a eficácia goitrogênica da TU sobre a metamorfose de anfíbios, mas com o uso de concentrações superiores, adicionados diretamente na água, objetivando a análise dos mediadores hormonais envolvidos no processo de metamorfose, ou visando à manutenção dos girinos em um determinado estágio de desenvolvimento para homogeinização do lote (GRAY & JANSSEN, 1990; HUANG et al., 2001; KLOAS, 2002; DEGITZ et al., 2005; TIETGE et al., 2010; CARR & PATIÑO, 2011). Mas, não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando o uso da TU visando atender os

objetivos proposto neste trabalho. Até o momento, este foi o primeiro trabalho utilizando a tiouréia com o intuito de prolongar a pré-metamorfose para a obtenção de girinos maiores e, consequentemente, imagos mais resistentes e saudáveis.

3.2. Composição corporal

Nos três períodos observados, 15, 30 e 45 dias após o início do experimento, não houve diferenças estatísticas significativas na composição corporal dos girinos entre os tratamentos avaliados (Figura 5A, B, C).

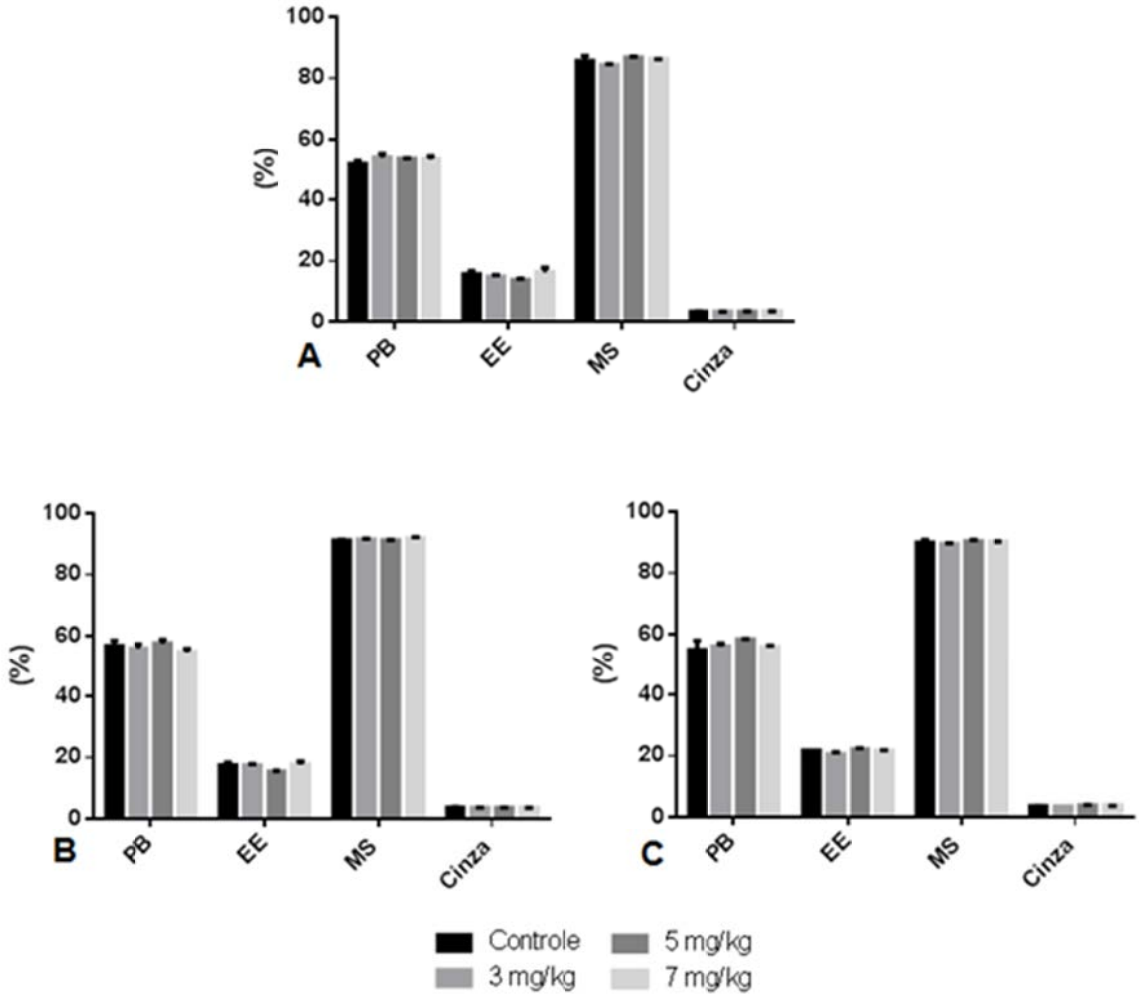

Figura 5. Porcentagem de proteína bruta (PB, %), extrato etéreo (EE, %), matéria seca (MS, %) e cinzas (%) no corpo de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos avaliados. (A): 15 dias; (B): 30 dias; (C): 45 dias. Barras representam as médias ± EP e estão expressas em porcentagem.

Ao longo do período avaliado observou-se aumento na deposição dos nutrientes no corpo dos girinos. Aos 15 dias, o valor médio de PB de 53,10%

passa para 56,20%, aos 30 dias, com aumento de 5,84% de PB na composição corporal. Em seguida, aos 45 dias, observou-se aumento de 0,07% na deposição deste nutriente. Resultados semelhantes, onde foram observados aumentos na deposição proteica corporal, até os 36 dias e em seguida, acentuada redução, foram reportados por Mansano et al. (2013).

A deposição e acúmulo de proteínas, principalmente na cauda dos girinos, são essenciais para a sobrevivência durante o clímax de metamorfose, quando ocorre a apoptose da cauda e a realocação de proteínas para estruturas indispensáveis à vida terrestre (ISHIZUYA-OKA et al., 2010).

Diferenças maiores foram observadas quanto à deposição de gordura corporal. Entre 15 e 30 dias, observou-se aumento de 12,11% na porcentagem de EE e entre 30 e 45 dias de 26,17%, o que indica a formação de uma reserva energética para o clímax de metamorfose, pois neste período os animais param de se alimentar, em função das alterações que ocorrem na boca e órgãos digestivos. Em girinos de rã-touro, a gordura corporal aumenta gradativamente com o aumento da massa corporal, durante o final da pró-metamorfose, atingindo a deposição máxima no início do clímax de metamorfose (WRIGHT et al., 2011). A principal reserva de gordura ocorre no corpo adiposo, mas pode, também, ocorrer no fígado, músculos, gônadas, tecidos subcutâneos e cauda (JORGENSEN, 1992; SHERIDAN & KAO, 1998).

Resultados semelhantes foram relatados por Mansano et al. 2013, ao avaliarem a deposição de nutrientes no corpo de girinos de rã-touro. Segundo os autores, a deposição de gordura corporal aumentou gradativamente, ao longo do experimento, e atingiu o seu ponto máximo aos 41 dias, compondo a reserva de energia necessária para o início do processo de metamorfose.

Existem poucos trabalhos avaliando a gordura corporal em girinos e suas alterações durante a metamorfose. Gramapurohit et al. (1998) avaliaram o surgimento e a acumulação de gordura durante a fase larval e a metamorfose de cinco espécies de anuras: *Rana curtipes, Rana cyanophlyctis, Rana tigerina, Polypedatus maculatus* e *Bufo melanosticus*. Os autores relataram que a gordura corporal varia de acordo com a espécie, com o período larval e, é maior antes do início do clímax de metamorfose.

Com relação à porcentagem de cinzas, observaram-se aumentos de 4,53% entre 15 e 30 dias e de 1,76% entre 30 e 45 dias. Este aumento na porcentagem de cinzas ocorreu, provavelmente, em função do crescimento dos animais, ou seja, formação dos ossos e tecidos estruturais.

A avaliação da matéria seca na composição corporal, que indica a deposição de água nos tecidos, apresentou um aumento de 5%, entre 15 e 30 dias, e 1,60% entre 30 e 45 dias. Este resultado encontra-se de acordo com o esperado, uma vez que, ao longo do período foram observados aumentos na porcentagem de PB, EE e cinzas.

O aumento dos nutrientes corporais como: proteínas, gorduras e minerais determina o crescimento dos animais e estes podem ser influenciados tanto por fatores endógenos (espécie, genética e/ou fase devida) como exógenos (composição da dieta, ambiente de criação, etc.) (DUMAS et al., 2010).

Logo, a concentração dos nutrientes corporais encontrados neste experimento encontram-se de acordo com crescimento e desenvolvimento normal observado em girinos de rã-touro.

3.3. Glândula Tireóide

A morfologia da glândula tireóide é um ponto importante no diagnóstico de muitas características histomorfológicas mediadas por componentes regulatórios do eixo hipotálamo-pituitária-tireóide (HPT), principalmente o TSH, hormônio que regula a síntese e liberação do hormônio tireoidiano (GRIM et al., 2009).

Após 15 dias do início do experimento, não foram observas diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao tamanho da glândula tireóide (Figura 6A). Apesar disso, os girinos do grupo controle apresentaram a menor área (23,69 mm^2) e os animais que receberam 7 mg de TU, a maior (37,93 mm^2). Embora a tireóide dos girinos do tratamento controle tenha sido 63% menor dos que receberam 7 mg TU, pelo teste de Bonferroni, ao nível de 5% de probabilidade, elas não diferiram entre si ($p>0,05$).

Aos 30 dias, observou-se um aumento da tireóide em relação ao período anterior em todos os tratamentos, sendo estes de 318% (T_0), 126% (T_1), 224%

(T_2) e 250% (T_3). Os girinos que receberam 3 mg TU/kg apresentaram a menor área da tireóide, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 6B).

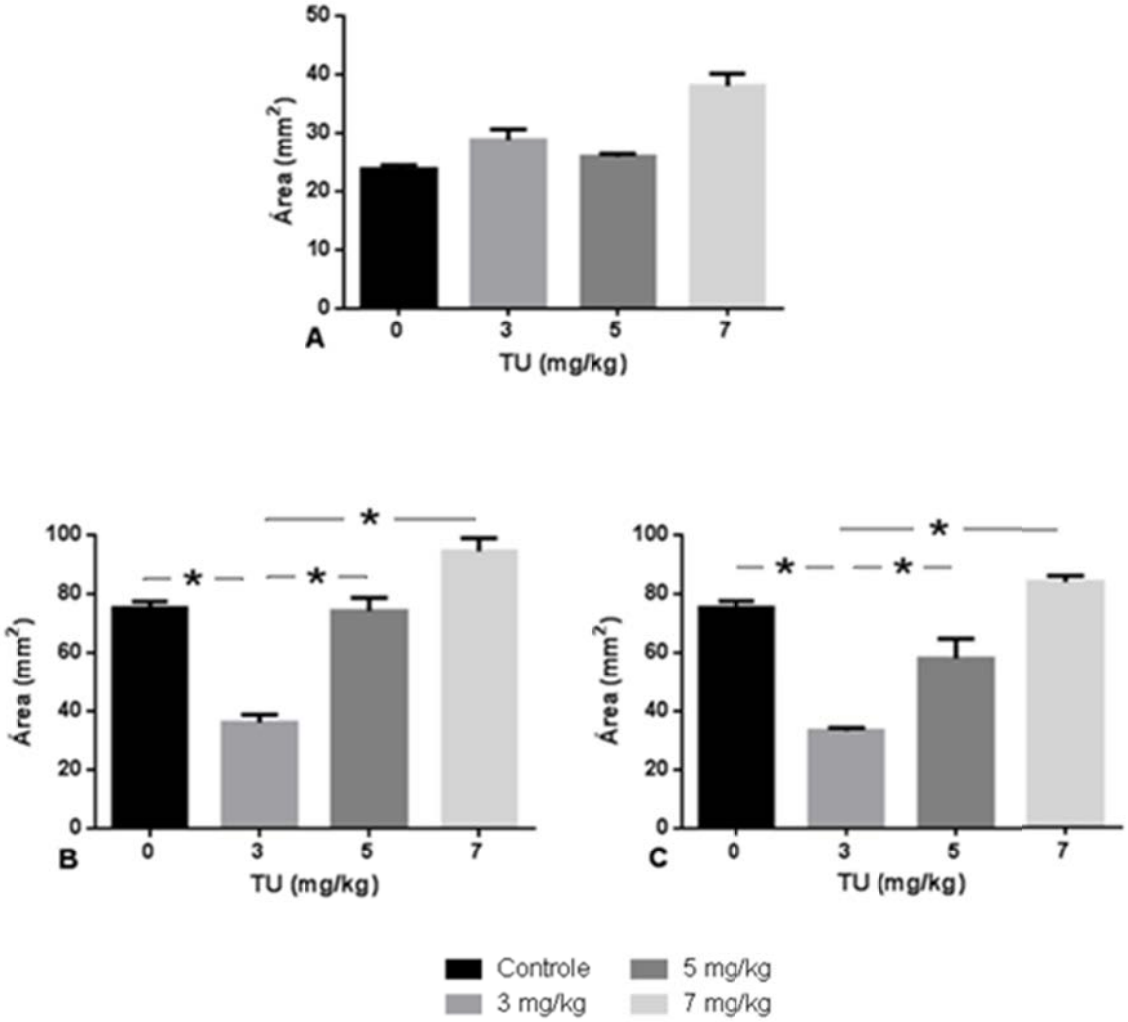

Figura 6. Área da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos avaliados. (A): 15 dias; (B): 30 dias; (C): 45 dias. Barras representam as médias ± EP e estão expressas em milímetros quadrados. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

Aos 45 dias, a área da tireóide dos girinos do grupo controle permaneceu praticamente a mesma do período anterior (75,24 mm^2), apresentando uma pequena redução de 0,1% (Figura 6C). Nos demais tratamentos, as reduções da tireóide foram mais expressivas, sendo estas, respectivamente, de 8%, 22% e 11% para os tratamentos T_1, T_2 e T_3, respectivamente.

Com relação ao tamanho dos folículos (TFol) e área luminal do folículo (Acol), podemos observar que, em nenhum dos períodos avaliados, foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni (Figura 7A, B). Todavia, aos 15 dias, analisando TFol (Figura 7A) temos que, em relação ao

grupo controle, os tratamentos T_1, T_2 e T_3 apresentaram o tamanho do folículo, 16%, 40% e 8% maiores, respectivamente.

Aos 30 dias, com exceção do tratamento T_1, que permaneceu no mesmo tamanho, nos demais tratamentos TFol teve aumentos expressivos sendo estes de: 72% (T_0), 25% (T_2) e 86% (T_3). Nota-se também, que o TFol no tratamento T_3 foi 17% maior do que o de T_0 (Figura 7A).

