

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

**PERFIL DE CORTISOL, GLICEMIA E DE PARÂMETROS
SANGUINEOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO, *Rana catesbeiana*, EM
DIFERENTES DENSIDADES E APÓS EXPOSIÇÃO AÉREA**

Patrícia Coelho Teixeira
Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO
Agosto de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**PERFIL DE CORTISOL, GLICEMIA E DE PARÂMETROS
SANGUINEOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO, *Rana catesbeiana*, EM
DIFERENTES DENSIDADES E APÓS EXPOSIÇÃO AÉREA**

Patrícia Coelho Teixeira
Zootecnista

Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maris Ferreira

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO

Agosto de 2007

T266p Teixeira, Patricia Coelho
Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea / Patricia Coelho Teixeira. – – Jaboticabal, 2007
viii, 86 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, 2007
Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Maria Isabel Mataqueiro
Bibliografia

1. Ranicultura. 2. Estresse. 3. Hematologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.95

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

*“Muitas coisas na vida não podem ser explicadas,
somente presenciadas...”*

(Rachel Naomi Remen)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo Amor e Carinho

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

Agradecimentos:

À Deus por mais esta etapa.

À minha família, Amauri, Maria Helena e irmãos Fabio e Gabriela “garça” e ainda a minha noninha Ida por toda a força que me deram. Amo vocês!

Ao CAUNESP/Jaboticabal e ao Instituto de Pesca/SP pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dr^a Maria José Tavares Ranzani Paiva, “mãezé” pela orientação, ensinamentos e amizade.

À Dr^a. Cláudia Maris Ferreira por TODA a ajuda que me deu.

Às minhas queridas amigas do “Pé redondo”, Adriana Fernandes de Barros, Cristiane Meldau de Campos e Elisandra Winkaler, que estiveram comigo em todos os momentos da “cidade das rosas”. EU ADORO VOCÊS!!!

Aos amigos Pós-graduandos do CAUNESP, Adriana Fernandes de Barros, Cristiane Meldau de Campos, Elisandra Winkaler, Eduardo Abimorad, Daniela Castelani, Renato Faria, Luis Paggi, Camilo Prieto, Michele Vetorelli, Fabiana Pilarsk, Raquel Prehl, Luciana Crema, Carolina Portela, Marina Delbon, e Danielle de Carla Dias.

Às amigas de sala do Instituto de Pesca/SP Fernanda Menezes França Salgueiro e Danielle de Carla Dias. Valeu pela grande ajuda de vocês!.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, Dra Cláudia Maris Ferreira, Dra Maria José Tavares Ranzani Paiva, Dra. Elizabeth Romagosa, Dr. Júlio Vicente Lombardi, Dr. Hécio Luiz de Almeida Marques, Dr. Nilton Rojas, Dr. Carlos Ishikawa, Dra Cacilda Thais J. Mercante e Dorival Fontanello (*in memorian*), com quem pude aprender muitas coisas durante todos estes anos de convivência.

Aos estagiários do Instituto de Pesca, Fernanda Menezes França Salgueiro, Danielle de Carla Dias, Guilherme Casoni Rocha, Antonio Antonucci, Flávia Maziero, Natália Caruso, Silvia Napoleão, Solange de Carvalho, Robson Seriani pela convivência, amizade e ajuda.

Aos motoristas do Instituto de Pesca/SP, João Batista, Sergio, Rafael, Marcão, e José, pelas aventuras em viagem.

Ao pessoal do Ranário de “Pinda”, Andréia Pimenta, Ramiro Rezende e Adriana Sacioto.

Aos professores e funcionários do CAUNESP, por toda a paciência em nos transmitir um pouco dos seus conhecimentos.

Ao Marcio “perereca”, técnico responsável pelo Ranário experimental do CAUNESP, e ao funcionário Junior pela “mãozinha” que me deram.

Ao pessoal da Fisiologia, Bel, Damares, Janessa e demais colegas pelos momentos de convivência e aprendizado.

À Margarete Braga da Gênese LTDA pela orientação quanto às análises de cortisol.

Ao Marcelo Laureto pelas dicas na estatística.

À Veralice Capatto o ANJO da guarda na secretaria da pós e Michele, pela amizade e toda ajuda.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo

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

Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	4
2.1 Histórico e Importância da Ranicultura	5
2.2 Estresse	6
2.2.1 Estresse em Anfíbios	11
2.3 Sangue	13
2.3.1 Sangue em Anfíbios	15
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. Material e Métodos	20
a) Material Biológico	21
b) Análises	21
c) Coleta de Sangue	24
4.1 Primeiro Experimento – Validação do ensaio e estresse por hipóxia	24
4.1.1 Material Biológico	24
4.1.2 Manejo Experimental	24
4.1.3 Coleta de Sangue	26
4.1.4 Validação do ensaio	26
4.2 Segundo Experimento – Estresse por desidade e hipóxia	26
4.2.1 Material Biológico	26
4.2.2 Manejo Experimental	27
4.2.3 Alimentação e Manejo	28
4.2.4 Coleta de Sangue	29
4.3. Análise Estatística	29
5. Resultados e Discussão	30
5.1. Parâmetros físico-químicos da água	31

5.2. Parâmetros Fisiológicos	32
5.2.1. Cortisol	32
5.2.2. Glicemia	39
5.3. Parâmetros Hematológicos	44
6. Conclusão	61
7. Referências Bibliográficas	63
8. Anexos	78

Lista de Figuras

- FIGURA 1** – Girinos de *R. catesbeiana* em fase inicial de exteriorização das patas posteriores utilizados na experimentação. 21
- FIGURA 2** – Material e Equipamentos utilizados para leitura do cortisol e glicemia, kit de cortisol e agitador (3A), lavadora (3B) e leitora de cortisol (3C); kit de glicemia (3D), banho Maria (3E) e espectrofotômetro para leitura de glicemia (3F) em experimento com girinos de *R. catesbeiana*. 22
- FIGURA 3** – Câmara de Neubauer (4A), esquema de retículo (4B) para contagem dos glóbulos vermelhos (R) e leucócitos (W) e detalhe do retículo central (4C); microhematócrito e leitor (4D), centrífuga de hematócrito (4E); cianometahemoglobina (4F), centrífuga de tubos (4G) e espectrofotômetro para leitura de hemoglobina (4H); confecção de extensões sanguíneas (4I), esquema do procedimento da Contagem Diferencial e Total de Leucócitos e Total de Trombócitos (4J) em experimento com girinos de *R. catesbeiana*. 23
- FIGURA 4** – Delineamento experimental utilizado no 1º estudo com girinos de *R. catesbeiana*. 25
- FIGURA 5** – Delineamento experimental utilizado no 2º estudo com girinos de *R. catesbeiana*. 28
- FIGURA 6** - Valores medianos de cortisol plasmático nos tempos de coleta, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 35
- FIGURA 7** – Valores medianos de cortisol plasmático nos tratamentos, T1 – 1 girino/L; T2 – 5 girinos/L e T3 – 10 girinos/L, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 36

- FIGURA 8** - Valores medianos de cortisol plasmático nas condições, normóxia (N) e hipóxia (H), dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 37
- FIGURA 9** - Valores medianos de cortisol plasmático nos dias de coleta, 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias, dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 38
- FIGURA 10** – Valores medianos de glicose nos tratamentos, T1 – 1 girino/L; T2 – 5 girinos/L e T3 – 10 girinos/L, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 41
- FIGURA 11** - Valores medianos de glicose nas condições, normóxia (N) e hipóxia (H), dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% respectivamente. 42
- FIGURA 12** - Valores medianos de glicose nos dias de coleta, 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias, dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente. 43
- FIGURA 13** - Valores médios dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação. 47

- FIGURA 14** - Valores médios dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R.catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta; 0 (MZ), ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias. 48
- FIGURA 15**- Valores médios dos números absolutos de trombócitos de girinos de rã-touro, *R.catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação. 50
- FIGURA 16** – Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de rã-touro *R. catesbeiana*; Er (eritrócito), Bs (basófilos), Es (eosinófilos), Nt (neutrófilos), Lf (linfócitos), Mn (monócitos) e Tb (trombócitos). Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X. 52
- FIGURA 17**- Valores médios dos números relativos de leucócitos de girinos de rã-touro, *R.catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação. 56
- FIGURA 18** - Valores médios dos números absolutos de leucócitos de girinos de rã-touro, *R.catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação. 57

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Valores medianos de cortisol (ng/mL) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos à exposição aérea nos diferentes tempos (minutos) de coleta.	33
TABELA 2 – Valores medianos de cortisol (ng/mL) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta.	33
TABELA 3 - Valores medianos de glicemia (mg/dL) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta.	39
TABELA 4 - Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação.	44
TABELA 5 - Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta.	45
TABELA 6 - Valores médios e erro padrão de trombócitos (trombócitos /mm ³) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação.	50
TABELA 7 - Valores médios e erro padrão de leucócitos, em porcentagem, de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação.	53
TABELA 8 - Valores médios e erro padrão de leucócitos, em número absoluto, de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação.	54

RESUMO

TEIXEIRA, P.C. **Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea.** Jaboticabal, 2007. 86p. Dissertação (Mestrado) Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Estudar o sangue significa monitorar a saúde dos animais reduzindo, desta forma, as perdas por doenças ou injúrias, seja frente a um determinado tipo de estressor, por sistemas de criação não apropriados, por manejos inadequados ou ainda por alterações ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fisiológica de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em diferentes densidades e após exposição aérea. O experimento foi realizado em duas etapas utilizando-se de animais entre os estágios 31 a 39, na fase de pré-metamorfose; na primeira etapa, realizada no CAUNESP – UNESP/SP, avaliou-se somente a exposição aérea nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Na segunda etapa, realizada no Instituto de Pesca - APTA/SP foi avaliada a densidade de estocagem sendo testados 1 girino/L (Tratamento 1), 5 girinos/L (Tratamento 2) e 10 girinos/L (Tratamento 3), conduzidos em 3 réplicas simultâneas, e a exposição aérea nos dias 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias. O sangue foi retirado por rompimento do vaso caudal na condição de Normóxia - N (tempo zero) e Hipóxia - H (tempo de 15 minutos de exposição ao ar). Avaliou-se, na primeira etapa, somente o cortisol plasmático e na segunda etapa, cortisol plasmático, glicemia, hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, os índices hematimétricos absolutos - VCM, HCM e CHCM, contagem diferencial de leucócitos e contagem total de leucócitos e trombócitos. Foi observado um aumento nos valores de cortisol, aos 4 e 8 dias de exposição aérea retornando aos valores basais ao final do experimento, apesar de não haver diferenças significativas. A glicemia foi influenciada no tratamento com 10 girinos/L mostrando forte correlação com a hipóxia. Os parâmetros hematológicos, principalmente, o número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos mostraram diferença significativa aos 12 dias de experimentação quando comparados com o momento zero; concluindo-se que, em condições controladas, o adensamento de até 10 girinos/litro e a exposição aérea por 15 minutos não provocou mortalidade em girinos de rã-touro durante o período experimental.