Aos 45 dias, observa-se atrofia dos folículos com redução de 31% (T_0), 18% (T_2) e 5% (T_3) no TFol do observado no período anterior (Figura 7A).

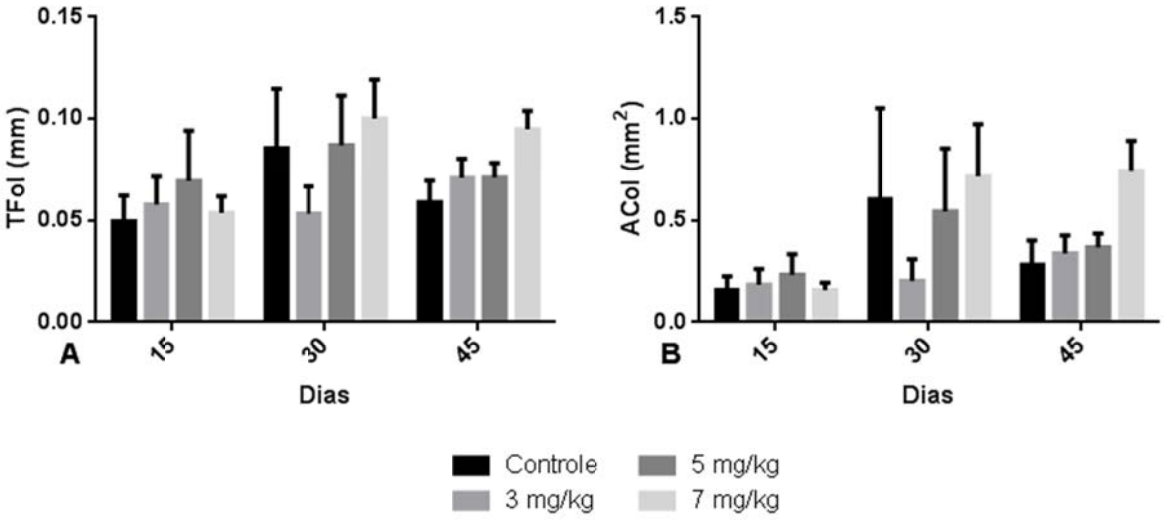

Figura 7. Tamanho médio dos folículos (TFol) e área luminal do folículo (ACol) da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos e dias avaliados. (A): Tamanho dos folículos; (B): Área luminal do folículo. Barras representam as médias ± EP e estão expressas em milímetros.

Quanto à área luminal do folículo (Acol), apesar de não apresentar diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos nos diferentes períodos avaliados, nota-se que, no primeiro período (15 dias), nos tratamentos T_1, T_2 e T_3, a área luminal do folículo foi 16%, 48% e 8% maiores do que a do tratamento T_0 (Figura 7B).

Aos 30 dias houve um aumento deste parâmetro, quando comparado com 15 dias, exceto no tratamento T_1 (3 mg TU/kg), que permaneceu praticamente com a mesma Acol. No tratamento T_0 nota-se aumento de 383% da Acol, e em T_2 e T_3, 233% e 458%, respectivamente (Figura 7B).

Aos 45 dias, nota-se a redução da área luminal do folículo nos tratamentos T_0 (53%) e T_2 (33%) e aumento da ACol em T_1 (68%) e T_3 (4%) (Figura 7B).

Com relação ao formato (regular ou irregular), aos 15 dias, em todos os tratamentos avaliados, os folículos apresentaram o mesmo formato irregular e tamanhos variados. Podemos observar também a presença de células foliculares cuboides, colunares e arredondadas, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados, mas, em geral, a forma mais observada foi cuboide (Figura 8A, B, C, D). Além disso, nota-se a presença de poucos folículos em todos os tratamentos avaliados.

Nesse período, não foi verificado a estratificação da estrutura do epitélio ou a presença de invaginações papilares na camada de células epiteliais para o interior do lúmen (Figura 8).

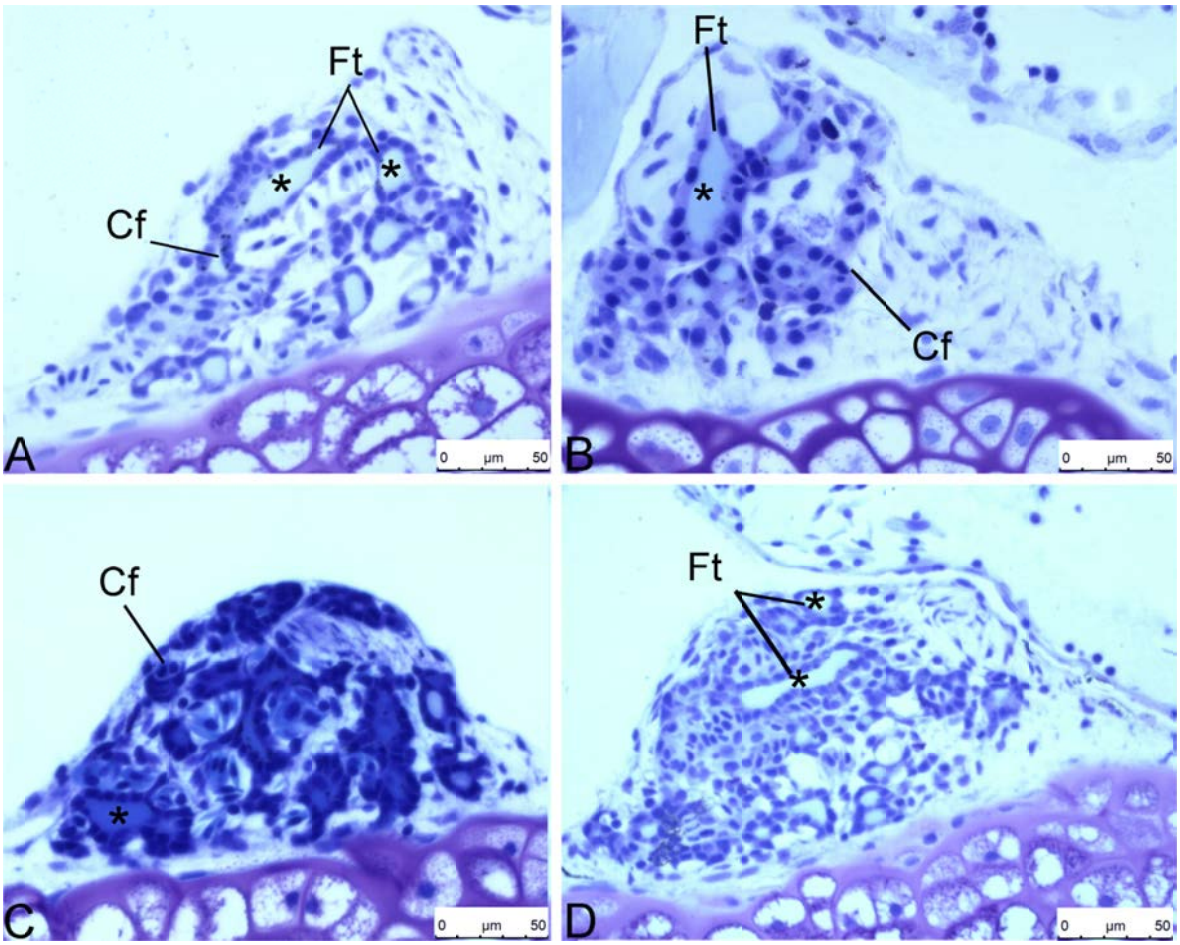

Figura 8. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 15 dias de tratamento com tiouréia (TU). (A): controle; (B); 3 mg TU/kg; (C): 5 mg TU/kg; (D): 7 mg TU/kg. Folículo tireoidiano (Ft); Células foliculares (Cf); Colóide (*).

Não houve diferenças significativas no número médio de folículos presentes na tireóide ($p>0,05$) entre os tratamentos avaliados, aos 15 e 30 dias pelo teste de Bonferroni (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de folículos presentes na glândula tireóide de girinos de rã-touro em função dos tratamentos e dias avaliados

Tratamento	15 dias	30 dias	45 dias
Controle (T_0)	7 ^{A}	14 ^{A}	18 ^{B}
3 mg/kg (T_1)	4 ^{A}	18 ^{A}	17 ^{B}
5 mg/kg (T_2)	7 ^{A}	20 ^{A}	27 ^{AB}
7 mg/kg (T_3)	8 ^{A}	23 ^{A}	37 ^{A}

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 30 dias, com exceção do tratamento T_2, onde os folículos apresentaram formato mais arredondado e uniforme, nos demais tratamentos os folículos apresentaram formato bastante irregular e de tamanhos variados (Figura 9). Nota-se um aumento no número de folículos, principalmente nos tratamentos T_2 e T_3, confirmado posteriormente ao analisarmos o número médio de folículos presentes na tireóide, onde T_0 apresenta um aumento de 100%, em relação ao período anterior, T_1 de 350%, T_2 de 185% e T_3 de 188% (Tabela 2).

Aos 45 dias, verificou-se a ocorrência de diferenças significativas no número médio de folículos onde os animais do tratamento T_3 apresentaram o maior número médio de folículos, diferindo dos animais do grupo controle (T_0) e T_1 (Tabela 2).

As células foliculares, em T_0 apresentaram, em geral, formato cuboide, sem grandes alterações ao longo do período avaliado. Em T_1, T_2 e T_3 as células foliculares apresentam-se na maioria colunares e arredondadas, visualmente maiores que as células observadas em T_0. Em T_2 e T_3 observa-se pela primeira vez a presença de estratificações na estrutura do epitélio, formando múltiplas camadas de células epiteliais (Figura 9C, D).

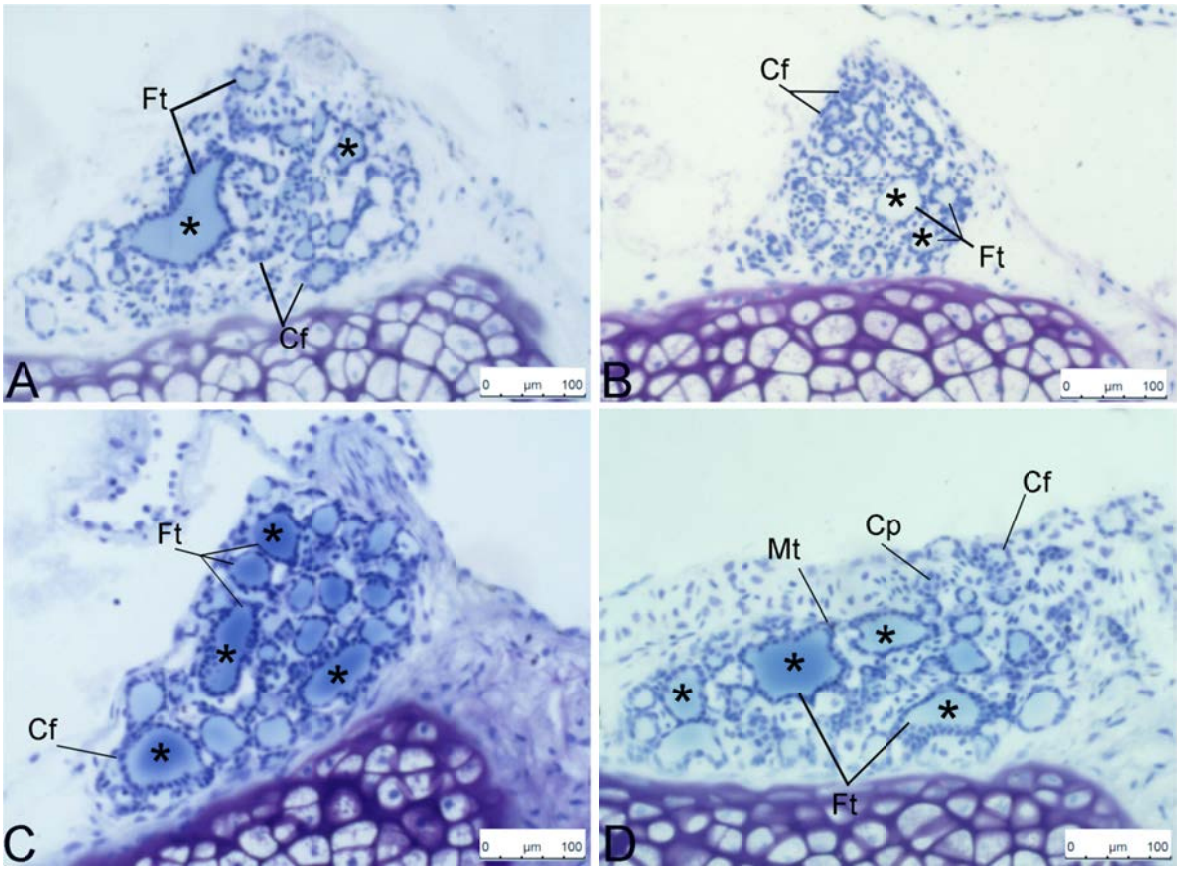

Figura 9. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 30 dias de tratamento com tiouréia (TU). (A): controle; (B); 3 mg TU/kg; (C): 5 mg TU/kg; (D): 7 mg TU/kg. Folículo tireoidiano (Ft); Células parafoliculares (Cp); Células foliculares (Cf); Mastócitos (Mt); Colóide (*).

Aos 45 dias, nos animais controle, houve um pequeno aumento do número de folículos presentes na tireóide, em relação ao período anterior (29%). Fato constatado, também, nos tratamentos T_2 e T_3, porém, de forma mais expressiva, 35% e 61%, respectivamente (Tabela 2). Em T_0, não houve alterações no formato das células foliculares (cubóide) ou na estrutura do epitélio (fileira única de células) (Figura 10A).

Em T_2 e em T_3 observa-se alterações no formato das células foliculares, passando de colunares e arredondadas para cubóides, e observa-se ainda, a presença de estratificação do epitélio (Figura 10C, D).

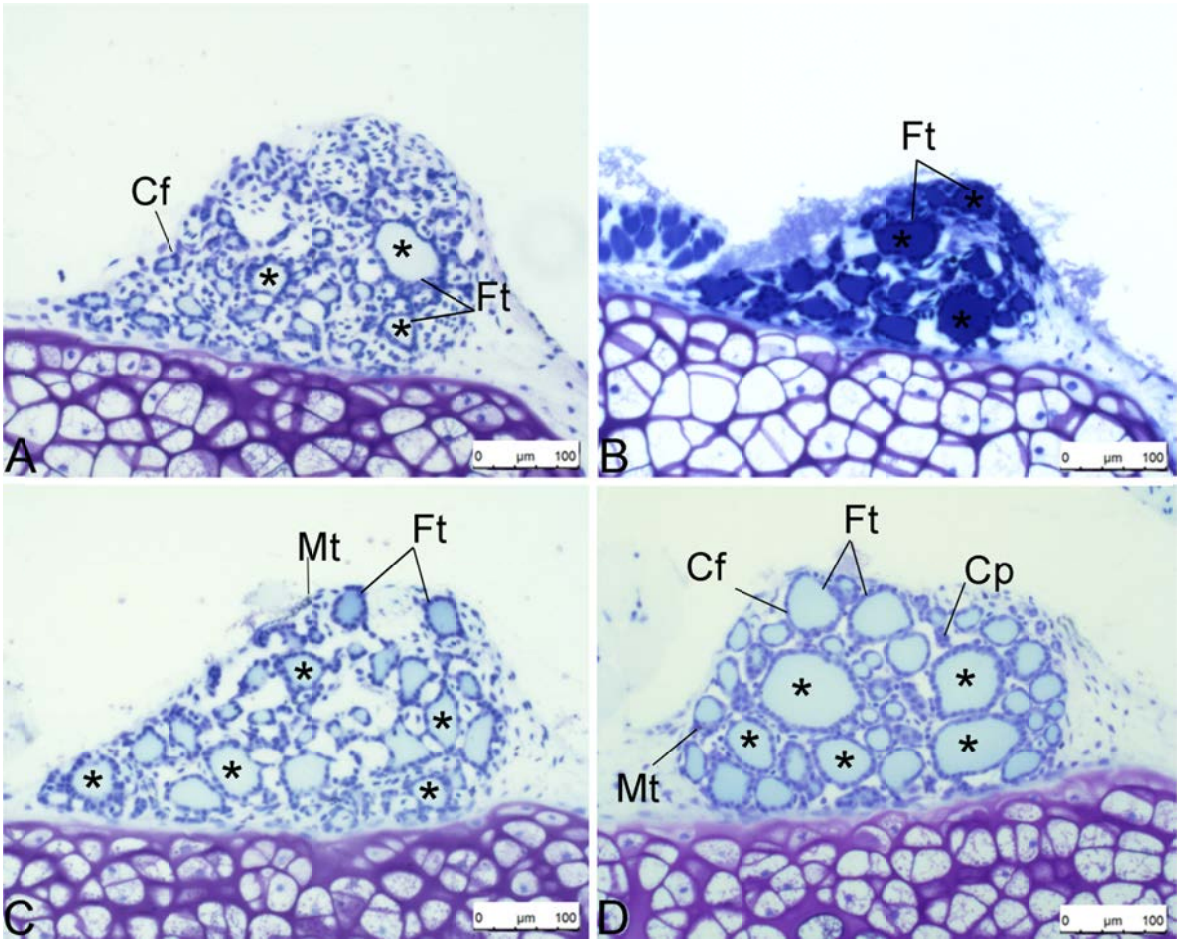

Figura 3. Secções transversais da glândula tireóide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após 45 dias do início do experimento. (A): controle; (B); 3 mg TU/kg; (C): 5 mg TU/kg; (D): 7 mg TU/kg. Folículo tireoidiano (Ft); Células parafoliculares (Cp); Células foliculares (Cf); Colóide (*).

Para auxiliar na interpretação das fotomicrografias da glândula tireóide e da definição do formato da célula folicular (cubóide, colunar, arredondada, achatada, etc.) nós determinamos a altura das células foliculares (ACF) presentes na glândula tireóide em função dos tratamentos avaliados (Figura 11).

De acordo com os dados obtidos, observar-se que, logo após 15 dias, a altura das células foliculares dos animais que não receberam TU foi significativamente menor daqueles tratados com TU, sendo que estes não diferiram entre si (Figura 11).

Aos 30 e 45 dias, nota-se atrofia das células foliculares da glândula tireóide dos girinos que receberam TU (T_1,T_2 e T_3). Nos girinos do tratamento T_1, aos 30 dias, a ACF apresenta uma redução de 32% e, aos 45 dias, de 18%. No tratamento T_2 as reduções neste parâmetro foram de 18% e 14%,

respectivamente. No tratamento T_3, aos 30 dias, observou-se uma redução na ACF de 10% e no período seguinte, esta permaneceu inalterada.

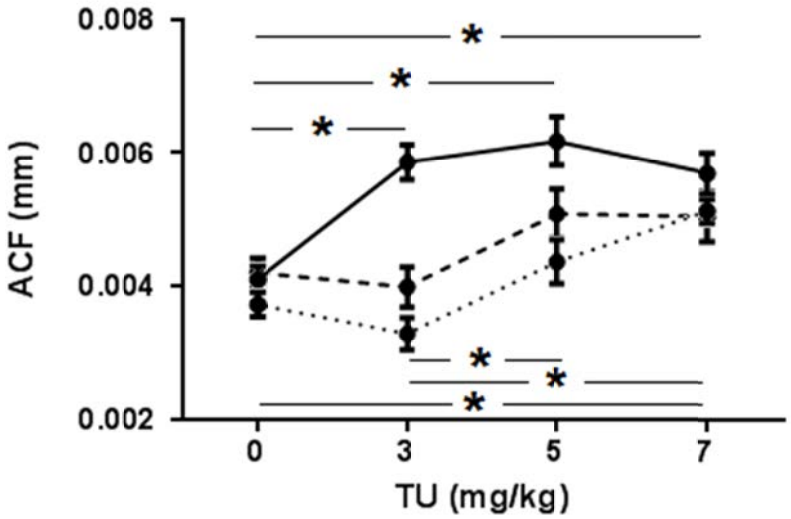

Figura 11. Altura das células foliculares da glândula tireóide de girinos de rã-touro, em função dos tratamentos. 15 dias (linha contínua); 30 dias (linha tracejada) e 45 dias (linha pontilhada). Pontos representam as médias ± EP e estão expressas em milímetros. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

Ao longo do período de metamorfose, a morfologia da glândula tireóide se altera progressivamente para atender as exigências fisiológicas necessárias para a transição da vida aquática para a terrestre (DODD et al., 1976). A glândula tireóide aumenta em tamanho e em volume, devido à proliferação de folículos e ao aumento no tamanho e no número de células foliculares (GRIM et al., 2009). Fato comprovado pelos dados obtidos em T_0, onde os girinos alimentados com ração sem tiouréia, também, apresentaram hipertrofia da glândula tireóide, mas, neste caso, devido ao crescimento e desenvolvimento normal dos animais ao longo do período de metamorfose.

Nos girinos que receberam 3 mg TU/kg ração (T_1), observou-se hipertrofia da glândula tireóide apenas na fase inicial e, em seguida, atrofia. Provavelmente, isso tenha ocorrido em função da baixa dosagem de TU utilizada que não foi capaz de manter baixos os níveis de TH no plasma e estimular a hipertrofia da tireóide.

Nos girinos do tratamento T_2 (5 mg TU/kg ração), observou-se a hipertrofia da glândula tireóide, até os 30 dias, caracterizada pela hipertrofia das células foliculares, aumento do número e tamanho dos folículos e área luminal do

folículo. Após esse período, o tamanho da glândula tireóide passa a igualar-se ao dos girinos de T_0. Provavelmente, da mesma forma como observado no tratamento anterior, a atrofia observada no final do período tenha ocorrido em função da baixa concentração de TU utilizada, que não foi capaz de manter os níveis hormonais de TH baixos depois de cessada a administração do inibidor, levando a regressão das células foliculares e do tamanho dos folículos.

Os girinos que receberam 7 mg de TU apresentaram hipertrofia da glândula tireóide ao longo de todo o período avaliado, em consequência da hipertrofia e hiperplasia das células foliculares e do aumento do número de folículos e área luminal do folículo. A exposição da glândula tireóide a inibidores da síntese de TH, como a tiouréia, induz a hiperplasia e hipertrofia de células foliculares, alterações na área luminal do folículo e crescimento glandular, devido a alterações associadas a mecanismos compensatórios, modulados pelo aumento da concentração do TSH circulante em resposta ao declínio do TH no sangue. Essas alterações ocorrem quando se utiliza doses pequenas de inibidores da síntese de tireóide, abaixo da dosagem necessária para a completa inibição do desenvolvimento metamórfico (DEGITZ et al., 2005; TIETGE, et al., 2005).

4. Conclusões

O uso da tiouréia nas dosagens utilizadas não alterou a deposição de nutrientes na carcaça dos girinos de rã-touro, entretanto induziu a hipertrofia da glândula tireóide.

Nas condições utilizadas neste trabalho, recomenda-se o uso de 7 mg de TU por kg de ração, por um período de 30 dias.

5. Referências

ALTIG R and McDIARMID R 1999. Body Plan: Development and Morphology. In: Tadpoles: The Biology of Anuram Larvae (ed. R. McDIARMID, R. ALTIG) pp. 24-51. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

BROWN D and CAI L 2007. Amphibian metamorphosis. Developmental Biology 306, 20-33.

CARR JA and PATIÑO R 2011. The hypothalus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. General and Comparative Endcrinology 170, 299-312.

DEGITZ SJ, HOLCOMBE GW, FLYNN KM, KOSIAN PA, KORTE JJ and TIETGE JE 2005. Progress towards Development of an Amphibian-based Thyroid Screening Assay Using *Xenopus laevis*. Organismal and Thyroidal Response to the Model Compunds 6-Proppylthiouracil, Methimazole, and Thyroxine. Toxicological Science 87, 353-364.

DODD M, DODD J and LOFTS B 1976. The biology of metamorphosis. In: Physiology of Amphibia (ed. B. Lofts) pp.467-599. Academy Press, New York, USA.

DUELLMAN WE and TRUEB L 1994. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.

DUMAS A, FRANCE J and BUREAU D 2010. Modelling growth and body composition in fish nutrition: Where have we been and where are we going? Aquaculture Research 41, 161-181.

DUMONT JE, LAMY F, ROGER P and MAENHAUT C 1992. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. Physiological Reviews 72, 667–697.

ETHERIDGE RD, PESTI GM and FOSTER EH 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. Animal Feed Science and Tecnology 73, 21-28

FURLOW JD and NEFF ES 2006. A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. Trends in Endocrinology and Metabolism 17, 40–47.

GALLOY V and DENOËL M 2010. Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (*Lissotriton helveticus*). Acta Oecologica 36, 179-183.

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

GRAMAPUROHIT NP, SHANBHAG BA and SAIDAPUR SK 1998. Pattern of growth and utilization of abdominal fat bodies during larval development and metamorphosis in five South Indian anurans. Current Science 75, 1188–1192.

GRAY K. and JANSSEN P 1990. Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles in vivo, but not in vitro. General and Comparative Endocrinology 77, 202-211.

GRIM KC, WOLFE M, BRAUNBECK T, IGUCHI T, OHTA Y, TOOI O, TOUART L, WOLF DC and TIETGE J 2009. Thyroid Histophatholgy Assessments for the Amphibians Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-active Substances. Toxicologic Pathology 37, 415-424.

HAYES TB 1997. Steroid modulator oh thyroid hormone activity. American Zoologist, 37, 185-194.

HAYES TB 1995a. Interdependence of corticosterona and thyroid hormones in larval growth and development in western toad (*Bufo boreas*). I. Thyroid hormone dependent and independent effects of corticosterona on growth and development. Journal of Experimental Zoology 271, 95-102.

HAYES TB 1995b. An histological examination of the effects of corticosterona in larvae of the western toad, *Bufo boreas* (Anura: Bufonidae), and the oriental fire-

bellied toad, *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). Journal of Morphology 226, 297-307

HUANG H, CAI L, REMO B and BROWN D 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlles by typeII iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy Science of the United States of America 98, 7348-7353.

IPCC 2014. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability.

ISHIZUYA-OKA A, HASEBE T and SHI Y 2010. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. Apoptosis 15, 350-164.

JORGENSEN C 1992. Growth and reproduction. In: Environmental Physiology of the Amphibians. (ed. M. Feder, & W. Burggren) pp. 439-466. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

KANKI K and WAKAHARA M 2000. Spatio-temporal expression of TSH beta and FSH beta genes in normally metamorphosing, metamorphosed, and metamorphosis-arrested *Hynobius retardatus*. General and Comparative Endocrinology 119, 276-286.

KLOAS W 2002. Amphibians as a Model for the Study of Endocrine Disruptors. International Review of Cytology 216, 1-57.

LEATHERLAND JF 1982. Environmental physiology of the teleostean thyroid gland: a review. Environmental Biology of Fishes 7, 83–110.

LIPS K, BREM F, BRENES R, REEVE J, ALFORD R, VOYLES J, CAREY C, LIVO L, PESSIER AP and COLLINS JP 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 3165-3170.

MANSANO CFM, DE STÉFANI, MV, PEREIRA, MM and MACENTE, BI 2013. Deposição de nutrientes na carcaça de girinos de rã-touro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48, 885-891.

McNABB FM 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction. Critical Reviews in Toxicology 37, 163-193.

PINTO DFH 2014. 53f. Avaliação de níveis de proteína Digestível para girinos de rã-touro. Dissertação (mestrado em Aquicultura)- Centro de Aquicultura. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

POPESCU V and GIBBS 2009. Interactions between climate, beaver activity, and pond occupancy by the cold-adapted mink frog in New York State, USA. Biological Conservation 142, 2059-2068.

READING C 1998. The effect of winter temperatures on the timing of breeding activity in the common toad *Bufo bufo*. Oecologia 117, 469-475.

READING C 2007. Linking global warming to amphibians declines through its effects on female body condition and survivorship. Oecologia 151, 125-131.

REIS FILHO RW, ARAÚJO JCE and VIEIRA EM 2006. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. Química Nova 29, 817-822.

ROME L, STEVENS E and JOHN-ALDER H 1992. The influence of temperature and thermal acclimatation on physiological function. In: Environmental Physiology of the amphibians (ed. M. FEDER, W. BURGGREN) pp. 183-205. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

SECCO EM, STÉFANI MV and VIDOTTI RM 2005. Apparent digestibility of different ingredients in diets for bullfrog *Rana catesbiana* tadpoles. Journal of the World Aquaculture Society 36, 135-140.

SHERIDAN M and KAO Y 1998. Regulation of metamorphosis-associated changes in the lipid metabolism of selected vertebrates. American Zoologist 38, 350-368.

SHI YB 1999. Amphibian Metamorphosis - From Morphology to Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York, USA.

SOLOMON RJ and TARUWA SM 2011. The growth comparison of two catfishes *(C. Gariepinus* and *Heteroclarias*). Nature and Science 9, 138-148.