Palavras-chave: Ranicultura, Estresse, Hematologia

ABSTRACT

TEIXEIRA, P.C. **Profile of cortisol, glicemy and blood parameters in bullfrog's tadpole (*Rana catesbeiana*) at different densities and after air exposition.** Jaboticabal, 2007. 86p. Dissertation (MSc) Aquaculture Center, São Paulo State University.

Studying blood means monitoring animals health reducing losses by disease or injury caused by certain kinds of stress related to improper rearing systems, handling or alterations in the environment. The aim of this study was to evaluate bullfrog's tadpole physiological answer (*Rana catesbeiana*) to different densities and air exposition. The experiment was carried out in two parts using animals, at the pró-metamorphosis phase, on the first part carried out at CAUNESP – Aquaculture Center, São Paulo State University was evaluated only air exposition, which animals were sampled on zero, fifteen, thirty, forty five, sixty and ninety minutes and on second part, carried out at Fisheries Institute - APTA/SP was evaluated different densities and air exposition, which stocking densities was 1 tadpole/L (treatment one), 5 tadpoles/L (treatment two) and 10 tadpoles/L (treatment three) with three simultaneous replicates and animals were sampled on zero, ¼ (six hours), four, eight and twelve experimental days. Blood was collected by breaking tail blood vessel at normoxic (zero time) and hipoxic (fifteen minutes by air exposition) conditions. Only cortisol was evaluate on the first part and on second, cortisol, glicemy, hematocryts, haemoglobin tax, counting of erythrocyte's number, absolute hematimetrycs indices -MCV, MCH and MCHC, differential counting of leucocytes, total counting of leucocytes and trombocytes were evaluated. An increase in plasmatic cortisol was observed at four and eight days of the experiment, returning to initial values after 12 days. Glicemy values increased at treatment three, showing strong correlation with hypoxia. Hematological parameters as linphocytes, neutrophils and eosinophils numbers at the 12th day of the experiment showed differences comparing to zero day; concluding that stocking densities until 10 tadpoles/L and air exposition for 15 minutes didn't cause mortality to bullfrog's tadpoles in the experimental period in controlled conditions.

Key-word: bullfrog, Frog culture, Stress, Hematology

1 - INTRODUÇÃO

A criação de girinos e imagos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) saudáveis é uma etapa fundamental para o bom andamento de qualquer ranário. Segundo RIBEIRO FILHO (1998), na maioria dos ranários comerciais observa-se ocorrência de mortalidade de girinos por problemas de manejo, deficiência alimentar, instalações inadequadas, má qualidade de água e por doenças bacterianas e fúngicas.

O sangue é de fundamental importância para a avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos animais pois encontra-se em contato com órgãos, tecidos e células e reage sensivelmente a todas as alterações que aí ocorrem (RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 1999). É através deste fluído biológico, que se realiza, por exemplo, quantificações de determinados biomarcadores, como cortisol e glicose, que junto com as demais figuras sanguíneas são indicadores da sanidade dos animais de cultivo.

Segundo BARTON e IWAMA (1991), o conceito de estresse cumulativo é importante para os aquicultores, pois indica que distúrbios sub-letais, que não parecem problemáticos, podem se acumular e, se o período entre eles for insuficiente para recuperação, pode haver efeito detrimental individualmente e na população.

O estresse ocasionado por fatores como sistemas de criação não apropriados, manejos físico, profilático, sanitário e alimentar inadequados, alterações na temperatura ou na luminosidade do ambiente, alterações nos parâmetros físicos e químicos da água, bem como ruídos, presença de outros animais ou pessoas pode ser considerado porta de entrada para muitas doenças ocasionando o insucesso das criações comerciais de rãs (FERREIRA *et al.*, 2001).

Segundo HIPOLITO (1995), práticas preventivas devem ser baseadas nos três manejos básicos: o zootécnico, o nutricional e o higiênico sanitário, o “princípio do tripé”, de forma a garantir a perfeita qualidade da produção animal. Caso contrário, possíveis

falhas levam ao desequilíbrio do mesmo comprometendo a saúde das rãs e, conseqüentemente, causando perdas zootécnicas e econômicas.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e importância da Ranicultura

A ranicultura paulista teve seu início em 1939 através do fomento realizado pela Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo e se solidificou no país (FONTANELLO, 1994).

Desde a sua importação, originária dos Estados Unidos, a rã-touro (*Rana catesbeiana*) tem demonstrado ótima capacidade de adaptar-se aos diferentes regimes climáticos brasileiros, e aos diferentes manejos físicos e alimentares típicos de cada região, o que permitiu que se recomende o seu cultivo nacionalmente (FONTANELLO e FERREIRA, 1999). Atualmente, pode-se dizer que esta rã é a única espécie utilizada pelos ranários comerciais brasileiros. Este fato deve-se às suas características zootécnicas tais como: rusticidade (facilidade de manejo), precocidade (crescimento rápido) e prolificidade (alto número de ovos por postura), bem como ao fato de que poucas ocorrências têm sido registradas, sob o aspecto patológico, com morte em caráter epidêmico. Outras espécies de rãs nativas do Brasil, como a rã-pimenta, a rã-manteiga ou paulistinha, também podem ser criadas em cativeiro, mas apresentam, comparativamente com a rã-touro, até o momento, menor desempenho produtivo e maiores dificuldades técnicas e burocráticas para sua criação (FERREIRA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2003).

Estes mesmos autores afirmam que a produção e desenvolvimento da *R. catesbeiana* no Brasil apresentam-se superiores a do seu país de origem. Esta afirmativa apóia-se no ciclo da mesma para as condições brasileiras que, em média, não ultrapassa sete meses de duração para as fases de girino e engorda, enquanto na América do Norte chega a durar cerca de quatro anos.

A respeito da comercialização, praticamente toda a produção brasileira (cerca de 400 ton/ano) é absorvida pelo mercado interno. Apenas uma pequena parcela da produção é exportada para os EUA e, mais recentemente, vem conquistando espaço no mercado europeu, no que diz respeito não só à carne, mas também ao couro (FERREIRA *et al.*, 2003).

FONTANELLO (1994) afirma que fora do país a maior parte da carne de rã comercializada é ainda proveniente de caça predatória. Desta forma, os estoques naturais tendem a baixar devido à demanda sempre crescente. Ressalta-se que, em virtude da consciência ecológica existente, atualmente já foram elaboradas leis que proíbem a caça predatória, o que deverá incentivar o consumo de carne de rãs criadas em cativeiro, favorecendo, portanto, o Brasil como pioneiro no cultivo intensivo desses animais.

2.2 Estresse

O estresse tem sido um tema amplamente discutido na comunidade científica e vários aspectos relacionados à sua fisiologia e efeito têm sido abordados.

Estresse é o estado produzido por fatores, ambientais ou não, que provocam respostas adaptativas no animal frente à alteração da função orgânica normal (BARTON e IWAMA 1991).

Segundo WENDELAAR BONGA (1997), o estresse representa uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo animal, chamado de homeostase, é ameaçado ou perturbado por um conjunto de estímulos intrínsecos e extrínsecos, comumente definidos como estressores induzindo respostas fisiológicas que podem ser compensatórias e/ou adaptativas, capacitando o animal para superar as ameaças.

Estes estressores impõem um metabolismo composto por dois componentes: a demanda de energia requerida frente ao distúrbio e a energia para corrigir o balanço iônico BARTON e IWAMA (1991).

Os agentes estressores podem ser de origem química, biológica, física ou mesmo estar relacionado ao manejo dos animais. Entre os estressores de origem química destacam-se aqueles relacionados à qualidade de água (níveis de oxigênio dissolvido, pH, entre outros) e à presença de poluentes, estes decorrentes, na maioria das vezes, de ações do homem sobre a natureza (VAL *et al.*, 2004). Segundo BARAS *et al.* (2000), o parasitismo e a interação com outros animais da mesma espécie ou de outras espécies podem estressar os peixes, particularmente aqueles mantidos em cativeiro. Esse tipo de estresse pode ter efeitos diferentes nas diferentes fases de vida dos animais, como é o caso do canibalismo entre jovens de algumas espécies. Por sua vez, a temperatura e a luminosidade podem causar estresse nos animais, alterando ritmos circadianos e inibindo, inclusive, algumas atividades biológicas de rotina.

BARTON e IWAMA (1991) diferenciam a resposta ao estresse em resposta aguda e resposta crônica. A primeira geralmente ocorre em manejos, como biometria e transporte. Esta resposta é fortemente imunossupressora, levando a perdas. O segundo tipo de resposta, a crônica, acontece em condições que mantenham os organismos aquáticos por longo período em situações estressantes, como pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido na água e superpopulação, e que podem levar a baixo crescimento e ganho de peso.

É difícil identificar o exato momento em que o efeito de um estímulo começa a afetar a condição fisiológica normal do animal. Contudo, no momento em que os efeitos na regulação osmótica e eletrolítica são aparentes, a saúde já pode estar comprometida (EDDY, 1981; McDONALD e MILLIGAN, 1997).

O estresse propriamente dito não pode ser mensurado e apenas as respostas ao estímulo podem ser quantitativamente determinadas para refletir seu grau ou severidade (BARTON e IWAMA, 1991). Provavelmente, a duração e a magnitude da resposta de estresse são dependentes da severidade e da duração do estressor a que os animais foram submetidos (BARTON *et al.*, 1980; SUMPTER *et al.*, 1985).

Segundo BARTON e IWAMA (1991), o conceito de estresse cumulativo é importante, pois indica que distúrbios sub-letais, que não parecem problemáticos, podem se acumular e, se o período entre eles, for insuficiente para recuperação do organismo, pode haver efeito detrimental nos animais, de forma individual e na população. A reação de estresse prepara o animal para a situação chamada “fight or flight” (luta ou fuga), ou seja, os animais submetidos ao estímulo fogem, evitando o estressor, ou se não podem fazê-lo, reagem e lutam para conviver com o estressor. A resposta de estresse agudo envolve dois componentes do sistema neuro-endócrino. O sistema simpático cromafim que estimula as células cromafins para a liberação de catecolaminas, cuja resposta é rápida e produz um efeito imediato. Já, o sistema hipotálamo-pituitária-interrenal consiste na estimulação em cascata, de modo mais lento, que culmina na liberação do cortisol pelas células do tecido interrenal.

As respostas de estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (WEDEMEYER e McLEAY, 1981). As respostas primárias são hormonais, as secundárias são as mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento na suscetibilidade a doenças (BARTON e IWAMA 1991).

A primeira categoria é uma reação de alarme, que causa aumento das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides (principalmente cortisol). A segunda categoria caracteriza-se por um estado de resistência que produz

efeitos metabólicos como aumento dos batimentos cardíacos, do consumo de oxigênio, alterações na glicemia, no hematócrito e no número de leucócitos. A terceira e última categoria é um estado de exaustão que causa a queda de desempenho e a diminuição da resistência a doenças e conseqüente contaminação dos animais por bactérias e fungos oportunistas podendo levá-los à morte (BARTON e IWAMA 1991 e WENDELAAR BONGA, 1997).