TATA J, KAWAHARA A and BAKER BS 1991. Prolactin inhibits both thyroid horone-iduced morphogenesis and cell-death in cultured amphibian larval tissues. Developmental Biology 146, 72-80.

TATA J 1997. How hormone regulate programmed cell death during amphibian metamorphosis. In: Programmed Cell Death (ed. Y. SHI, Y. YU, D.W. SCOTT) pp. 1-11. Plenum Press, New York, USA.

TIETGE JE, BUTTERWORTH BC, HASELMAN JT, HOLCOMBE GW, HORNUNG MW, KORTE JJ, KOSIAN, PA, WOLFE M and DEGITZ, SJ 2010. Early temporal effects of three thyroid hormone synthesis inhibitors in *Xenopus laevis*. Aquatic Toxicology, 44-50.

TIETGE JE, HOLCOMBE GW, FLYNN K, KOSIAN PA, KORTE JJ, ANDERSON, L, WOLFE M and DEGITZ, SJ 2005. Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: effects on development and thyroid histology. Environmental Toxicology and Chemestry 24, 926-933.

TOMAS CD, CAMERON A, GREEN RE, BAKKENES M, BEAUMONT LJ,COLLINGHAM Y, ERASMUS BFN, FERREIRA DE SIQUEIRA M, GRAINGER A, HANNAH L and HUGHES L 2004. Extinction risk from climate change. Nature 427, 145-148.

VASSART G and DUMONT JE 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. Endocrine Reviews 13, 596–611.

WILLIAMS RH and KAY GA 1947. Thiouracils and thioureas: Comparisons of the absortion, distribution, destruction and excretion. Archives International Medicine 80, 37-52.

WRIGHT M, RICHARDSON S and BIGOS J 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology and melatonin content and effect of food deprivation. Comparative Biochemistry and Physiology 160, 498-503.

YEN PM 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiological Reviews 81, 1097–1142.

Artigo 2 – Adição de tiouréia na alimentação de girinos afeta o desempenho de rã-touro?

A.E. Takamura[1], M.A. Oliveira[1a] and M.V. De Stéfani[1]

[1]Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14883-900, Jaboticabal, SP, Brazil

[a]Present adress: Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – campus Botucatu, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil

Corresponding author: Angela Emi Takamura. E-mail: emitakamura@gmail.com

Normas de referência, de acordo com o periódico "Animal".

Resumo

Um dos grandes entraves da ranicultura é a produção de girinos de boa qualidade, em regiões com temperaturas elevadas. A tiouréia (TU) é um potente inibidor da síntese de hormônios da tireóide. Portanto, a adição deste composto na alimentação de girinos, visando a obtenção de imagos maiores, em função do retardo do clímax de metamorfose, pode ser uma alternativa viável. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da administração de TU, durante a fase de girinagem, nas rãs. Foram utilizados 696 imagos, alimentados com tiouréia (0, 3, 5 e 7 mg TU/kg de ração) e distribuídos em DIC com quatro tratamentos e três repetições, quando girinos. Mensalmente, as rãs foram pesadas e medidas até atingirem o peso de abate e, na última biometria, três rãs por tratamento foram eutanasiadas para pesagem do fígado, gônadas e corpo adiposo e obtenção de amostras teciduais. Os pesos e comprimentos dos animais tratados com 7 mg TU/kg de ração foram maiores do que os dos demais tratamentos. No fígado constatou-se a presença de melanomacrófagos, mastócitos e rarefação citoplasmática. No rim observou-se aumento do espaço intersticial, calcificações, túbulos dilatados, melanomacrófagos e granulomas necróticos. No baço, observou-se hiploplasia folicular, inúmeros mastócitos, melanomacrófagos, eosinófilos e destruição tecidual. Nas gônadas não foram observados danos celulares ou estruturais. A administração de 7 mg TU/kg ração na alimentação de girinos resultou na obtenção de animais maiores na recria e ao final do período de engorda. O uso de tiouréia durante a fase de girinagem, nas dosagens utilizadas, não causou toxicidade ou qualquer alteração gonadal em animais adultos.

Palavras-chave: composto goitrogênico, imagos, disruptor endócrino, morfologia de tecidos

Abstract

One of the biggest challenges of frog farming is the production of tadpoles with good quality in regions with high temperatures. The thiourea (TU) is a potent inhibitor of thyroid hormone synthesis. Therefore, the addition of this compound on tadpole's feed in order to obtain larger froglets, by the delay of metamorphic climax, can be a viable alternative. The aim of this work was to evaluate the possible effects of the administration of TU during tadpole's phase, in adult frogs. 696 froglets were used, they were fed with thiourea (0, 3, 5 and 7 mg TU / kg diet) when tadpoles that were distributed in DIC with four treatments and three repetitions. Every month, the frogs were weighed and measured until they reach slaughter weight and, in the last biometric measure, three frogs per treatment were euthanized for to getting the weight of the liver, gonads and fat body and to obtain tissue samples. The lengths and weights of frogs treated with 7 mg TU/kg feed were higher than the other treatments. In liver it was found melanomacrophages, mast cells and cytoplasmic rarefaction plus dissociation of hepatic trabeculae. In kidney it was observed an increase of interstitial space, calcification, dilated tubules, melanomacrophages and necrotic granulomas. In spleen it was observed lymphoid follicles hiploplasia, mast cells, melanomacrophages, eosinophils and tissue destruction. In gonads there wasn't observed any cellular or structural damage on the gonads. The administration of 7 mg of thiourea on the food of bullfrog tadpoles resulted in larger animals in the breeding phase and at the end of it. The use of thiourea during tadpole's phase, in this study, did not cause toxicity or any change in gonadal adult animals.

Keywords: goitrogenic compound, froglets, endocrine disruptor, tissues morphology

1. Introdução

Atualmente, o Brasil não possui uma estatística precisa sobre o número de criadores de rãs e a produção anual, porém, em um levantamento realizado em 2010, foram contabilizados 144 ranários na região Sudeste (BELLUZZO *et al*., 2010) e 16 na região Sul (MORETTO et al., 2013). A produção anual brasileira de carne de rã foi estimada em 400 toneladas (CRIBB, 2013), sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial (FAO, 2009).

Como em toda criação animal intensiva, a ranicultura necessita de produção contínua de rãs para torná-la economicamente viável. Assim, é necessário o estabelecimento de novas técnicas que visem a maior produção e regularidade da oferta.

Um dos problemas enfrentados pelos ranicultores é a produção de imagos pequenos, principalmente no verão, devido à aceleração do processo de metamorfose dos girinos, em função da elevação da temperatura. O menor tamanho dos imagos, na fase inicial de recria, causa graves problemas como: diminuição da fertilidade, em função da redução do tamanho corporal (READING, 2007), e menor produção de ovos e larvas (GALLOY & DENOËL, 2010), afetando toda a cadeia produtiva. Portanto, a produção de girinos saudáveis e de qualidade é importante para o êxito da atividade.

A tiouréia (TU) é um composto orgânico, solúvel em água e com grande potencial para inibição da síntese de hormônios da tireóide (TH). Seu mecanismo de ação ocorre por meio da inibição da atividade da peroxidase da tireóide, responsável pela organificação do iodo, que resultam na formação de T3 e T4 (KANKI & WAKAHARA, 2000; KLOAS, 2002). Desse modo, a tiouréia tem sido amplamente utilizada, devido ao seu efeito goitrogênico (IARC, 2012), ou seja, inibição de absorção do iodo.

Ao se avaliar a meia vida da tiouréia em ratos foi verificado que após 3 horas da administração intravenosa de 5 mg da droga, apenas 30% do composto foi encontrado na carcaça e após 25 horas, apenas traços foram encontrados (WILLIAMS & KAY, 1947). Em humanos, uma única dose oral de 28,57 mg de tiouréia por quilo de peso foi completamente eliminada, via sistema urinário, após 48 horas de sua administração (ZIEGLER-SKYLAKAKIS et al., 2003).

Em função da baixa toxicidade tanto para animais quanto para o meio ambiente, da facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal, eliminação pelos tecidos e urina, e do grande potencial de inibição da síntese dos hormônios da tireóide, a administração da tiouréia em girinos se torna uma alternativa viável para a obtenção de imagos de boa qualidade.

No entanto, alterações das funções normais da tireóide, durante o desenvolvimento larval, podem causar efeitos permanentes no sistema reprodutivo de rãs (GOLEMAN et al., 2002). Relatos na literatura demonstram que a deficiência de TH durante o desenvolvimento larval de *Xenopus laevis* previne a masculinização de estruturas secundárias em machos, como o desenvolvimento dos músculos da laringe, característica de extrema importância para o sucesso reprodutivo (ROBERTSON & KELLEY, 1996). Os hormônios da tireóide parecem, também, desempenhar um importante papel na diferenciação gonadal em anuros (HAYES, 1998).

Além disso, estudos indicam que uma quantidade significativa dos hormônios da tireóide são metabolizados no fígado (HILL et al., 1998). Como todo alimento ingerido, depois de metabolizado e digerido no trato intestinal, é processado a nível hepático (HIPOLITO et al., 2001), uma disfunção grave nesse órgão pode levar a um quadro irreversível (GAYTON & HALL, 2002), com evidente diminuição da taxa de crescimento e até mesmo morte do animal (SEIXAS FILHO et al., 2008a).

O sistema linfático que inclui os órgãos linfóides primários, responsáveis pela produção dos compostos celulares do sistema imunológico (medula óssea e timo), e secundários, locais em que ocorrem as respostas imunológicas (linofonodos, baço, tonsilas e agregados de linfócitos nos pulmões e mucosa do trato digestivo) tem como principal função proteger o organismo contra patógenos invasores ou antígenos (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Nos anfíbios, os órgãos hematopoiéticos são dotados de células dinâmicas e responsivas a diversos estímulos, denominadas melanomacrófagos. Essas células agem nos processos de detoxificação através da fagocitose e armazenam alguns compostos como a lipofuscina e melanina. A melanina atua na absorção e neutralização dos radicais livres, cátions e outros agentes tóxicos (ANTONIASSI et al., 2012; MARTINS et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a administração da tiouréia em girinos de rã-touro pode ser utilizada para a obtenção de animais maiores sem prejuízos ao crescimento e o desenvolvimento de animais pós-metamórficos por meio da avaliação da morfologia do fígado, rins, baço e gônadas.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Setor de Ranicultura, no período de abril a agosto.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, (Protocolo nº 019715/14) e, foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1. Delineamento experimental e amostragens

Foram utilizados 696 imagos com peso médio inicial de 2,52 ± 0,27 g, provenientes do experimento anterior, no qual os girinos (estágio 26 de Gosner) foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições e alimentados por 30 dias, com ração contendo 27% de proteína digestível (PD) e 3676 kcal/kg de energia digestível (ED), com TU nas dosagens de 0, 3, 5 e 7 mg de TU/kg de ração, sendo aqui identificados como tratamentos T_0 ou controle, T_1, T_2 e T_3, respectivamente.

Os imagos foram alojados em baias de 3 m^2 do galpão de engorda, respeitando-se a densidade máxima de estocagem inicial de 50 animais/m^2. Cada baia contém abrigo, canaleta de água e cochos vibratório dispostos linearmente. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano, com fluxo contínuo.

Diariamente, as baias foram limpas, as canaletas de água esvaziadas, limpas e a água reposta.

A alimentação dos imagos consistiu em dieta comercial extrusada, contendo 40% de proteína bruta e 4366 kcal/kg de energia bruta, a qual foi oferecida "*ad libitum*". O tamanho do pelete da ração nos primeiros 45 dias foi de 2 a 4 mm e posteriormente de 6 a 8 mm.

A temperatura do ambiente foi medida diariamente com um termômetro de máxima e mínima, colocado a 30 cm do piso. As temperaturas médias máxima e mínima do ambiente observadas foram de 33,1 ± 3,2°C e 26,2 ± 2,6°C, respectivamente.

A cada 30 dias foram realizadas biometrias onde todos os animais foram pesados individualmente em balança eletrônica digital e mensurados com paquímetro digital (comprimento rostro-cloacal, CRC). Na última biometria (após 120 dias), ao final do experimento, três animais, de cada tratamento, fenotipicamente do sexo masculino e três animais fenotipicamente do sexo feminino foram insensibilizados (benzocaína, 10%) e eutanasiados. Após este procedimento, a cavidade celomática-visceral foi aberta e alguns órgãos internos retirados (fígado, rim, baço, corpo adiposo, gônadas). Fígado, gônadas e o corpo adiposo foram pesados para o cálculo dos índices hepatossomático (IHS% = peso do fígado/peso corporal x 100), gonadossomático (IGS%= peso das gônadas/peso corporal x 100) e lipossomático (ILS% = peso do corpo adiposo/peso corporal x 100).

2.2. Processamento das amostras e análises laboratoriais

Amostras de fígado, rim, baço e gônadas foram fixadas em solução de Karnovsky e incluídas em historesina. Em seguida, estas foram seccionadas em cortes transversais de 5 µm de espessura que foram, então, coradas por meio da técnica de coloração Hematoxilina-Eosina.

2.3. Análises estatísticas

Os dados de peso e comprimento rostro-cloacal foram analisados quanto à normalidade e de acordo com os resultados procedeu-se a análise de variância e os testes de comparação entre médias (paramétricos e não paramétricos). Os

resultados apresentados estão expressos através de média ± EP (erro padrão). Comparações entre as médias foram realizadas utilizando two-way ANOVA ou one-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni ($p<0,05$), para dados paramétricos, e pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos seguido pelo teste de Dunn. Os softwares SAS 9.0 e Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, http://www.graphpad.com) foram utilizados para todas as análises estatísticas.

3. Resultados e Discussões

3.1. Crescimento e desempenho

No início do experimento, os pesos médios dos animais controle e tratados não diferiram significativamente entre si, apresentando o peso médio na entrada de 2,52 ± 0,27 g (Figura 1A). Aos 30 dias, diferenças marcantes foram observadas entre os tratamentos. O tratamento T_0 (controle) apresentou um aumento de 153% no peso com relação à mensuração anterior e os demais tratamentos apresentaram, respectivamente, aumentos de 229% (T_1), 96% (T_2) e 257% (T_3). Diferenças significativas foram observadas entre o tratamento T_0 e os tratamentos T_1 e T_3 (Figura 1A), sendo estes de 19% no primeiro caso e de 43% no segundo. O tratamento T_2 apresentou o pior peso sendo este 22% menor do que T_0 e 54% menor do que T_3.

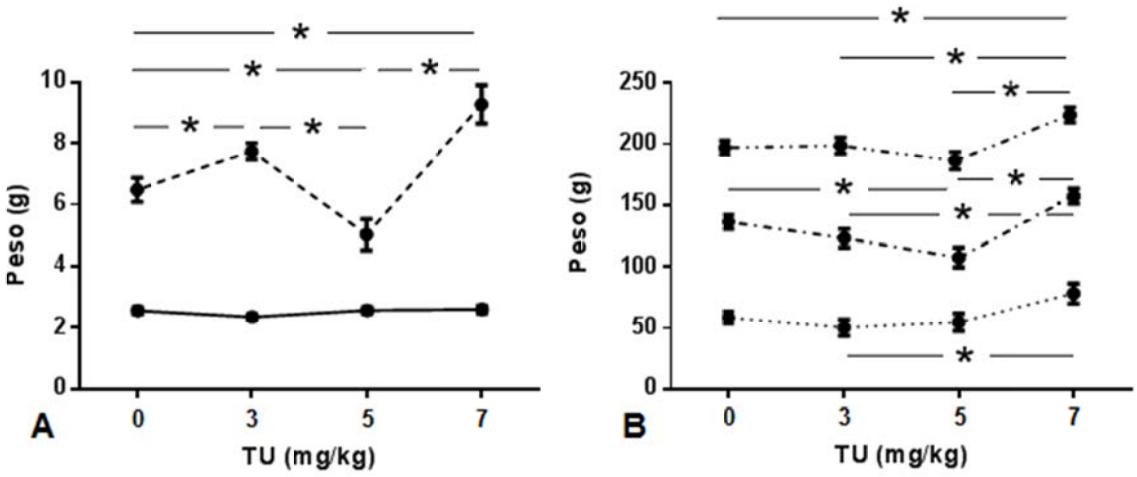

Figura 1. Peso médio de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica. (A): início do experimento (linha contínua), 30 dias (linha tracejada); (B): 60 dias (linha pontilhada); 90 dias (linha traço-

ponto); 120 dias (linha traço-ponto-ponto). Pontos representam as médias ± EP. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

Aos 60 dias, diferenças significativas entre os pesos foram observadas somente entre os tratamentos T_1 e T_3 (Figura 1B). Neste período, houve grandes aumentos no peso médio dos animais em relação ao período anterior em todos os tratamentos, principalmente, em T_2 (998%) e T_0 (811%), esse aumento expressivo assemelha-se aos ganhos obtidos com o ganho compensatório. Crescimento compensatório pode ser definido como um processo fisiológico por meio do qual um organismo tem seu crescimento acelerado após um período de desenvolvimento reduzido (HORNICK et al., 2000).

Ganhos de peso seguidos de crescimento compensatório foram relatados para tilápias do Nilo, mas após serem submetidos a um curto período de jejum e posterior realimentação (NEBO et al., 2013). O mesmo foi descrito para a linhagem GIFT (PALMA et al., 2010) e para pacus (TAKAHASHI, 2007).

Mesmo apresentando aumentos menores (748%), o tratamento T_3 manteve-se com o maior peso (79 g), sendo 33% maior que T_0 e 43% maior que T_2 (Figura 1B).

Nos períodos seguintes, os ganhos de peso começam a diminuir progressivamente, provavelmente em função do desvio de energia do crescimento para a reprodução (LÓPEZ, 2008). Aos 90 dias, os ganhos em relação ao período anterior foram de 130% (T_0), 141% (T_1), 94% (T_2) e 99% (T_3) e, aos 120 dias, de 45% (T_0), 62% (T_1), 74% (T_2) e 43% (T_3). Em ambos o períodos, os animais do tratamento T_3 continuaram a apresentar os maiores pesos, 156 g (90 dias) e 224 g (120 dias), sendo superiores aos demais tratamentos (Figura 1B) e os tratamentos T_1 e T_2 apresentaram peso final semelhante ao do tratamento T_0.

Comparações do desempenho zootécnico da rã-touro são difíceis de serem realizadas em razão das poucas informações disponíveis na literatura e de diferenças climáticas ambientais nas instalações (LIMA et al. 2003).

Durante a fase de engorda dos animais, após 60 dias, as rãs obtiveram ganhos de peso médio diários de 2,29 (T_0), 2,46 (T_1), 2,18 (T_2) e 2,42 g/dia (T_3). Resultados semelhantes foram reportados por Casali et al. (2005) ao avaliarem o desempenho rãs-touro com peso médio inicial de 52 g, tratadas com diferentes

rações comerciais. De acordo com os autores, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura mínima e máxima de 22,3°C e 31°C, respectivamente e, somente os grupos de rãs alimentadas com duas das quatro rações analisadas atingiram o peso de abate (180-200 g) em 60 dias, sendo estas as que continham 45% de proteína bruta (PB) e 4422 kcal/kg de energia bruta (EB) e 44% PB e 4807 kcal/kg EB. Em ambas as rações os ganhos de peso diários foram de 2,71 g/dia.

Um dos principais fatores de interferência no crescimento de rãs é a temperatura por influenciar diretamente no metabolismo do animal, uma vez que, como todos os anfíbios anuros, a rã-touro é dependente da temperatura do ambiente em que se encontra (PETERSEN & GLEESON, 2007). Teodoro et al. (2005), ao trabalharem com estufas climatizadas, observaram que, quando a temperatura do ambiente atinge valores abaixo de 10°C ou acima de 40°C, ocorre a redução do consumo de alimento, em função do estresse, principalmente, em temperaturas mais baixas.

A temperatura das baias do galpão de engorda das rãs apresentou dias em que a temperatura ambiente mínima e máxima (26,2 ± 2,6°C e 33,1 ± 3,2°C) estava fora da faixa ideal de criação de 25,1°C e 30,4°C para rãs-touro com peso vivo entre 37 e 90 g (BRAGA & LIMA, 2001) e de 27,6°C e 28,2°C para rãs-touro com mais de 100 g de peso vivo (FIGUEIREDO et al., 1999). Porém, a temperatura encontrada não deve ter influenciado o crescimento das rãs uma vez que, estas apresentaram resultados semelhantes aos relatados na literatura.

Castro et al. (2012) avaliaram a performance de rãs-touro com peso inicial médio de 70,59 ± 1,05 g, alimentadas com ração comercial contendo 40% PB e 10% de lipídeos, em sistema inundado cujas temperaturas médias mínima e máxima da água foram de 20,5°C e 27,2°C, respectivamente. Os autores, após um período experimental de 60 dias, relataram ganhos de peso médios diários de 1,1 a 1,7 g. Resultados inferiores ao obtidos neste trabalho, o que confirma o relatado anteriormente que a temperatura ambiente alta, durante a realização deste experimento, provavelmente não tenha influenciado o crescimento das rãs.

Com relação ao comprimento rostro-cloacal (CRC), podemos observar que este apresentou o mesmo comportamento do ganho de peso, com aumentos

expressivos nos primeiros 60 dias e, em seguida, ganhos moderados até os 120 dias (Figura 2A, B).

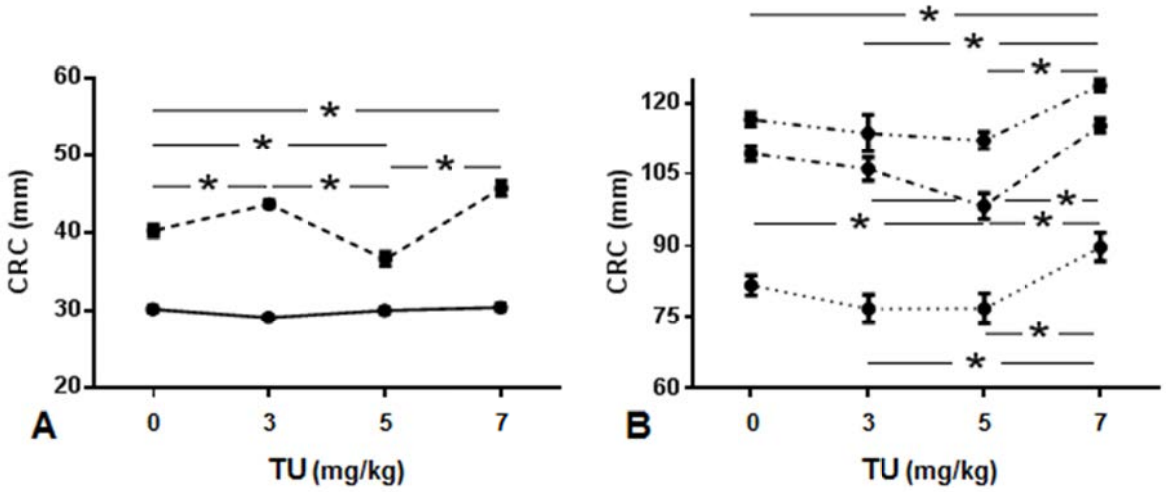

Figura 2. CRC médio (mm) de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica. (A): início do experimento (linha contínua), 30 dias (linha tracejada); (B): 60 dias (linha pontilhada); 90 dias (linha traço-ponto); 120 dias (linha traço-ponto-ponto). Pontos representam as médias ± EP. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre os tratamentos pelo teste de Bonferroni.

No início do experimento, os animais apresentaram CRC médios iguais, não diferindo significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Bonferroni (Figura 2A).

Após 30 dias, começa a surgir diferenças significativas entre os tratamentos. As rãs do tratamento T_2 passam a apresentar o menor CRC (36,7 mm), enquanto que, as rãs do tratamento T_3 apresentaram os maiores comprimentos (45,8 mm) (Figura 2A).

A partir dos 60 dias, os CRC das rãs nos tratamentos T_1 e T_2 foram inferiores ao do grupo controle (T_0) em 6%. Enquanto que, aos 90 e 120 dias, essas diferenças foram de 3% (T_1) e 10% (T_2) e de 2,5% (T_1) e 4% (T_2), respectivamente (Figura 2B).

Embora aos 60 e 90 dias, não tenham sido observado diferenças significativas quanto ao CRC entre os tratamento T_0 e T_3 (Figura 2B), durante o período experimental, as rãs do tratamento T_3 (7 mg TU/kg de ração) apresentaram os maiores CRC. Aos 60 dias, a diferença entre o T_0 e T_3 foi de 13,6% e, aos 90 dias, de 6,1%.

3.2. Índice Somáticos

Os pesos médios dos órgãos das rãs amostradas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ou mesmo entre os sexos (Bonferroni, ao nível de 5% de probabilidade), com exceção das gônadas, onde foram observadas diferenças significativas entre os sexos, mas não entre os tratamentos (Figura 3). Os pesos médios dos testículos e ovários foram de 0,35 ± 0,05 g e 18,60 ± 4,57 g, respectivamente.

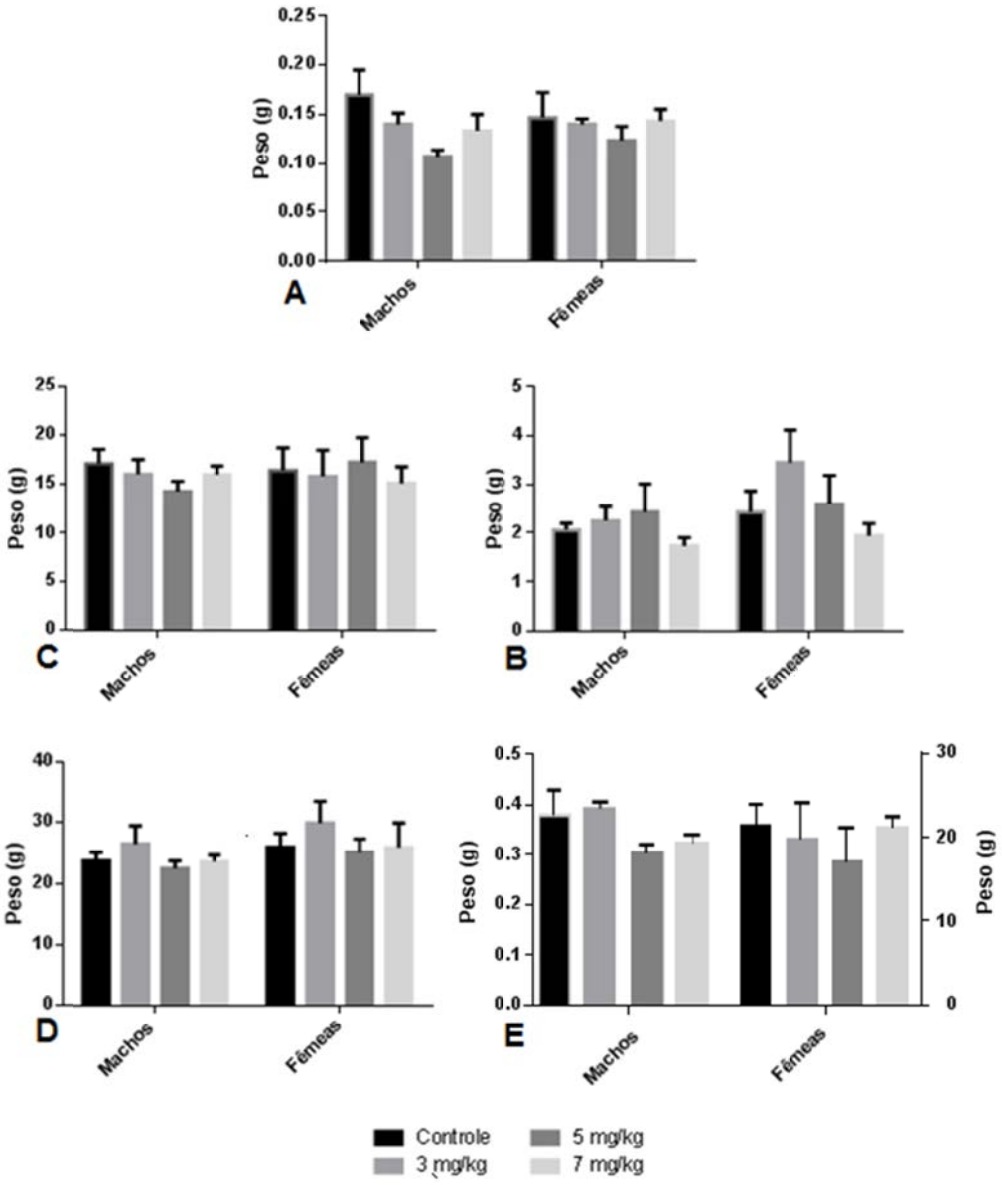

Figura 3. Peso médio dos órgãos internos de rãs-touro tratadas com TU durante a fase pré-metamórfica. (A): Baço; (B): Rim (C): Fígado; (D): Corpo adiposo (E): Gônadas. Barras representam as médias ± EP e estão expressos em gramas.