Em peixes, na resposta primária, segundos após a presença do estímulo, o sistema nervoso simpático estimula diretamente as células cromafins que liberam as catecolaminas (especialmente a adrenalina) aumentam os batimentos operculares, estimulam o fluxo de sangue nas brânquias e aumentam a capacidade de transporte de oxigênio no sangue (FABRI *et al.*, 1998), além de disponibilizar glicose de forma rápida. Ao mesmo tempo, a hipófise estimulada pela secreção de CRH (hormônio liberador de corticotrófico) do hipotálamo, libera ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) na corrente sanguínea e provoca a liberação de cortisol de células presentes no rim cefálico (BARTON e IWAMA, 1991). No processo de estresse, as catecolaminas são liberadas rapidamente frente ao estressor e, juntamente com o cortisol, a insulina, o glucagon e o hormônio tireoidiano são considerados glicoregulatórios (FABBRI *et al.*, 1998).

Os indicadores mais utilizados na avaliação do estresse, e que normalmente apresentam uma boa resposta, são o cortisol plasmático e a glicose (BARTON e IWAMA, 1991; MORGAN e IWAMA, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997).

O cortisol tem como funções a regulação no metabolismo de carboidratos e de proteínas, crescimento, osmoregulação e adaptação, mas a sua principal função é estimular a resistência ao estresse. Quando em excesso ele diminui as proteínas musculares,

a função imune, o desempenho do animal, e ao mesmo tempo aumenta o balanço hidromineral, o glicogênio hepático e ácidos graxos (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Geralmente, o cortisol é hiperglicêmico, ou seja, é acompanhado de hiperglicemia, cujo papel é de proporcionar energia para a fuga ou enfrentamento da situação adversa (WENDELAAR BONGA, 1997).

Segundo MOMMSEN *et al.* (1999), a hiperglicemia verificada em condições de estresse (causada inicialmente pelas catecolaminas) é originada pela glicogenólise no fígado e mantida pelo cortisol por mecanismos neoglicogênicos, sendo esta importante resposta secundária ao estresse. MAZEAUD *et al.* (1977) sugerem que este aumento no nível da glicose plasmática causado por um estresse de curta duração é devido ao efeito de catecolamina, enquanto que a manutenção dos níveis elevados da glicose, em estresse prolongado, é devido ao efeito do cortisol. Todas essas respostas visam manter uma quantidade de energia necessária para manutenção das atividades metabólicas normais e, em caso de fuga, suprir a demanda excessiva dos músculos.

A função da glicose no organismo limita-se quase que exclusivamente a fornecer energia. É armazenada no fígado sob a forma de glicogênio e, quando a quantidade de cortisol encontra-se aumentada, as células hepáticas convertem os aminoácidos e o glicerol em glicose, através do processo chamado de gliconeogênese. A nova glicose produzida pela gliconeogênese atua de forma a promover o aporte energético para enfrentar maior demanda ocasionada pela resposta ao estresse e promover o depósito de glicogênio no fígado, para eventuais situações em que ele volte a ser necessário (MOMMSEN *et al.* 1999).

A hipersecreção de catecolaminas e corticosteróides também induzem mudanças hematológicas em peixes (MAZEAUD *et al.*, 1977). O estresse causa hemodiluição ou hemoconcentração em muitas espécies, alterando os valores de hematócrito e outros

parâmetros hematológicos (McDONALD e MILLIGAN, 1997). A diminuição do hematócrito tem sido observada em várias espécies submetidas a estímulos estressantes agudos (CHEN *et al.*, 1995).

Estratégias hematológicas ocorrem para aumentar o fornecimento de O_2 para o organismo, entre elas estão estímulo à troca Na^+/H^+ e a inibição da Cl/HCO_3^- , através da membrana dos eritrócitos. Isto resulta em diminuição do pH plasmático e alcalinização do citoplasma, aumentando a afinidade da hemoglobina com o oxigênio (efeito Root). Segundo GILMOUR (1997), outra forma de aumentar o carreamento de oxigênio é o recrutamento de novos eritrócitos através da contração do baço por efeito adrenérgico.

A quantidade de leucócitos, responsáveis pela produção de anticorpos, também fornece boa indicação do estado de saúde do animal. A redução do número de linfócitos normalmente é considerada como resposta de estresse, visto que o cortisol atua como bloqueador de interleucina (CHEN *et al.*, 2002). Um aspecto importante é que todas essas alterações consomem energia e, no momento em que esses estímulos se tornam crônicos, a tendência é acontecerem os efeitos terciários.

2.2.1 Estresse em anfíbios

Em sistema intensivo de criação, a ocorrência de situações estressantes é inevitável. Durante o período de criação, os animais são submetidos a inúmeros manejos e a variações ambientais. As consequências são geralmente a redução do crescimento, ganho de peso, desempenho reprodutivo e da resistência a patógenos (BARTON e IWAMA, 1991).

Na ranicultura, o estresse é um dos grandes problemas e pode ser porta de entrada para muitas doenças ocasionando o insucesso da atividade. Pode ser causado por fatores como:

sistemas de criação não apropriados, manejos físico, profilático, sanitário e alimentar inadequados, alterações na temperatura ou na luminosidade do ambiente, alterações nos parâmetros físicos e químicos da água, bem como ruídos, presença de outros animais ou pessoas e outras interferências (FERREIRA *et al.*, 2001).

Sabe-se, por observações comportamentais, que as rãs são animais que se estressam com facilidade (DUELLMAN e TRUEB, 1986). Na reprodução, sinais de estresse como abortos e emissão de gritos característicos são observados em fêmeas e, em machos, a ausência dos coachos. Ainda, animais nesta situação procuram ficar escondidos, seja embaixo da água ou embaixo de abrigos de proteção, até que se sintam menos ameaçados. Na pré-engorda e engorda verifica-se o comportamento de empilhamento das rãs nos cantos das baias, ou saltos desnorteados, além do aparecimento de peles em excesso nas áreas úmidas. Algumas vezes chega-se até a visualizar muco em forma de espuma com odor discreto e característico. Em girinos, verifica-se a falta de apetite, apatia, nado desnorteado, entre outras características (LIMA e AGOSTINHO, 1992; FERREIRA *et al.*, 2001).

Estudos sobre estresse em ranicultura são escassos. Segundo KRUG *et al.* (1983) e WRIGHT *et al.* (2003), o cortisol varia de acordo com o ciclo de luz (18:6, 12:12 e 6:12) para os diferentes estágios de desenvolvimento em girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*) encontrando valores mais baixos na pro-metamorfose e valores mais altos no clímax da metamorfose

A glicose na rã que, em sua maioria deve ser sintetizada, provavelmente serve para manter as reservas de glicogênio no músculo, que são usadas para glicólise anaeróbica quando o animal está envolvido na predação, escape ou outras atividades musculares. Se outros tecidos e órgãos requerem glicose como combustível, a quantidade deve ser excepcionalmente pequena. Os estudos indicam ainda que, na ausência de estresse, os carnívoros ectotérmicos

utilizam em primeiro lugar proteínas e/ou lipídios melhor do que a glicose (ROOS e RUMPF 1987).

As reservas de carboidratos dos anfíbios anuros estão relacionadas principalmente com o ciclo reprodutivo e estação do ano (SMITH, 1954; PASANEN e KOSKELA, 1974; BYRNE e WHITE, 1975; FARRAR e FRYE, 1977, 1979). Os níveis de glicogênio no fígado e músculo são normalmente maiores no final do outono e início de inverno que ao final da primavera e verão, enquanto os níveis de açúcar no sangue são geralmente maiores no verão que no inverno, ocorrendo um pico durante o período de reprodução.

O verão é um período de grande atividade, maior taxa metabólica, maior ingestão de alimento e pico de taxa de crescimento quando comparado com a hibernação no inverno, onde esses processos são mínimos. A primavera está associada com atividade de desova acompanhada pela queda de níveis de glicogênio e um pico na glicose sanguínea. Entretanto, não é conhecido se este pico é uma consequência direta da regulação hormonal glicogenolítica ou é um efeito indireto de vários hormônios reprodutivos e/ou metabólicos como a tiroxina. O outono é um período transitório entre verão e inverno onde são realizados ajustes fisiológicos na preparação para o inverno (FARRAR e FRYE, 1977).

2.3 Sangue

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue. Grande parte das informações consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais e anormais. A aplicação da hematologia em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004a).

O sangue dos vertebrados é um tecido líquido e móvel, onde está presente uma categoria de células livres do tecido conjuntivo e que está em equilíbrio com, praticamente, todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (KALASHNIKOVA, 1976).

O plasma, líquido amarelado e semitransparente, é formado por cerca de 90% de água e 10% de substâncias sólidas, entre as quais se encontram proteínas, sais minerais, glicose, uréia, aminoácidos, colesterol, gorduras, gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico), hormônios, enzimas, anticorpos, etc (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os glóbulos vermelhos, também chamados hemácias ou eritrócitos na maioria dos vertebrados, formam-se e amadurecem na medula óssea pelo processo que se denomina eritropoiese. SCHMIDT-NIELSEN (1996) ressalta que nos mamíferos, os glóbulos vermelhos são anucleados, têm forma de discos esféricos e são ligeiramente bicôncavos.

Os glóbulos brancos, ou leucócitos, são de dois tipos: os agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, que são produzidos nos lóbulos linfáticos e no baço e constituem os linfócitos e os monócitos; e os granulócitos, que se formam na medula óssea e se classificam em neutrófilos, basófilos e eosinófilos, cujos citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelos corantes de Romanowsky, corando-se pelas cores neutras, básicas ou ácidas, respectivamente. A principal função dos glóbulos brancos é a defesa do organismo contra a ação de corpos estranhos que penetrem nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Segundo COOPER (1967), os granulócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos apresentam atividade fagocitária, estando intimamente relacionados com os mecanismos de defesa do hospedeiro, particularmente contra bactérias. Os agranulócitos, monócitos apresentam marcante atividade macrofágica, enquanto os linfócitos estão relacionados com a estimulação do crescimento dos tecidos e à síntese de anticorpos.

As plaquetas, ou trombócitos, são corpúsculos anucleados em forma de disco, têm sua origem a partir de fragmentos do citoplasma de células gigantes da medula óssea, os megacariócitos e sua função está primariamente ligada à coagulação sangüínea.

A análise dos padrões sanguíneos fornece subsídios importantes para o auxílio do diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (MODRÁ e SVOBODOVÁ, 1998). As variáveis da série vermelha, eritrograma, são de grande valia na identificação de processos anemiantes (MAHONEY e McNULTY, 1992), enquanto o leucograma pode ser empregado como auxílio diagnóstico nos processos infecciosos (RANZANI-PAIVA e EIRAS, 1992) e outros estados de desequilíbrio homeostático. Assim, é necessário conhecer os valores hematológicos de cada espécie, além de estabelecer suas particularidades (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004b).

2.3.1 Sangue em anfíbios

A grande maioria dos estudos realizado com o sangue de anuros refere-se aos glóbulos vermelhos, quantidade de hemoglobina e proteínas do sangue. Assim, os critérios adotados pelos hematologistas para estabelecimento da nomenclatura dos elementos figurados do sangue de anfíbios larvais e adultos foram baseados em estudos comparativos, particularmente com peixes teleósteos (ELLIS, 1977).

O sangue dos anfíbios é composto por plasma contendo os eritrócitos, leucócitos e trombócitos (DUELLMAN e TRUEB, 1986; FERREIRA, 2002).

Em termos quantitativos, o número de células do sangue apresenta sensíveis variações em função do sexo, espécie, fases da metamorfose, estado nutricional, sazonalidade e temperatura (JIRGENSEN e LARSEN, 1967).

Em anfíbios em fase larval, os eritrócitos são elípticos, achatados e nucleados. Cada eritrócito mede aproximadamente 14 por 23 μm e ocorrem 400.000 ou mais deles por mm^3 de sangue (DUELLMAN e TRUEB, 1986). Segundo TURNER (1988), os principais órgãos eritropoéticos nos girinos são o fígado e os rins e a seqüência de amadurecimento dos eritrócitos apresenta-se como sendo: eritróide precursor ou rubrócito $\rightarrow$ eritroblasto $\rightarrow$ eritoblasto policromático $\rightarrow$ reticulócito $\rightarrow$ eritrócito normocromático.

Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986), existem diferenças morfológicas entre os glóbulos vermelhos de formas adultas e larvais de anuros. Os eritrócitos dos girinos são maiores que os de rãs metamorfoseadas. Um dos fatores que contribui para esse processo é o fato dessas células, em girinos, possuírem maior quantidade de retículo endoplasmático. Nos anfíbios, os glóbulos brancos ou leucócitos são também nucleados e de nomenclatura semelhante àquela dos mamíferos, e, em média, existem em número próximo a 7.000 por mm^3 .

DUELLMAN e TRUEB (1986), TURNER (1988) e FERREIRA (2002) afirmam que os linfócitos são os leucócitos mais freqüentes no sangue periférico de anuros larvais. Apresentam núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico, algumas vezes apresentando microvilosidades (pseudopoidia). Os neutrófilos possuem freqüentemente núcleo segmentado. Os basófilos são figuras sangüíneas comuns no sangue periférico de anuros larvais, particularmente em girinos de *R. catesbeiana*, e mostram núcleo sem

segmentação e citoplasma com evidentes grânulos basofílicos. Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma. Os monócitos são raros e podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolado e fracamente basofílico. Os trombócitos são células nucleadas, com função similar às plaquetas dos mamíferos.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta fisiológica de estresse de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos a diferentes densidades de estocagem e exposição aérea.

3.2 Objetivo específico

Frente a estes mecanismos estressores analisar:

- os níveis de cortisol plasmático,
- a glicemia,
- a resposta hematológica

4 - MATERIAL E MÉTODOS

a) Material Biológico

Utilizou-se girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) entre os estágios 31 a 39 (GOSNER, 1960), ou seja, em fase inicial de exteriorização das patas posteriores nos dois experimentos (Figura 1).



FIGURA 1 – Girinos de *R. catesbeiana* em fase inicial de exteriorização das patas posteriores utilizados na experimentação

b) Análises

O cortisol foi analisado por meio do “kit” DSL[®] (Active – Cortisol EIA DSL10 – Diagnostic System Labs USA) com limite de detecção mínimo de 0,1 µg/dL e coeficiente de variação de precisão intra e inter ensaio de 5,9 e 8,7%, respectivamente, através do método Elisa. A glicemia foi analisada por meio do “kit” LABTEST[®] (GLICOSE PAP Liquiform), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 3 e Anexo 1).



FIGURA 2 – Material e equipamentos utilizados para leitura de cortisol e glicemia: kit de cortisol e agitador (3 A), lavadora (3 B) e leitora de cortisol (3 C); kit de glicemia (3 D), banho Maria (3 E) e espectrofotômetro para leitura de glicemia(3 F) utilizados em experimento com girinos de *R. catesbeiana*

Os parâmetros hematológicos analisados foram: contagem de eritrócitos (Er), em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente; determinação do hematócrito (Ht) (GOLDENFARB *et al.*, 1971); determinação da taxa de hemoglobina (Hb) (COLLIER 1944); contagem diferencial de leucócitos (CDL), contagem total de leucócitos (CTL) e contagem total de trombócitos (CTT) em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa, segundo ROSENFELD (1947) e o cálculo dos índices hematimétricos absolutos: VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média) (WINTROBE 1934) (Figura 4 e Anexo 2).

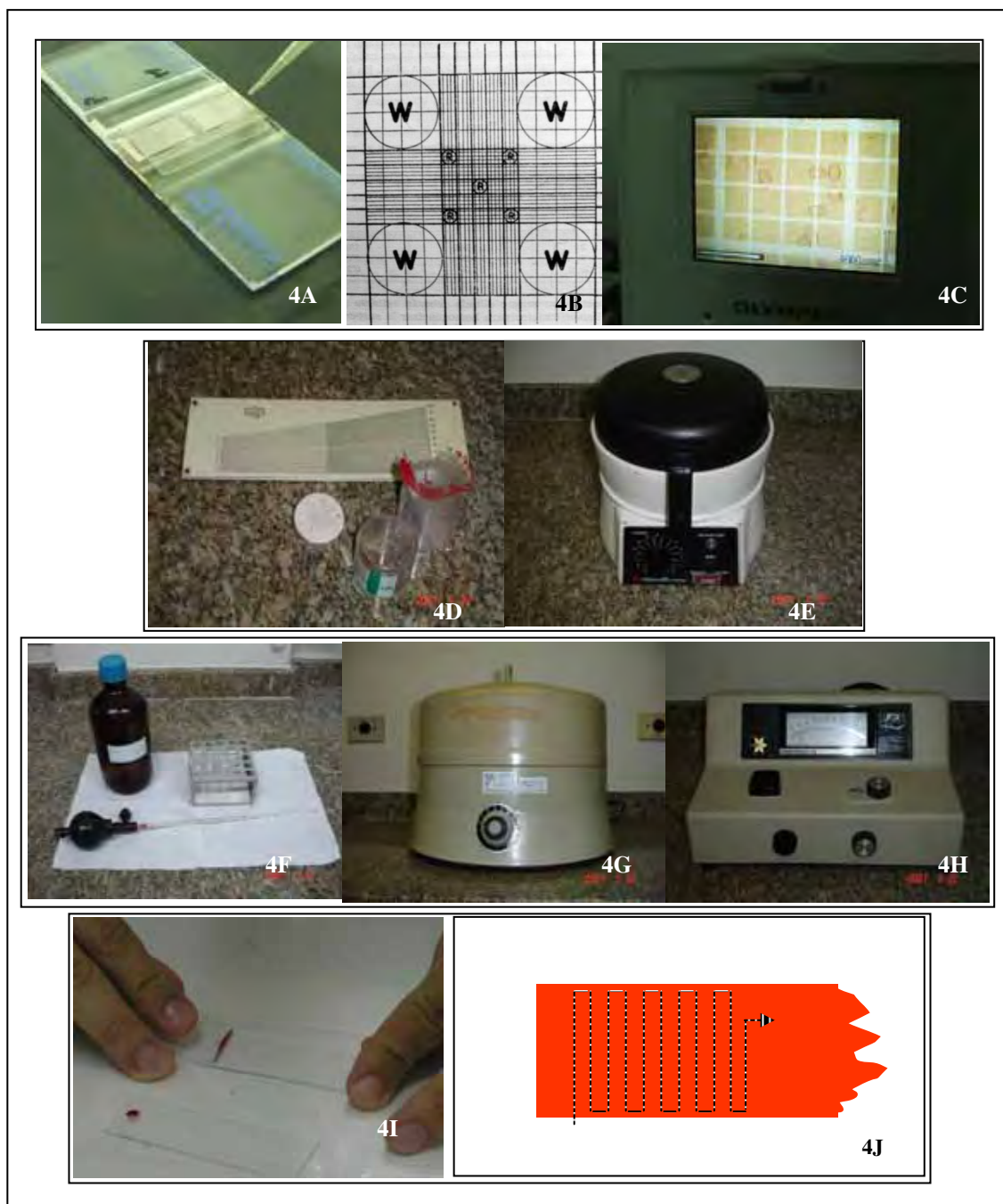


FIGURA 3 - Câmara de Neubauer (4 A), esquema do retículo (4 B) para a contagem de glóbulos vermelhos (R) e leucócitos (W) e detalhe do retículo central (4 C); microhematócrito e leitor (4 D), centrífuga de hematócrito (4 E); cianometahemoglobina (4 F), centrífuga de tubos (4 G) e espectrofotômetro para leitura da hemoglobina (4 H); Confecção das extensões sangüíneas (4 I), esquema do procedimento da Contagem Diferencial e Total de Leucócitos e Total de Trombócitos (4 J) utilizados em experimento com girinos de *R. catesbeiana*

c) Coleta de sangue

As amostras de sangue foram obtidas pelo rompimento do vaso caudal com auxílio de micropipetas, com ponteiros heparinizadas, no período da manhã, respeitando o ritmo circadiano. Utilizou-se a pomada LIDIAL[®] como anestésico local.

4.1 Primeiro Experimento - Validação do ensaio e Estresse por hipóxia

4.1.1 Material Biológico

Utilizou-se girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*) provenientes da Ranicultura do CAUNESP – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São Paulo/ UNESP Campus de Jaboticabal apresentando peso e comprimento médio de 9,68 g e 9,47 cm, respectivamente.

4.1.2 Manejo Experimental

Inicialmente, amostrou-se os animais na condição de normóxia, coleta imediata de sangue, (n=10) sendo retirados do tanque de girinagem, colocados em um balde de coleta e levados para extração de sangue no laboratório do devido setor. Já, os animais sob condição de hipóxia com coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar, (n=5) foram retirados do tanque de girinagem, levados em balde ao mesmo laboratório e distribuídos em seis

bandejas plásticas completamente secas sendo 15 girinos/bandeja e em seguida colocados sob exposição aérea por um período de quinze minutos. Após a exposição aérea adicionou-se água a estas bandejas de forma que os animais ficassem cobertos por completo e conseguissem se movimentar, seguindo-se a extração de sangue nos tempos de coleta de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Assim, amostrou-se 5 girinos/tempo na condição de hipóxia, totalizando dessa forma, 30 animais. Portanto durante o 1º experimento foi amostrado um total de 40 animais.