Os índices lipossomático e hepatossomático foram de 8,17 ± 0,97% e 5,14 ± 0,89%, respectivamente. O índice gonadossomático de machos e fêmeas foram 0,12 ± 0,02% e 5,04 ± 2,95%, respectivamente.

3.3. Morfologia dos tecidos

3.3.1. Fígado

O fígado é, por excelência, o órgão de escolha para termos uma idéia da condição de saúde geral e nutricional dos animais. Uma vez que, alterações causadas, principalmente, por mau manejo alimentar e falhas nos manejos sanitário e zootécnico, ou da presença generalizada de agentes infecciosos refletem na estrutura e funções hepáticas (HIPOLITO, 2003; SEIXAS FILHO et al., 2008b).

A observação da morfologia do fígado dos animais tratados com tiouréia apresentou características bastante semelhantes. Em todos os tratamentos (T_1 a T_3), observou-se a presença de rarefação citoplasmática (Figura 4C-H) associada a dissociação das trabéculas hepáticas (Figura 4E) e presença de inúmeros mastócitos (Figura 4H) e melanomacrófagos (Figura 4D-H).

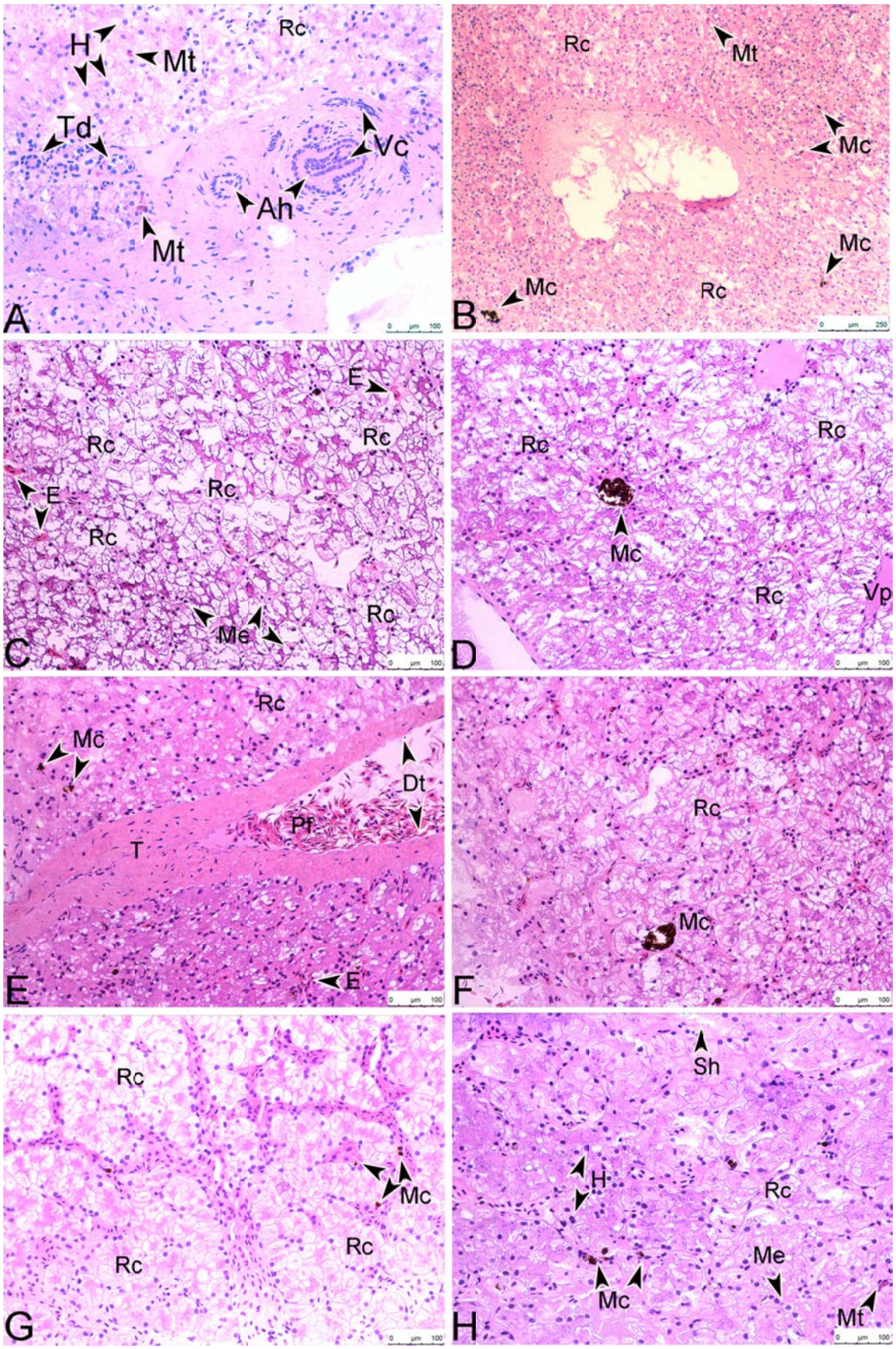

Figura 4. Fotomicrografia de secções histológicas do fígado de rã-touro corados em HE. (A e B): Animais controle; (C e D): animais tratados na concentração de 3 mg de TU/; (E e F) 5 mg de TU; (G e H) 7 mg de TU. Hepatócitos (H); Túbulos distais (Td); Artéria hepática (Ah); Vasos congestos (Vc); Mastócitos (Mt);

Melanomacrófagos (Mc); Rarefação citoplasmática (Rc); Eosinófilos (E); Melanócitos (Me); Veia porta (Vp); Trabécula esplênica (T); Proliferação de fibroblastos (Pf); Dissociação trabecular (Dt); Seios hepáticos (Sh).

Além da derme, células pigmentares contendo melanina podem ser encontradas em diversos tecidos viscerais como: fígado, rim e baço, com diferentes ocorrências, tipos e quantidades, de acordo com as diferentes espécies (AKULENKO, 1998; RUND et al., 1998; ZUASTI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Estas células podem ser agrupadas constituindo um sistema melanogênico cuja função não está devidamente definida (ZUASTI et al., 1998).

Em anfíbios, o estudo dos melanócitos viscerais e melanomacrófagos são recentes e em poucas espécies: *Salamandra antra atra* (TREVISAN et al., 1991), *Rana ridibunda* (AKULENKO, 1998), *Xenopus laevis* (ZUASTI et al., 1998), *Physalaemus curvieri* (OLIVEIRA et al., 2002, 2003), *Physalaemus nattereri* (OLIVEIRA & ZIERI et al., 2005), *Rhinella schneideri* (ANTONIASSI et al., 2012) e *Lithobates catesbeianus* (MARTINS et al., 2012).

Os melanócitos vicerais são celulas grandes, irregulares e intensamente pigmentados e derivam do mesênquima da crista e tubo neural. O seu formato irregular, que varia de estrelado a dendrítico sugere a existência de mais de um tipo celular como os presentes no fígado, baço e rins (OLIVEIRA & ZIERI et al., 2005; MARTINS et al., 2012). Estes no entanto são derivados de céluas hematopoiéticas e são representados pelos melanomacrófagos, que também sintetizam melanina. A melanina é um polímero complexo, que pode absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos derivados da degradação de material celular fagocitado (MARTINS et al., 2012).

Em muitos casos, o aumento da presença de pigmentos melanínicos pode indicar um processo representado pela alimentação e necessidade de se isolar produtos tóxicos (CORSARO et al., 1979; SPEARE & O'SHEA, 1989).

Talvez, no presente estudo, o aumento da ocorrência dos melanomacrófagos (Figura 4B, D, E, F, G, H), e a rarefação citiplasmática (Figura 4C-H) tenham sido resultados de uma resposta a toxidade, causado pela adição de TU durante a fase de girinagem. Porém, esta hipótese é rejeitada quando comparamos os grupos tratados (T_1 a T_3) com o grupo controle (T_0), que não recebeu ração contendo TU, e onde foi verificado também a presença acentuada

de melanomacrófagos, mastócitos, rarefação citoplasmática associada a dissociação das trabéculas hepáticas.

A presença quase que constante desses sinais (melanomacrófagos, mastócitos e rarefação citoplasmática) na morfologia do fígado podem indicar que a qualidade da ração seja imprópria para esses animais (HIPOLITO, 2003; HIPOLITO et al., 2004; SEIXAS FILHO et al., 2008a; SEIXAS FILHO et al., 2008b), pois mesmo com o consumo esperado ou classificado como normal, os animais não estão aproveitando a proteína da ração, por ser, provavelmente, de baixa qualidade ou estarem abaixo da quantidade anunciada.

Trabalhos avaliando o desempenho de rãs-touro alimentadas com dietas comerciais com base em informações nutricionais de peixes carnívoros e com teor de proteína bruta acima de 40% têm apresentado bons resultados zootécnicos (CASALI et al., 2005; FENERICK Jr. e STÉFANI, 2005). No entanto, o uso dessas dietas comerciais tem causado lesões em alguns órgãos como fígado, rim, intestino e pâncreas (HIPOLITO et al. 2007; SEIXAS FILHO et al., 2008a; SEIXAS FILHO et al., 2008b; SEIXAS FILHO et al., 2009).

3.3.2. Rim

Nas secções histológicas do rim dos animais tratados com 3 mg de TU/ kg de ração, observou-se aumento do espaço intersticial do parênquima renal, várias calcificações distróficas, túbulos dilatados com adelgaçamento do epitélio tubular, glomérulos hipertróficos, que geralmente estão associados a alterações hemodinâmicas, e hipotróficos que levam ao aumento do espaço de Bowman, afrouxamento do tecido intersticial com aumento do espaço intersticial, tubulonefrose e presença de mastócitos. (Figura 3C, D).

Nos animais do tratamento T_2, observou-se, também, a ocorrência de aumento do tecido intersticial, túbulos dilatados com adelgaçamento do epitélio tubular, mastócitos, melanomacrófagos e presença de granulomas necróticos (Figura 3E, F).

Nas secções do rim dos animais tratados com 7 mg de TU/ kg de ração, observou-se ausência de luz tubular, aumento do espaço intersticial, degeneração glomerular, presença de mastócitos e melanomacrófagos (Figura 3G, H).

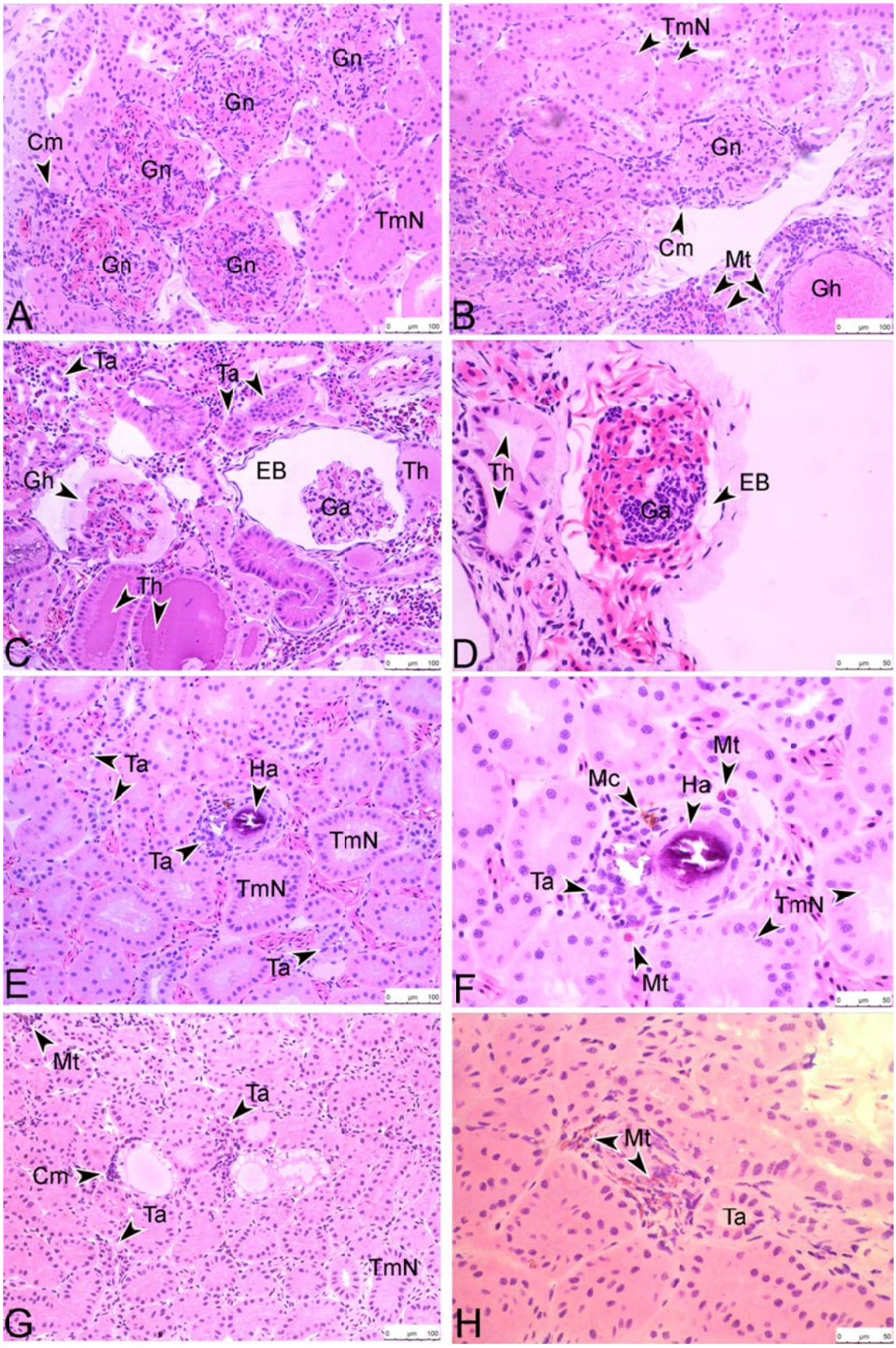

Figura 3. Fotomicrografia de secções histológicas do rim de rã-touro corados em HE. (A e B): Animais controle; (C e D): animais tratados na concentração de 3 mg de TU/; (E e F) 5 mg de TU; (G e H) 7 mg de TU.

Glomérulos (Gn); Túbulos mesonéfricos (TmN); Células mesenquimais (Cm); Mastócitos (Mt); Túbulos atróficos (Ta), Túbulos hipertróficos (Th); Espaçamento da cápsula de Bowman (EB); Glomérulos atróficos (Ga); Melanomacrófagos (Mc); Glomérulo hialinizado (Gh); Granuloma necrótico (Ha).