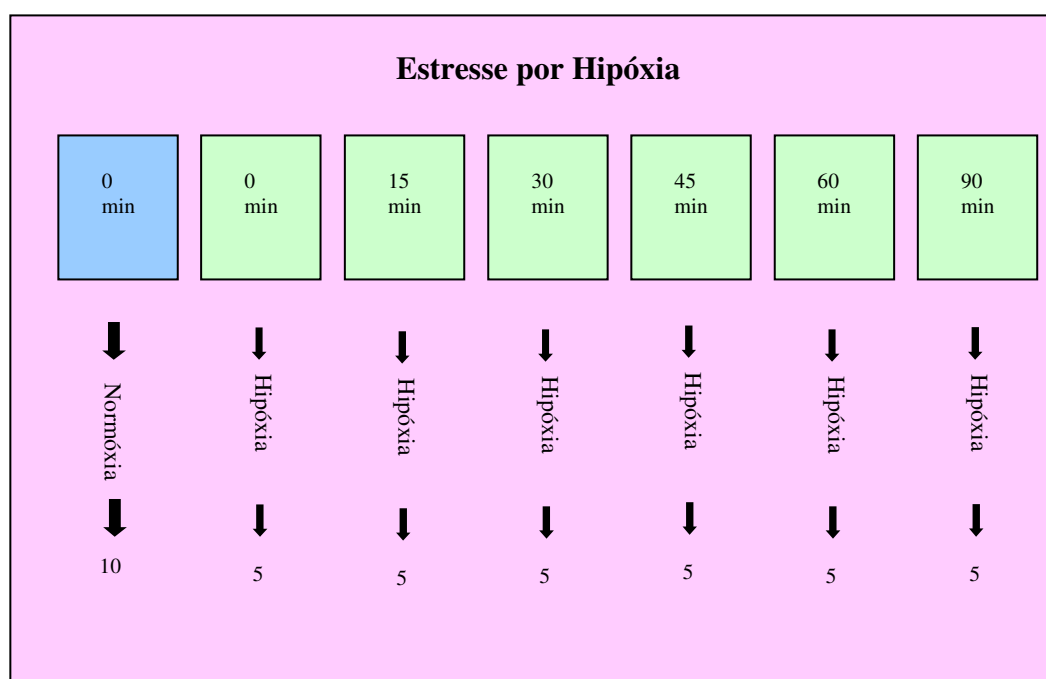


FIGURA 4 - Delineamento experimental utilizado no 1º estudo com girinos de *R. catesbeiana*

4.1.3 Coleta de Sangue

A alíquota de sangue (cerca de 70 μ L por animal) para análise do cortisol, foi coletada e acondicionada em micro tubos de polietileno previamente heparinizados e mantidos em gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos para a obtenção do plasma e congeladas para posterior análise.

4.1.4 Validação do ensaio

Objetivando verificar a confiabilidade do ensaio de cortisol para a espécie em questão foi calculado o coeficiente de variação intra-ensaio fazendo leitura de 38 duplicatas e inter-ensaio fazendo leitura de 5 triplicatas sendo as amostras pipetadas em diferentes pontos de duas placas do mesmo lote.

4.2 Segundo Experimento – Estresse por densidade e hipóxia

4.2.1 Material Biológico

Utilizou-se girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*) provenientes da propriedade particular “Sítio Santa Philomena” – Estrada da Serrinha, s/n - São Roque/SP apresentando peso e comprimento médio de 10,32 g e 11,18 cm, respectivamente.

4.2.2 Manejo experimental

Os girinos foram transportados para a Unidade Laboratorial de Referência em Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA), no Instituto de Pesca em São Paulo/SP, e aclimatados em um tanque de 240 litros, por um período de 7 dias. A seguir, foram mensurados e distribuídos em aquários, 20 girinos por unidade, na densidade de estocagem de 1 girino/L (Tratamento 1 – grupo controle); 5 girinos/L (Tratamento 2) e 10 girinos/L (Tratamento 3), com 20, 4 e 2 litros de água respectivamente, onde permaneceram por 12 dias. Em cada uma das densidades testadas, os organismos foram submetidos à condição de normóxia e hipóxia. Cada tratamento foi conduzido com três réplicas simultâneas e, para realização das análises, foram amostrados animais nos intervalos de tempo de 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias. No tempo 0 (momento zero), antes do adensamento, foram amostrados oito animais, ou seja, quatro animais na condição normóxia e quatro em hipóxia; já, para ¼ (6 horas), 4 e 8 dias, foram amostrados 2 animais/réplica/tratamento sendo 1 na condição de normóxia e 1 em hipóxia. Para a coleta final, aos 12 dias, foram amostrados 6 animais/réplica/tratamento, sendo 3 na condição de normóxia e 3 na de hipóxia. Assim, foram amostrados durante o 2º experimento um total de 116 animais (Figura 3).

Os animais sob condição de normóxia eram retirados dos aquários, colocados em recipiente com água e imediatamente levados para colheita de sangue. Já, os animais sob condição de hipóxia eram retirados dos aquários, expostos ao ar, por um período de quinze minutos, em caixa plástica umedecida e levados para a colheita de sangue.

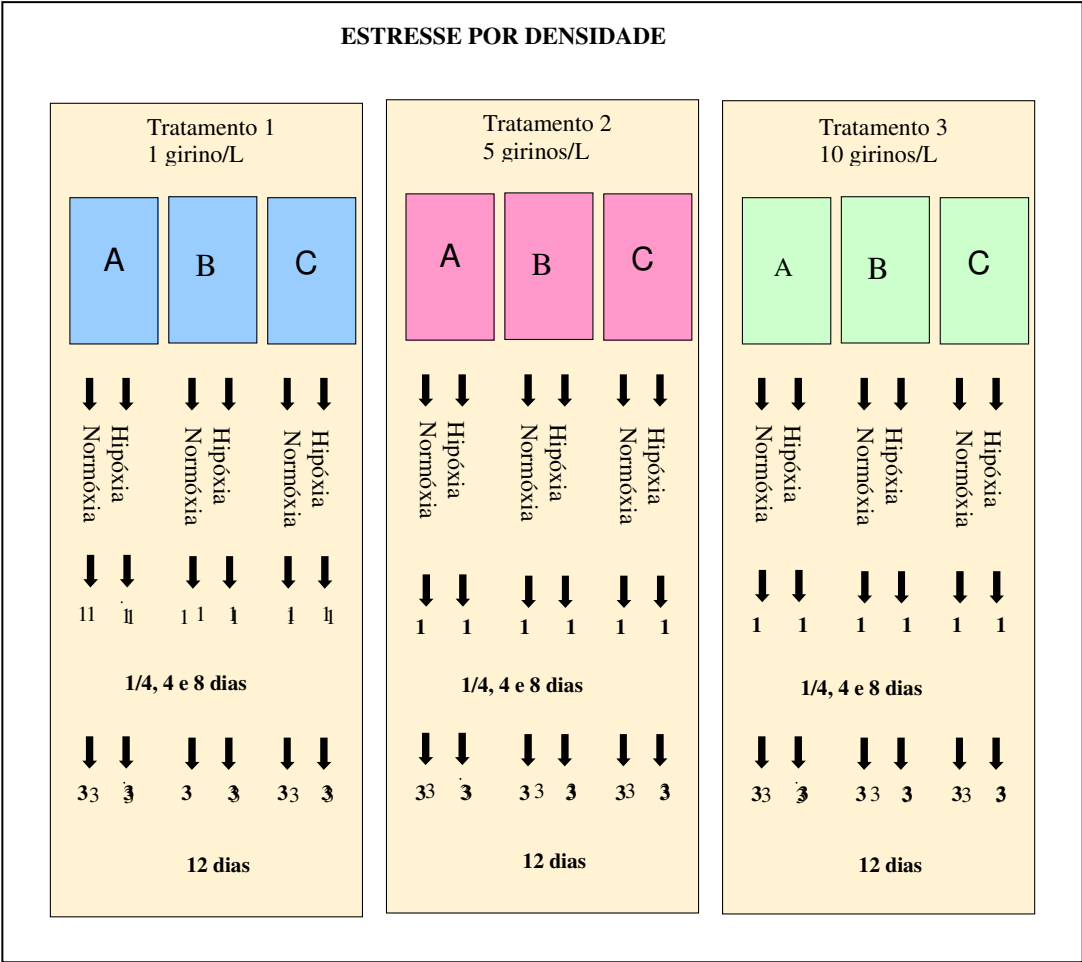


FIGURA 5 - Delineamento experimental utilizado no 2º estudo com girinos de *R. catesbeiana*

4.2.3 Alimentação e Manejo

Os animais foram alimentados com ração contendo 40% de proteína bruta, uma vez ao dia, na quantidade de 1% do peso vivo e mantidos sob aeração constante. A água dos aquários foi trocada em sua totalidade a cada 24 horas de maneira rápida a fim de causar o mínimo de perturbação aos animais. Diariamente, foram monitorados, antes da troca de água, os parâmetros físicos e químicos da água: temperatura, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito e, a cada 3 dias, foram monitorados dureza, alcalinidade e amônia

total. O fotoperíodo ambiente foi mantido em 12:12. A mortalidade foi acompanhada diariamente.

Os aquários utilizados no experimento foram previamente tratados com ácido clorídrico 10% e hidróxido de sódio 1% para descontaminação.

4.2.4 Coleta de Sangue

As primeiras alíquotas de sangue, cerca de 70 µL por animal, foram destinadas para análise do cortisol e glicemia sendo o restante do sangue, utilizado para determinações hematológicas seguindo metodologias já comentadas anteriormente.

As amostras para as dosagens de cortisol e glicemia bem como a série vermelha (hematócrito, hemoglobina e índices hematimétricos absolutos) foram obtidas nos tempos de 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias, sendo a série branca (CDL, CTL e CTT) realizada apenas para os tempos de 0 e 12 dias.

4.3 Análise estatística

A análise dos dados fisiológicos de cortisol e glicemia foi feita pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (NOETHER, 1983). Quando necessário foi realizado o agrupamento e ordenação dos dados de acordo com a variável de interesse. Para os parâmetros hematológicos utilizou-se a análise de variância “ANOVA” (ZAR, 1996), seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros hídricos analisados durante a experimentação não variaram entre os diferentes tratamentos e entre as réplicas.

As médias obtidas foram:

- Temperatura – $23,16 \pm 1,28$ °C
- pH – $7,43 \pm 0,21$
- Condutividade Elétrica - $88,42 \pm 29,51$ μ S/cm
- Oxigênio Dissolvido – $6,91 \pm 0,77$ mg/L
- Amônia Total – $2,54 \pm 0,66$ mg/L
- Amônia não ionizada (NH₃) – 0,04 mg/L
- Nitrito (NO₂⁻) – 0,10 mg/L
- Dureza Total: $18,42 \pm 6,34$ mg CaCO₃/L
- Alcalinidade Total: $25,53 \pm 11,69$ mg CaCO₃/L

Segundo PICKERING (1981), a deterioração da qualidade da água causa estresse crônico em criações intensivas de organismos aquáticos, porém os resultados evidenciam que os parâmetros físicos e químicos da água dos aquários mantiveram-se dentro dos padrões de exigência para a condução de testes de toxicidade com anfíbios (SCHUYTEMA e NEBEKER, 1999) e para as boas normas de cultivo desses organismos aquáticos, segundo CULLEY (1991). Isto pode ser ratificado por meio da observação de que os animais do tratamento 1 (grupo controle) não apresentaram alterações comportamentais e patológicas aparentes, o que se traduziu na ausência de mortalidade.

5.2 Parâmetros Fisiológicos

5.2.1 Cortisol

As catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, são liberadas e metabolizadas imediatamente após a ocorrência do fator estressante. Devido a essa particularidade da curva de liberação das catecolaminas, o parâmetro mais utilizado para avaliar a resposta ao estresse é o cortisol (BARTON e IWAMA, 1991).

A validação do ensaio para girinos de *R. catesbeiana* utilizando o kit de cortisol DSL10 teve como coeficiente de variação intra e inter ensaio 7,85 e 10,63, respectivamente, valores estes próximos aos indicados pelo fabricante, confirmando a validação do uso deste método para determinar os valores de cortisol em sangue de anfíbios anuros.

A Tabela 1 e 2 apresenta os valores medianos de cortisol plasmático encontrados para girinos de rã-touro no presente trabalho, nos diferentes tempos e dias de coleta, respectivamente.

TABELA 1 – Valores medianos de cortisol (ng/mL) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos à exposição aérea, nos diferentes tempos (minutos) de coleta.

Tempo de coleta		cortisol
0	N	3,45
0	H	4,30
15	H	2,30
30	H	3,30
45	H	3,30
60	H	3,40
90	H	3,60

(N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar; n=40

TABELA 2 – Valores medianos de cortisol (ng/mL) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea, nos diferentes dias de coleta

Tempo (dias)	T1		T2		T3	
	(N)	(H)	(N)	(H)	(N)	(H)
0	1,0	2,3	1,0	2,3	1,0	2,3
¼	*	0,8	0,4	3,5	1,0	0,5
4	1,8	2,8	1,0	3,9	1,6	4,2
8	2,6	1,5	2,5	2,3	1,5	1,6
12	2,5	2,8	2,7	1,5	2,2	2,1

T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro

(N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar

* - dado perdido; n=116

Os valores medianos de cortisol obtidos durante a experimentação variaram de 0,4 a 4,3 ng/mL. WRIGHT *et al.* (2003) encontraram valores de 0,8 a 1,08 ng/mL; valores estes inferiores aos encontrados por KRUG *et al.* (1983), que variaram de 12 a 22,3 ng/mL, com animais em prometamorfose e clímax, respectivamente, ambos se tratando de girinos da mesma espécie. Entretanto estes últimos reportaram incertezas qualitativas quanto o material mensurado, denominando o mesmo de “material cortisol like”.

A falta de informações sobre níveis basais de cortisol em animais não estressados é um problema comum em estudos de estresse em vertebrados inferiores, particularmente quando se comparam respostas de estresse em diferentes espécies (PANKHURST e SHARPLES, 1992). Na literatura, encontram-se valores menores do que 10 ng/mL (PANKHURST e SHARPLES, 1992), para peixes não estressados, mas valores acima deste número também são reportados (PICKERING e POTTINGER, 1989; BARTON e IWAMA, 1991; GAMPERL *et al.*, 1994). Atribui-se esta variação ao grande número de fatores que podem afetar o cortisol, como a espécie, o estágio de maturação sexual, estação do ano, temperatura, ritmo circadiano, o método utilizado para a coleta do plasma (BARTON e IWAMA, 1991; PANKHURST e SHARPLES, 1992; GAMPERL *et al.*, 1994). Uma vez que há escassez de dados sobre o comportamento e determinação de corticosteróides para *R. catesbeiana*, principalmente em condições de cativeiro no Brasil, estudos adicionais são necessários para complementar e estabelecer os níveis basais para esta espécie.

Analisando-se os dados, segundo o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, não houve diferença significativa entre os tempos de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos ($P>0,05$) (Tabela 1 e Figura 5), entre os tratamentos (T1 - 1 girino/L; T2 - 5 girinos/L; T3 - 10 girinos/L) ($P<0,05$) (Tabela 2 e Figura 6), e entre os girinos submetidos a exposição aérea ($P>0,05$) (Figura 7), porém houve diferenças significativas para 4 e 8 dias de coleta ($P<0,01$) (Figura 8).

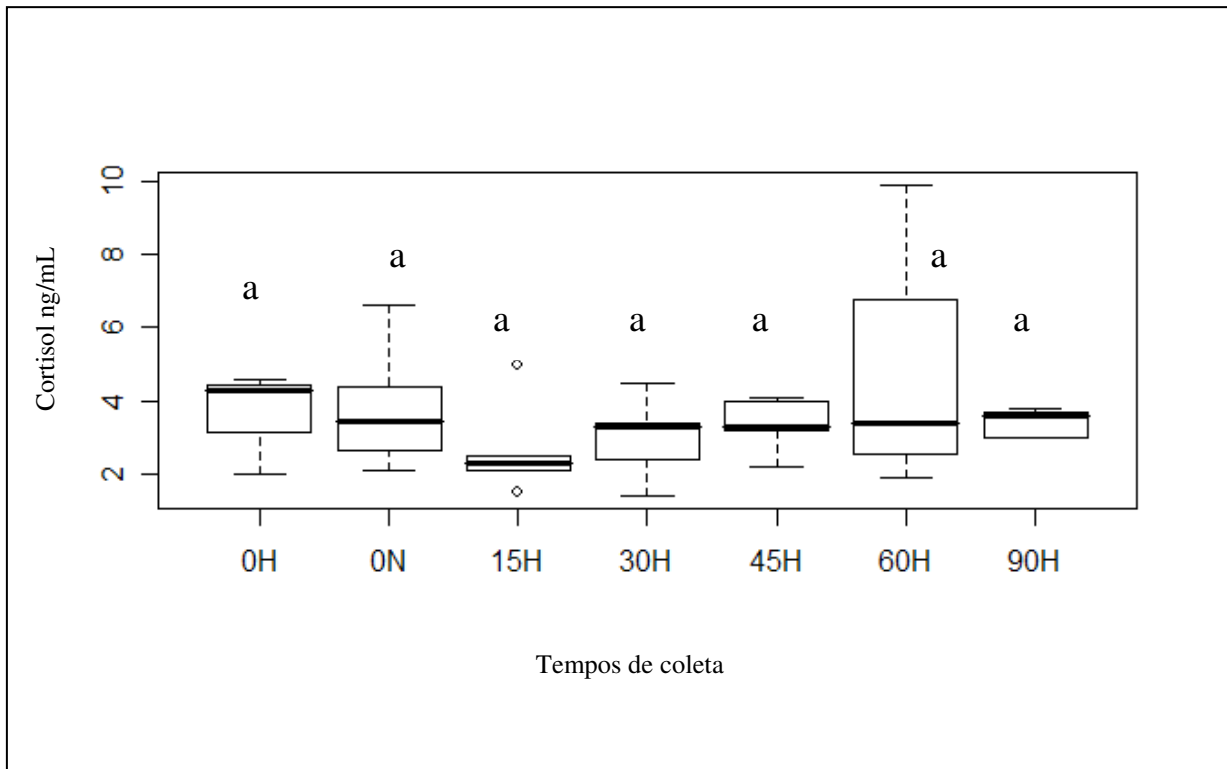


FIGURA 6 – Valores medianos de cortisol plasmático, nos tempos de coleta, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade

A resposta de estresse é apresentada com 10 a 13 minutos após o distúrbio para *Rhombosolea tapirina* atingindo pico em 0,5 a 1 hora (BARNETT e PANKHURST, 1998), 12 a 14 minutos em *Salmo gairdneri* (LAIDLEY e LEATHERLAND, 1988), 15 minutos em *Morone saxatilis* (YOUNG e CECHE, 1993) e menos de 15 minutos em *Sciaenops ocellatus* (ROBERTSON *et al.*, 1988).

SLOMAN *et al.* (2001) submeteram exemplares de *Oncorhynchus mykiss* a estresse por exposição ao ar, durante trinta segundos, as concentrações plasmáticas de cortisol, trinta minutos após o procedimento, foram significativamente maiores nos peixes manipulados quando comparado a animais não manipulados. Procedimentos de captura e transferência de

tanque provocaram em *Rhamdia quelen* resposta característica de estresse, com valores de cortisol atingindo um pico uma hora depois do procedimento (BARCELLOS *et al.*, 2000).

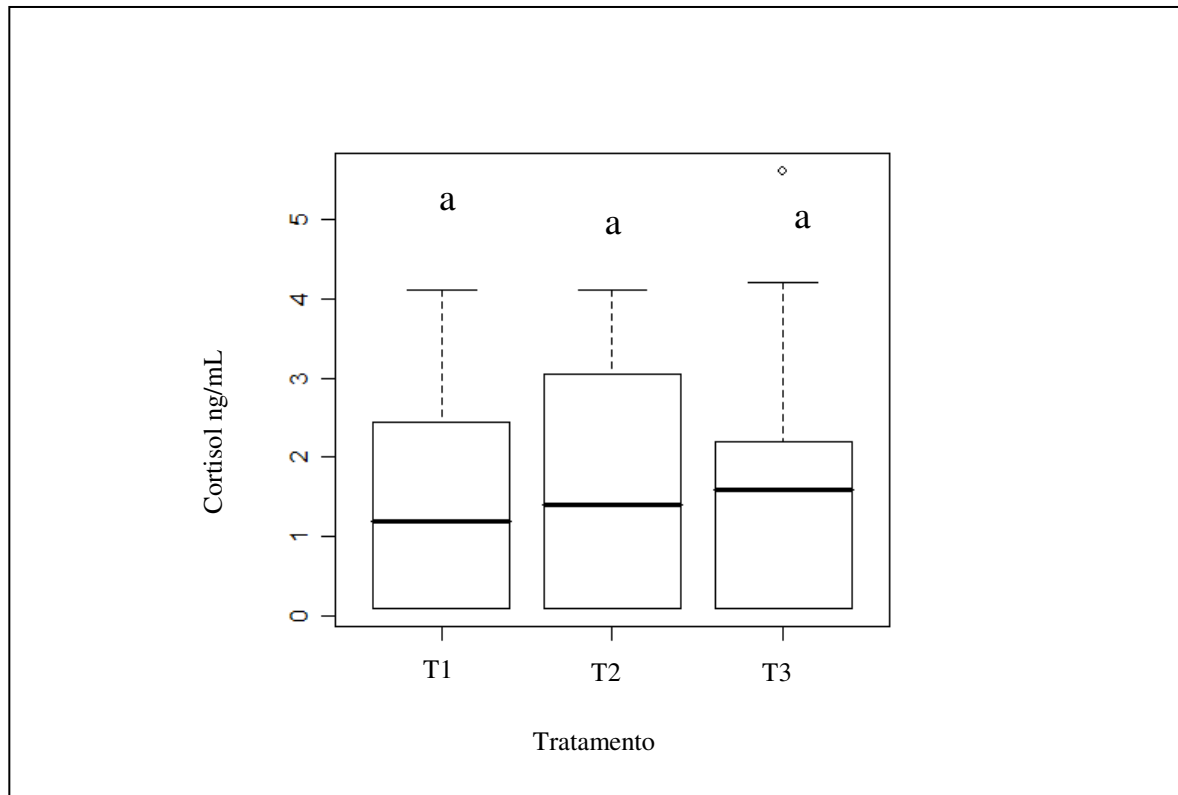


FIGURA 7 - Valores medianos de cortisol plasmático, nos tratamentos, (T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro), durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade

A densidade de 1 girino/litro é a recomendada por vários autores (ARRUDA SOARES *et al.*, 1983; FONTANELLO e FERREIRA, 1999; FERREIRA *et al.*, 2002), para melhor desempenho (crescimento e sobrevivência) dos animais e que apresenta uma boa relação custo benefício para os criadores. Segundo PICKERING (1981), o adensamento causa estresse crônico em criações intensivas de organismos aquáticos, porém, pelos resultados obtidos pode-se concluir que o cortisol proveniente do adensamento de até 10 girinos/L não diferiu estatisticamente de 1 girino/L no período de 12 dias de experimentação.