Nas secções dos animais controle (Figura 3A, B) foi possível observar glomérulos (Gn), túbulos mesonéfricos (TmN) e células mesenquimais (Cm). Todavia, em algumas secções foi possível, também, observar áreas com tubulonefrite (lesões nos túbulos dos rins e tecidos ao redor), túbulos eosinofílicos e presença de mastócitos e melanomacrófagos.

Alterações morfológicas celulares no rim, assim como no fígado, podem ser provocadas por substâncias químicas e drogas, as quais são importantes causas de adaptação (atrofia, hipertrofia e hiperplasia), lesão (tumefação celular, esteatose, necrose e apoptose) e morte celular (CONTRAM et al., 2000).

Todas essas alterações morfológicas observadas, tanto em animais controle quanto tratados com TU, indicam sérias perturbações na função deste órgão.

Seixas-Filho et al. (2008b), ao avaliarem as alterações histopatológicas em girinos de rã-touro alimentados com ração comercial, verificaram a ocorrência de tubulonefrite, alterações nos tubúlos e glomérulos, e alterações, semelhantes ao observado neste trabalho, no fígado do girinos. Segundo os autores, as alteraçãoes encontradas sugerem que os animais foram alimentados com ração de baixa qualidade.

De acordo com Contran et al. (2000), a insuficiência hepática pode ocasionar insuficiência renal.

Esses resultados reforçam a hipótese de baixa qualidade da ração citada anteriormente. Uma vez que, foram constatadas alterações no fígado, tanto em animais controle como também em animais tratados com TU, e da mesma forma nos rins, o que nos faz acreditar, que estes não tenham sido causadas pela adição de TU na ração e sim, pela ração ofertada.

3.3.3. Baço

O sistema linfático, constituído pelos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e secundários (linfonodos, baço, tonsilas e agregados de linfócitos),

tem como principal função a proteção do organismo contra agentes invasores ou estressores (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Neste contexto, o estudo dos órgãos linfóides é um aspecto de fundamental importância na demonstração das alterações dos compartimentos imunológicos, quando expostos a agentes estranhos ao organismo (ROTH et al., 2006).

O baço contém dois componentes principais com funções distintas: a polpa branca, que é o componente imunológico do baço, e a polpa vermelha, que funciona como um filtro e remove eritrócitos remanescentes ou lesionados e microrganismos circulantes no sangue (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Nas secções transversais do baço, foi possível observar células e estruturas normais como: melanócitos (Figura 6A, B, E, H), artérias e veias (Figura 6G), polpa vermelha e polpa branca (Figura 6A, G).

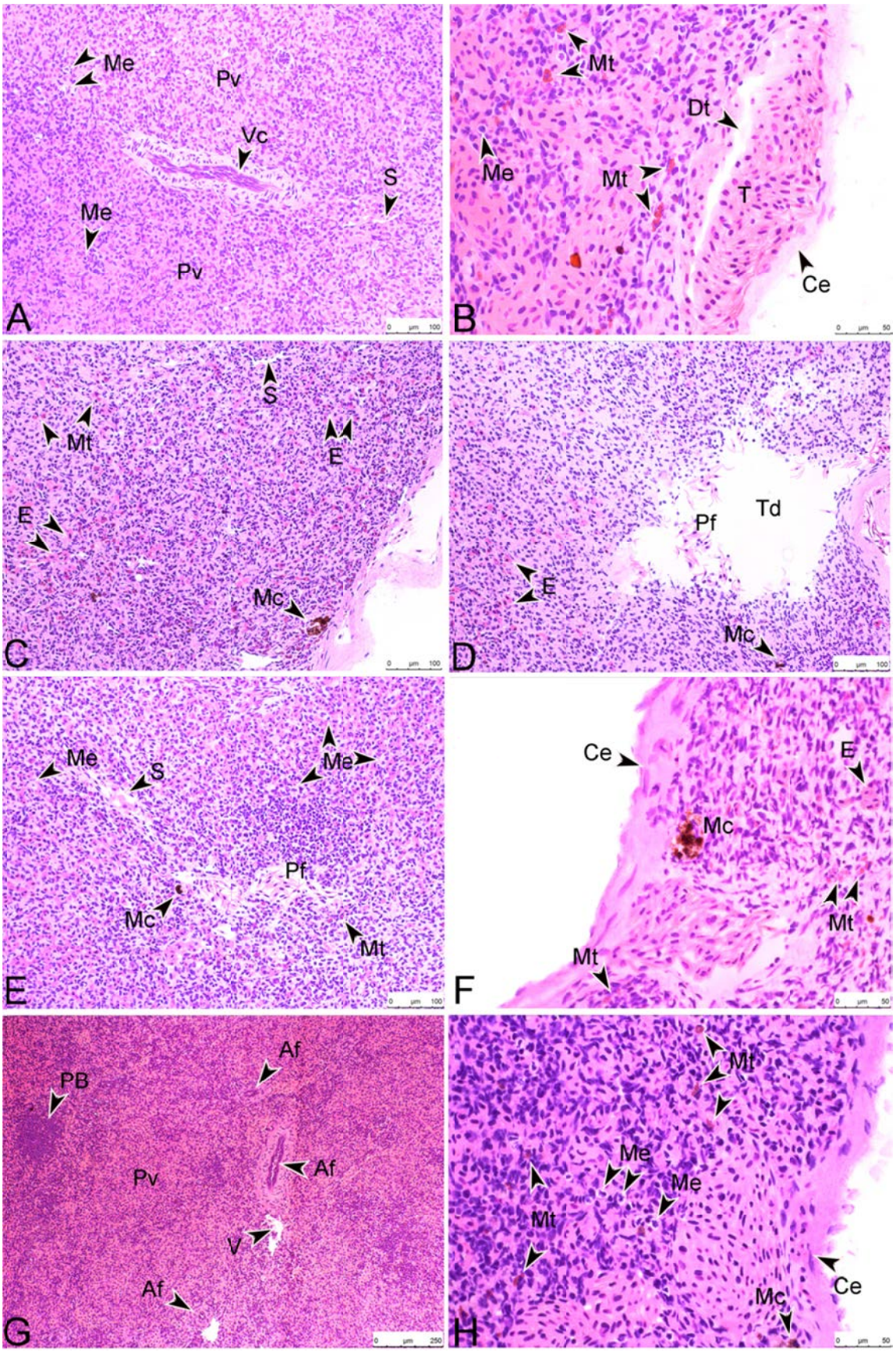

Figura 6. Fotomicrografia de secções histológicas do baço de rã-touro corados com HE. (A e B): Animais controle; (C e D): animais tratados na concentração de 3 mg de TU/; (E e F) 5 mg de TU; (G e H) 7 mg de TU.

Polpa vermelha (Pv); Polpa branca (PB); Vasos congestos (Vc); Seios esplênicos (S); Melanócitos (Me); Mastócitos (Mt); Dissociação da trabécula esplênica (Dt); Cápsula esplênica (Ce); Eosinófilos (E); Melanomacrófagos (Mc); Proliferação de fibroblastos (Pf); Tecido degenerado (Td); Artérias foliculares (Af); Vasos e veias (V).

Nos animais tratados, independente da dosagem utilizada, além das estruturas citadas anteriormente, observou-se hiploplasia de folículos linfoides, presença de inúmeros mastócitos, melanomacrófagos, eosinófilos e a presença de destruição tecidual (Figura 6C-H).

A hipoplasia dos folículos linfoide, associada a proliferação de macrófagos da polpa vermelha e destruição da arquitetura esplênica têm sido comprovado por alguns autores em induções experimentais de infecções em mamíferos (MANGOUD et al., 1997; MANGOUD et al., 1998; RIÇA-CAPELA et al., 2003; NIETO et al., 2011).

Em anfíbios, são poucos os trabalhos disponíveis com relação a alterações histopatológicas no baço e suas consequências na sobrevivência do animal. Schmidt & Reavill (2013) avaliaram as possiveis causas de doenças em populações de anfibios de captura criados em cativeiro. Os autores relataram que a hipoplasia dos folículos linfóides pode ser considerada um indicador não específico de estresse.

Na alimentação de rã-touro, todo o seu desempenho está baseado na quantidade e qualidade do alimento ofertado. Qualquer alteração na qualidade do alimento pode causar disturbios nas funções hepáticas e renais (HIPOLITO et al., 2004). Essas alterações aliadas a disfunções orgânicas gerais provocadas por situações de estresse ou agressões sofridas por agentes infecciosos podem estimular o sistema imunológico provacando alterações na composição celular desses tecidos (HIPOLITO et al., 2007), como por exemplo, de células fagocitárias e de defesa (BRITO et al., 2005).

No período em que se realizou este trabalho a temperatura diária foi acima da média normal (± 33°C). A alimentação não adequada, aliada ao estresse por temperatura pode ter comprometido o sistema digestivo e causado lesões, estimulando o sistema de defesa e com isso, os órgãos linfóides.

3.3.4. Gônadas

Nos cortes histológicos das gônadas (ovários e testículos) não foram observadas diferenças marcantes entre os grupos controle e tratados com TU, assim como, não foram observados danos celulares ou estruturais nas gônadas, em nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 7).

Nos testículos foi possível observar a presença de células de Sertoli (Se) e células intersticiais tipo células de Leydig (Le), espermatogônias (SG), espermatozoides (*), bem como, outros cistos do processo espermatogênico (mitose e meiose), o que indica que os testículos (células) estavam viáveis (Figura 7A, C, E, G).

Nos ovários foi possível observar a presença de folículos ovarianos em vários estágios foliculares: fase I (FI), fase II (FII), fase III (FIII), fase IV (FIV), fase V (FV) e folículos vazios, ovócito maduro e núcleos de ovócitos pré-vitelogênicos (Figura 7B, D, F, H).

Embora não tenhamos observado nenhuma alteração significativa nas gônadas, relatos na literatura têm demonstrado que o uso de TU durante o desenvolvimento larval de *X. laevis* resultam em 100% de feminização (GOLEMAN et al., 2002). Todavia, o tratamento similar, em outra espécie de anura, *Hyperolius viridiflavus*, resultou em 100% de masculinização (HAYES, 1997).

Uma vez que os efeitos dos hormônios da tireóide sobre a diferenciação gonadal são influenciados pela concentração do agente utilizado e pelo estágio de desenvolvimento inicial dos animais quando expostos (GOLEMAN et al., 2002), provavelmente, em função das baixas concentrações utilizadas neste trabalho durante a fase de girinagem, a tiouréia não tenha alterado o desenvolvimento gonadal.

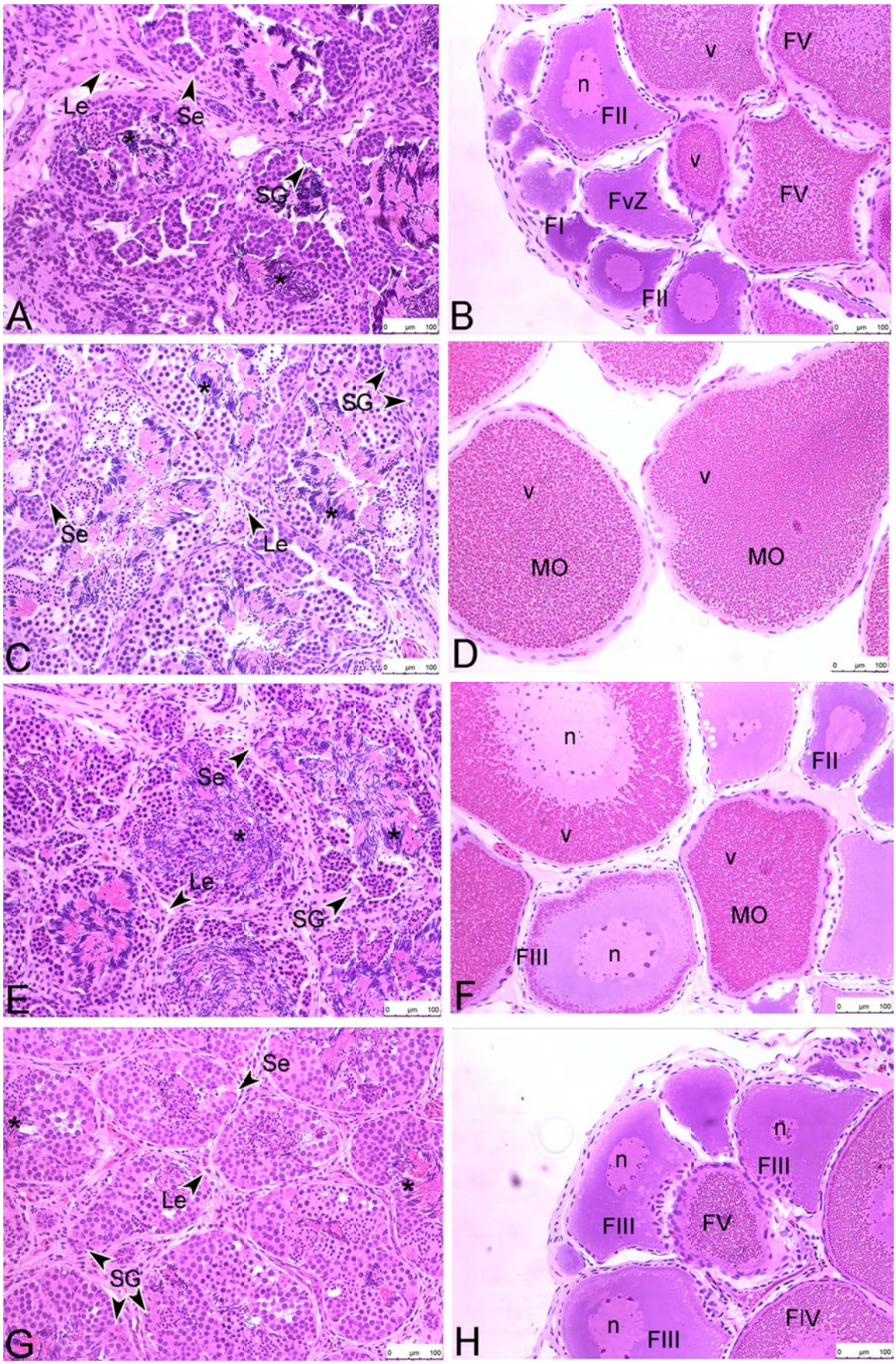

Figura 7. Fotomicrografia de secções histológicas de gônadas de rã-touro adultas corados com HE. (A e B): Animais controle; (C e D): animais tratados na concentração de 3 mg de TU/; (E e F) 5 mg de TU; (G e H) 7

mg de TU. Nos testículos (A, C, E, G), nota-se a presença de células de Sertoli (Se) e células intersticiais tipo células de Leydig (Le), espermatogônias (SG), espermatozoides (*). Nas gônadas femininas (B, D, F, H), notam-se ovários em maturação inicial com a presença de folículos ovarianos na fase I (FI), fase II (FII), fase III (FIII), fase IV (FIV), fase V (FV), folículos vazios (FvZ), ovócito maduro (MO), vitelo (v) e o núcleo (n) de ovócitos pré-vitelogênicos.