Observou-se ainda, que no tratamento com 10 girinos/L houve maior quantidade de animal metamorfoseado (controle visual). Segundo DENVER (1997), o nível baixo da água pode acelerar a metamorfose em girinos o que corrobora o presente trabalho uma vez que no tratamento de maior densidade havia menor volume de água.

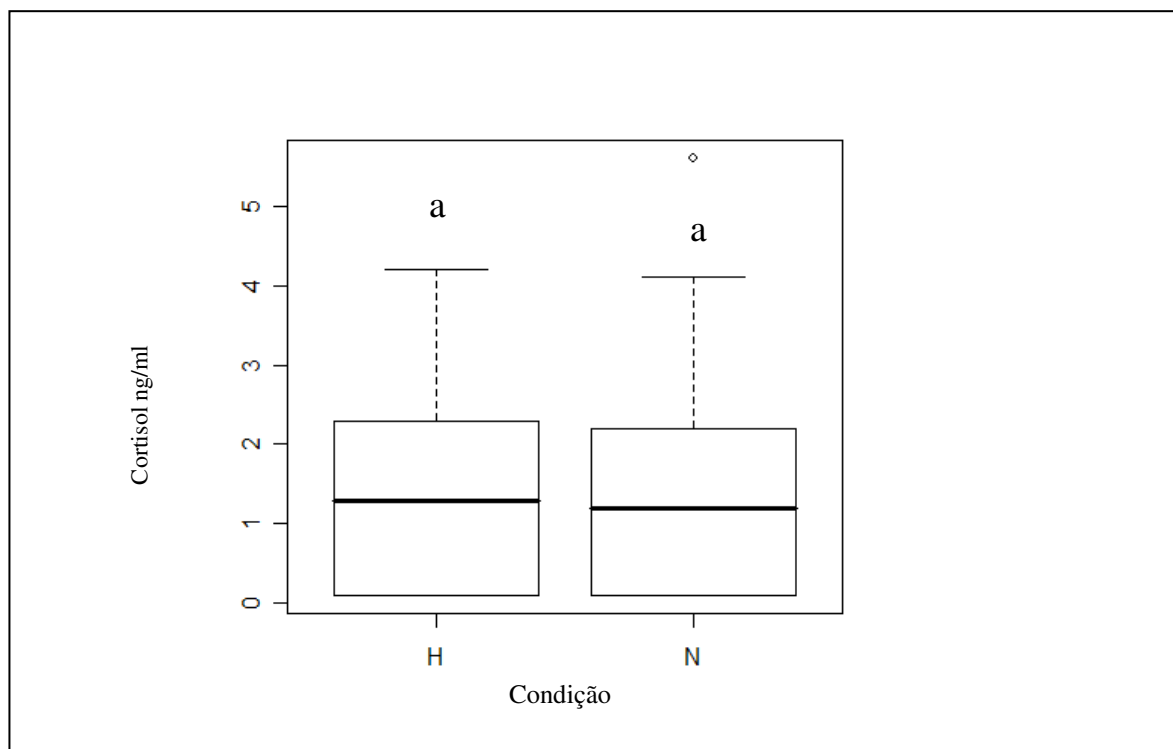


FIGURA 8 – Valores medianos de cortisol plasmático, nas condições, normóxia (N) e hipóxia (H), dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade

BARTON e IWAMA (1991) afirmam que na maioria das espécies, o padrão de resposta do cortisol, após distúrbios agudos, consiste em rápida elevação (minutos) seguida de declínio lento (horas ou dias). Em peixes expostos a hipóxia, as catecolaminas são os primeiros hormônios a serem liberados, ocorrendo os maiores níveis cerca de 30 segundos após a percepção do agente estressor. Em seguida ocorre simultaneamente um incremento dos

níveis de cortisol, com maior concentração deste aos 30 minutos após o distúrbio (ROTLLANT e TORT, 1997).

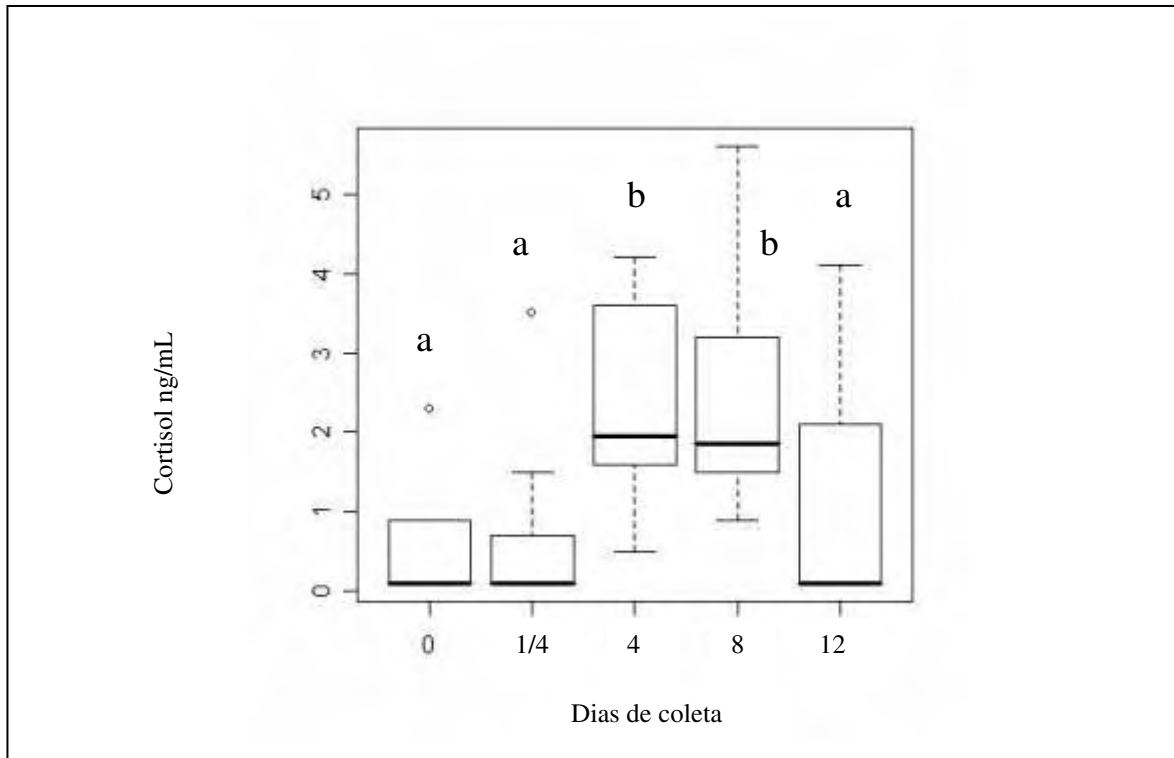


FIGURA 9 – Valores medianos de cortisol plasmático, nos dias de coleta, 0, ¼ (6 horas), 4, 8 e 12 dias, dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 1% de probabilidade

A resposta crônica tem como principal consequência a manutenção de altas concentrações plasmáticas de cortisol por longo período (PICKERING e POTTINGER, 1989; PICKERING *et al.* 1987).

Estudo realizado por POTTINGER (1998), com *Cyprinus carpio*, simulou os distúrbios naturais ocorridos durante a pesca (captura e exposição aérea), e encontrou aumento nos níveis plasmáticos de cortisol e retorno aos valores basais 24 horas mais tarde.

Para ciclídios, como a tilápia mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*), foram encontradas quedas a níveis pré-estresse em até 4 dias após a aclimação em água salgada (MORGAN *et al.*, 1997)

5.2.2 Glicemia

MORGAN e IWAMA (1997) definem a glicemia como uma das respostas fisiológicas secundárias mais utilizadas como indicador de estresse, aumentando na presença de algum fator estressante, para suprir a maior demanda energética, característica de situações desfavoráveis.

Na Tabela 3 encontram-se os valores medianos de glicemia de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e hipóxia nos diferentes dias de coleta.

TABELA 3 – Valores medianos de glicemia (mg/dL) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta

Tempo (dias)	T1		T2		T3	
	(N)	(H)	(N)	(H)	(N)	(H)
0	13,80	20,59	13,80	20,59	13,80	20,59
¼	11,22	19,36	20,88	21,70	28,27	18,54
4	10,98	16,81	9,31	29,03	14,53	30,87
8	13,18	24,60	16,81	17,78	11,89	22,73
12	17,25	25,51	16,75	24,21	19,92	25,18

T1 - 1 girino/litro; T2 - 5 girinos/litro; T3 - 10 girinos/litro

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia - coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=116

Os valores médios encontrados para este parâmetro na literatura são bastante distintos. WRIGHT (1959) encontrou valores médios de 13,51 mg% de glicose sanguínea para rãs-touro; BYRNE e WHITE (1975) relatam valores de 40 e 50 mg% em populações naturais

desta espécie em período reprodutivo; WANG e CHANG (1994) encontraram valores variando entre 20 a 64mg/dL e STÉFANI (1996) valores entre 48,97 a 55,86 mg% ambos em adultos. Ainda, HUTCHISON e TURKEY (1975) encontraram valores médios de glicose sanguínea de $24,5 \pm 3,0$ mg% para *R. pipiens*, enquanto SMITH (1954) para *R. temporaria* observou valores médios de $38 \pm 1,4$ mg%. Os valores basais de glicemia encontrados no presente trabalho variaram entre 9,31 a 30,87 mg/dL.

A hiperglicemia é, em geral, observada em animais expostos a algum tipo de estímulo adverso (POTTINGER *et al.*, 1999). Entretanto, da mesma maneira que o cortisol, não se sabe ao certo em quanto tempo ocorreria um pico de glicose, após um estímulo de estresse, para a espécie em questão.

Segundo HERMAN (1977), as diferenças nos níveis de glicose sanguínea, entre as espécies, podem ser atribuídas às diferenças de manejo, procedimento de amostragem e/ou método analítico utilizado. A mesma hipótese pode ser aplicada aos distintos valores encontrados dentro da espécie em estudo, *R. catesbeiana*, devendo-se levar em consideração ainda, a questão do estágio de desenvolvimento (girino X rã adulta) e a presença ou não de um estímulo estressor.

Analisando-se os dados segundo o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, houve diferença significativa entre tratamentos T1 - 1 girino/L e T3 - 10 girinos/L ($P < 0,05$) (Figura 9), e para os girinos submetidos a exposição aérea ($P < 0,001$) (Figura 10). Entretanto, quando o fator tempo foi avaliado a análise estatística não demonstrou diferenças significativas ($P > 0,05$) (Figura 11).