4. Conclusões

A administração de 7 mg de tiouréia na alimentação de girinos de rã-touro resultou na obtenção de animais maiores na recria e ao final do período de engorda.

O uso de tiouréia durante a fase de girinagem, nas dosagens utilizadas neste trabalho, não causou toxicidade ou qualquer alteração gonadal em animais adultos.

Os resultados encontrados encorajam novas pesquisas no tema, com o objetivo de aprimorar essa nova técnica tornando-a mais adequada à realidade do ranicultor.

5. Referências

AKULENKO N 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). Vestnik Zoologii 32, pp. 49-53.

ANTONIASSI JF, FRANCO-BELUSSI L, FREITAS JS and OLIVEIRA C 2012. Influência do disruptor endócrino 17B-estradiol nos melanomacrófagos do anuro *Rhinella schneideri* (Bufonidae). XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, (p. 470). Porto de Galinhas, PE.

BELLUZZO AP, RODRIGUES CAG, CRIBB AY and QUARTAROLI CF 2010. Distribuição espacial e áreas potenciais para a criação de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) na região sudeste do Brasil. In Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 13-15 Agosto, Campinas, SP, Brazil.

BRITO ASC, MELO JÚNIOR MR, ARAÚJO FILHO JLS, PATU VJRM and PONTES FILHO, NT 2005. Exposição de ratas adultas a doses crônicas de

aguardente: estudo ponderal e histomorfológico do coração. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernam. 50, 100-103.

BRAGA SL and LIMA SL 2001. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, Rana catesbeiana (Shaw, 1802) na fase de recria. Revista Brasileira de Zootecnia 30, 1659-1663.

CASALI AP, MOURA OM, LIMA SL and SILVA JHV 2005. Avaliação de rações comerciais nas fases de crescimento e terminação da recria de rã-touro. Boletim do Instituto de Pesca 31, 37-46.

CASTRO CS, AGOSTINHO CA, ARGENTIM D, ALEXANDRE JS, OLIVEIRA LC, SOUZA RMR and PADILHA PM 2012. Feed digestibility and productive performance of bullfrogs fed in high and low frequency. Aquaculture 326-329, 123–128.

CRIBB 2013. Brasil é o segundo na produção mundial de rã. Sociedade Nacional de Agricultura. Retrieved October 10, 2013 from http://sna.agr.br.

CONTRAM R, KUMA V, COLLINS T and ROBINS S 2000. Patologia - Estrutura e Função. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

CORSARO C, CAPODICASA V, CARCO D, CRISTALDI G and ZAPPALA C 1979. Factors influencing the changes in liver malanin content of amphibia. I. Effects of breeding temperature. Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale 55, 1008-1014.

FENERICK Jr J and STÉFANI MV 2005. Desempenho e parâmetros metabólicos de rã-touro, Rana catesbeiana, alimentada com diferentes rações comerciais. Acta Scientiarium. Animal Science 27, 377-383.

FIGUEIREDO MRC, AGOSTINHO CA, BAÊTA FC and LIMA CA 1999. Efeito da temperatura sobre o desempenho da rã-touro (Rana catesbeiana, Shaw 1802). Revista Brasileira de Zootecnia 28, 661-667.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics 2009. *Retrieved February* 27, 2009 from http://www.fao.org

GALLOY V and DENOËL M 2010. Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (*Lissotriton helveticus*). Acta Oecologica 36, 179-183.

GAYTON A and HALL J 2002. Tratado de fisiologia médica. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

GOLEMAN W, CARR JA and ANDERSON T 2002. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 590-597.

HAYES T 1997. Hormonal mechanisms as developmental constrains on evolution: Examples from the anura. American Zoologist 37, 482-490.

HAYES T 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. Journal of Experimental Zoology 281, 373-399.

HILL RN, HURLEY PM, CRISP TM, ROSENTHAL SL and SINGH DV 1998. Assessment of thyroid follicular cell tumors. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

HIPOLITO M, LEME M and BACH E 2001. Lesões anátomo-histopatológicas em rã-touro *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) associadas a deterioração da ração. Arquivos do Instituto de Biologia 68, 111-114.

HIPOLITO M 2003. Deficiência protéica e demais patologias associadas ao fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802). I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. Instituto de Pesca, São Paulo, Brasil.

HIPOLITO M, MARTINS A and BACH E 2004. Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) sadias e doentes. Arquivos do Instituto de Biologia 71, 147-153.

HIPOLITO M, RIBEIRO-FILHO OP, BACH EE 2007. Aspecto bioquímico em fígados de Rana catesbeiana (SHAW, 1802) submetidas a diferentes dietas. ConScientiae Saúde 6, 49-56.

HORNICK J, VAN EENAEME C, GÉRARD O, DUFRASNE I and ISTASSE L 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. Domestic Animal Endocrinology 19, 121-132.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC 2012. Retrieved May 03, 2012 from http://www.iarc.fr

KANKI K and WAKAHARA M 2000. Spatio-temporal expression of TSH beta and FSH beta genes in normally metamorphosing, metamorphosed, and metamorphosis-arrested *Hynobius retardatus*. General and Comparative Endocrinology 119, 276-286.

KIERSZENBAUM AL and TRES LL 2012. Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia. Elsevier Editora Ltda, São Paulo, Brasil.

KLOAS W 2002. Amphibians as a Model for the Study of Endocrine Disruptors. International Review of Cytology 216, 1-57.

LIMA SL, CASALI AP and AGOSTINHO CA 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, 505-511.

LÓPEZ S 2008. Non-linear functions in animal nutrition. In: Mathematical modelling in animal nutrition (ed J FRANCE, E KEBREAB) pp. 47-88. Cambridge University Press, UK,

MANGOUD A, RAMADAN M, MORSY T, AMIN A and MOSTAFA S 1998. The histopathological picture of the liver of hamsters experimentally infected with *Leishmania D. infantum* on top of *Schistosoma mansoni* infection. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 28, 101-117.

MANGOUD A, RAMADAN M, MORSY T, AMIN A and MOSTAFA S 1997. Hitopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania D. infantum*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 27, 689-702.

MARTINS A, HIPOLITO M, CATROXO M, CASSIANO L and SOUZA R 2012. Verrugas em anfíbios albinos. Menor resistência as infecções? Biológico 74, 75-180.

MORETO GA, ROFRIGUES CAG, CRIBB AY and FURTADO, ALS 2013. Áreas potenciais para a criação de rã-touro-gigante (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) na região Sul do Brasil. In Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 13-15 Agosto, Campinas, SP, Brazil.

NEBO C, PORTELLA MC, CARANI FR, ALMEIDA FL, PADOVANI CT, CARVALHO RF et al. 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comparative Biochemestry and Physiology, Part B 164, 268-274.

NIETO A, DOMINGUEZ-BERNAL G, ORDEN J, DE LA FUENTE R, MADRID-ELENA N and CARRIÓN J 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. Veterinary Research 42, 39-52.

OLIVEIRA C and ZIERI R 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Ampbibia, Anura) com observaçãoes anatômicas sobre o sistema peigmentar extracutâneo. Revista Brasileira de Zoologia 22, 454-460.

OLIVEIRA C, SANT'ANNA A, OMENA P, SANTOS L and ZIERI R 2003. Morphological considerations on the seminiferous structure and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer, Physalaemus cuvieri* e *Scinax fuscovarius*. Biociências 11, 39-46.

OLIVEIRA C, ZANETONI C and ZIERI R 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). Revista Chilena de Anatomia 20, 263-268.

PALMA EH, TAKAHASHI LS, DIAS LT, GIMBO RY, KOJIMA JT and NICODEMO D 2010. Estratégia alimentar com ciclos de restição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. Ciência Rural 40, 421-426.

PETERSEN AM and GLEESON TT 2007. Characterization of circannual patterns of metabolic recovery from activity in Rana catesbeiana at 15°C. The Journal of Experimental Biology 210, 1786-1797.

READING C 2007. Linking global warming to amphibians declines through its effects on female body condition and survivorship. Oecologia 151, 125-131.

RIÇA-CAPELA M, CORTES S, LEANDRO C, PELETEIRO M, SANTOS-GOMES G and CAMPINO L 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent

model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. Parasitology Research 89, 163-169.

ROBERTSON J and KELLEY D 1996. Thyroid hormone controls the onset of androgen sensitivity in the developing larynx of *Xenopus laevis*. Developmental Biology 176, 108-123.

ROTH D, ROMAN D, ULRICH P, JUNKER U and PERENTES E 2006. Design and evaluation of immunotoxicity studies. Experimental and Toxicologic Pathology 57, 367-371.

RUND C, CHRISTIANSEN J and JOHNSON J 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver turtles: Comments on melanomacrophage morphology. Pigment Cell Research 11, 114-119.

SCHMIDT R and REAVILL D 2013. Review of amphibian diseases. Western Veterinary Conference, (pp. 1-6). Prague.

SEIXAS FILHO JT, HIPOLITO M, CARVALHO VD, MARTINS AR, SILVA LN and CASTAGNA AA 2008a. Alterações histopatológicas em girinos de rã-touro alimentados com rações comerciais de diferentes níveis protéicos. Revista Brasileira de Zootecnia 37, 2085-2089.

SEIXAS FILHO JT, GOMES L, AGUIAR D, HIPOLITO M, MARTINS A and CHAVES A 2008b. Avaliação histológica do intetsino médio, do fígado e do pâncreas de girinos de rã-touro alimentados com rações comerciais formuladas com três niveis de proteína bruta. Revista Brasileira de Zootecnia 37, 2090-2096.

SEIXAS FILHO JT, HIPOLITO M, MARTINS AMCRPF, RODRIGUES E, CASTAGNA AA and MELLO SCRP 2009. Histopathological alterations in bullfrog juveniles fed commercial rations of different crudeprotein levels. Revista Brasileira de Zootecnia 39, 2306-2310.

SPEARE R and O'SHEA P 1989. The marine toad, *Bufo marinus*, in Australia and the search for a killer disease. Proceedings of the American Association of Zoologic Veterinarians, Annual Meeting, (pp. 166-172). Greensboro, North Carolina, USA.

TAKAHASHI L 2007. 89f. Estratégia alimentar, teores de carboidratos dietéticos, desempenho e respostas fisiológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tese (doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, Brasil.

TEODORO SM, CHAVES MA, ESCOBEDO JF, AGOSTINHO CA 2005. Relação de variáveis ambientais em baias cobertas com polietileno e desempenho da rã-touro (Rana catesbeiana). Engenharia Agrícola 25, 46-56.

TREVISAN P, PEDEROZOLI A and BAROZZI G 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander Salamandra atra atra. Pigment Cell Research 4, 151-157.

WILLIAMS RH and KAY GA 1947. Thiouracils and thioureas: Comparisons of the absortion, distribution, destruction and excretion. Archives International Medicine 80, 37-52.

ZIEGLER-SKYLAKAKIS K, KIELHORN J, KÖNNECKER G, KOPPENHÖFER J and MANGELSDORF I 2003. Thiourea. World Healt Organization, Geneva, Switzerland.

ZUASTI A, JIMÉNEZ-CERVANTES C, GARCIA-BORRÓN J and FERRER C 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. Archives of Histology and Cytology 61, 305-316.

Anexos

ANEXO A - Composição qualitativa da ração comercial para peixes carnívoros e os níveis de garantia do fabricante

Composição			
Milho integral moído	Parede celular de levedura	Óxido de zinco	Pantotenato de cálcio
Farelo de soja	Óleo de frango	Sulfato de cobre	Vitamina A
Farelo de arroz	Óleo de peixe refinado	Sulfato de ferro	Vitamina B1
Quirera de arroz	Calcário calcítico	Monóxido de manganês	Vitamina B12
Farelo de algodão	Cloreto de sódio	Carbonato de cobalto	Vitamina B2
Farinha de carne e ossos	Óxido de Magnésio	Iodato de cálcio	Vitamina B6
Farinha de vísceras	Veículo q.s.p	Selenito de sódio	Vitamina C
Farinha de penas hidrolisadas	Etoxiquin	Cloreto de colina	Vitamina D3
Farinha de peixe	Ácido propiônico	Ácido fólico	Vitamina E
Plasma em pó de bovinos	L-lisina	Ácido nicotínico	Vitamina K3
Hemoglobina em pó de bovinos	DL-metionina	Biotina	Inositol

Níveis de Garantia			
Umidade (máx.)	120 g/kg	Colina (min.)	502,5 mg/kg
Proteína bruta (min.)	400 g/kg	Ácido fólico (min.)	6 mg/kg
Extrato etéreo (min.)	75 g/kg	Niacina (min.)	120 mg/kg
Matéria mineral (máx.)	120 g/kg	Biotina (min.)	0,6 mg/kg
Fibra bruta (máx.)	50 g/kg	Ácido pantotênico (min.)	40 mg/kg
Cálcio (min./ máx.)	10/ 35 g/kg	Vitamina A (min.)	10000 UI/kg
Fósforo (min)	7000 mg/kg	Vitamina B1 (min.)	20 mg/kg
Sódio (min.)	2400 mg/kg	Vitamina B12 (min.)	24 µg/kg
Magnésio (min.)	37 mg/kg	Vitamina B2 (min.)	20 mg/kg
Lisina (min.)	24 g/kg	Vitamina B6 (min.)	20 mg/kg
Metionina (min.)	7100 mg/kg	Vitamina C (min.)	400 mg/kg
Zinco (min.)	120 mg/kg	Vitamina D3 (min.)	3200 UI/kg
Cobre (min.)	30 mg/kg	Vitamina E (min.)	120 UI/kg
Ferro (min.)	52,5 mg/kg	Vitamina K3 (min.)	12 mg/kg
Manganês (min.)	75 mg/kg	Inositol (min.)	80 mg/kg
Cobalto (min.)	0,72 mg/kg	Mananoligossacarí-deo	500 mg/kg
Iodo (min.)	1,5 mg/kg	Beta glucanas	875 mg/kg
Selênio (min.)	0,3 mg/kg		