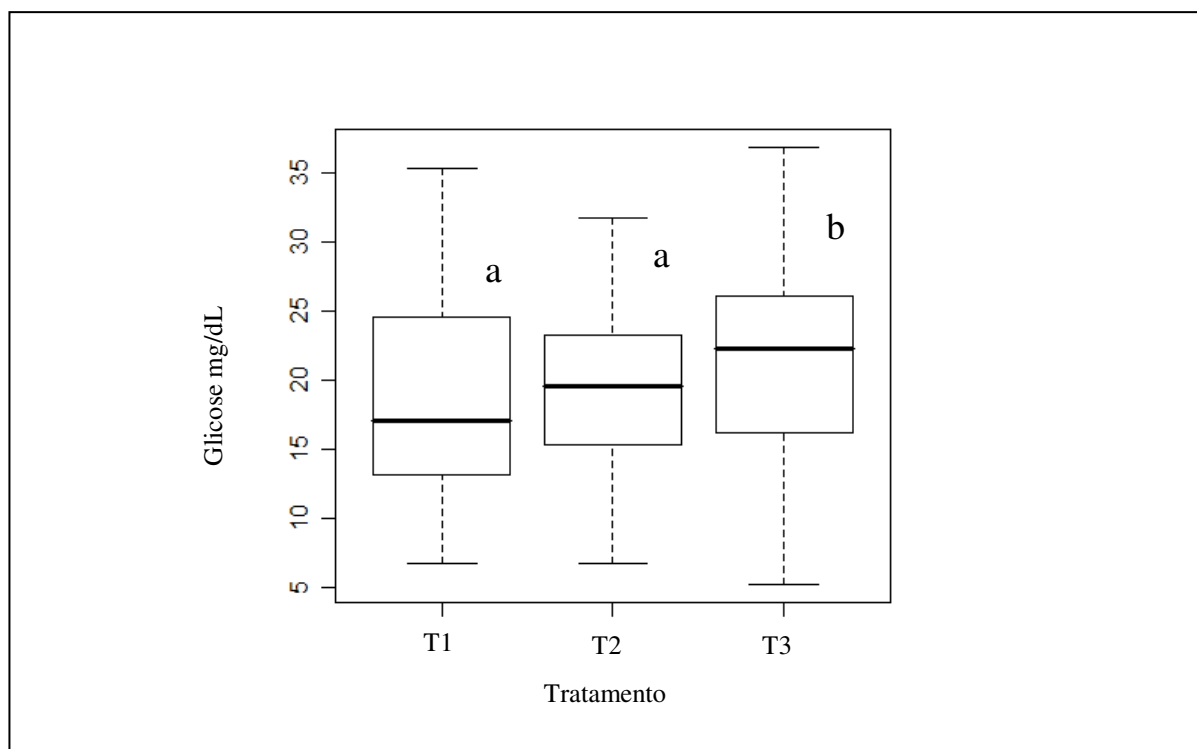


FIGURA 10 – Valores medianos de glicose, nos tratamentos (T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro) durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade

Em aquicultura a densidade de estocagem é um importante fator que influencia a ingestão de alimentos, sendo espécie-específica. A absorção do alimento pode também ser influenciada por interações sociais aumentado pela restrição espacial e disputa pelo alimento (WANDERLAAR BONGA, 1997).

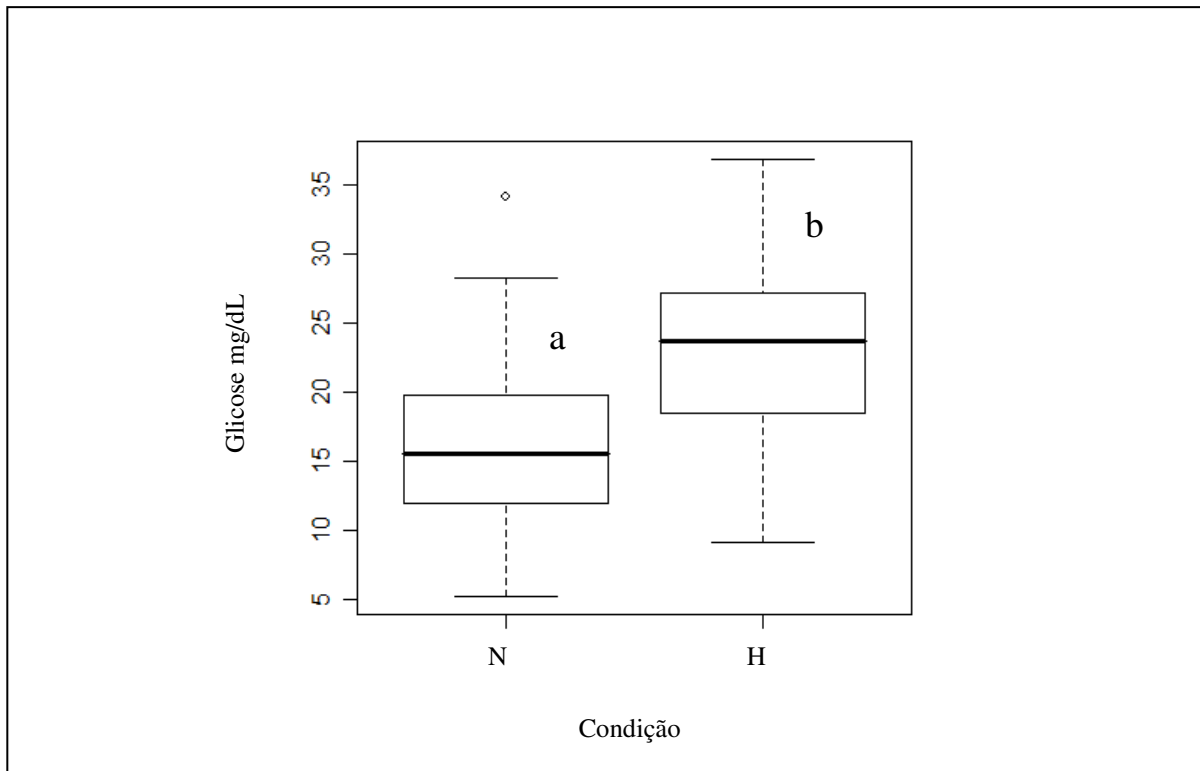


FIGURA 11 – Valores medianos de glicose, nas condições de normóxia (N) e hipóxia (H), dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 0,1% de probabilidade

Segundo MAZEAUD *et al.* (1977); VIJAYAN *et al.* (1991) e VIJAYAN *et al.* (1994) a elevação primária da glicemia nos peixes como resposta ao estresse se deve à ação das catecolaminas, que estimulam a glicogenólise e, que os altos níveis de glicemia, após o início da resposta ao estresse, são mantidos pelo cortisol que começa a agir em sequência à adrenalina contradizendo os primeiros estudos a este respeito de BUTLER (1968); CHAN e WOO (1978), que afirmavam ser a hiperglicemia pós-estresse de efeito exclusivo dos corticosteróides. Portanto, acredita-se que os valores de glicemia obtidos frente à exposição aérea se devem às catecolaminas e não ao cortisol propriamente dito, uma vez que este se apresentou pouco expressivo no presente estudo.

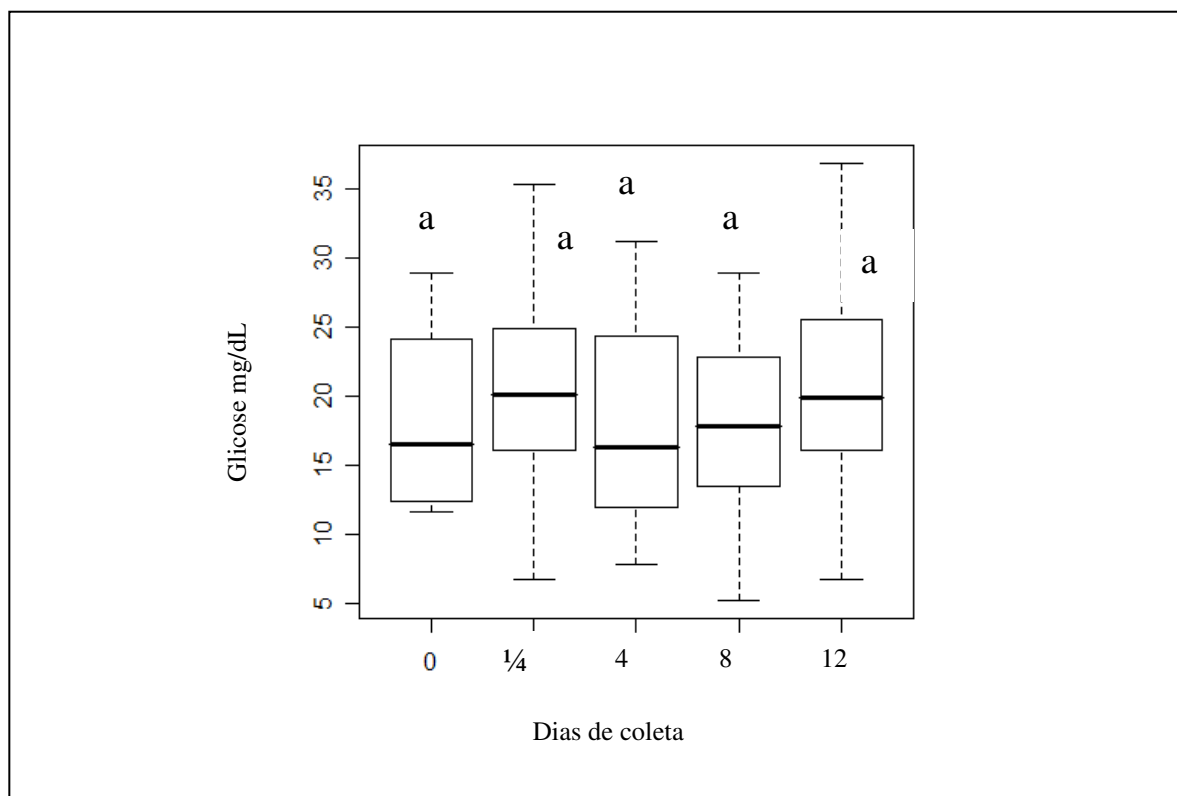


FIGURA 12 – Valores medianos de glicose, nos dias de coleta, 0, 1/4 (6 horas), 4, 8 e 12 dias, dados agrupados, durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75%, respectivamente

Figuras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5% de probabilidade

Segundo WENDERLAAR BONGA (1997), na resposta crônica pode haver adaptação ao estresse. Este mecanismo está relacionado ao controle da secreção do cortisol, que é um processo complexo. O papel do ACTH é bem aceito atualmente mas, evidências demonstram que não age sozinho. O hormônio melanócito estimulante (α MSH) tem recebido muita atenção nos últimos anos e, muitos estudos sugerem que este hormônio tenha um papel importante na adaptação dos peixes ao estresse.

5.3 Parâmetros hematológicos

Complementando as ferramentas fisiológicas de cortisol e glicose para avaliar o estresse em girinos de *R. catesbeiana*, utilizou-se alguns indicadores hematológicos como o hematócrito, taxa de hemoglobina e outros relacionados às células do sistema imunológico, como número de linfócitos. Isto porque, em outros estudos, KEBUS *et al.* (1992) e BARTON e IWAMA (1991) afirmam que a imunodeficiência decorrente da resposta de estresse está negativamente correlacionada à elevação do cortisol plasmático, o que leva a diminuição do número de linfócitos circulantes.

Os valores médios do eritrograma de girinos de rã-touro submetidos aos efeitos estressores de densidade e hipóxia estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 e Figuras 12 e 13.

TABELA 4 – Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação

Dias		Er	VCM	HCM
0	MZ (N)	29,63 ± 5,28	770,89 ± 40,55	130,95 ± 13,96
	MZ (H)	21,88 ± 2,87	1.125,00 ± 0,00	166,98 ± 13,89
	T1 (N)	26,50 ± 4,79	563,62 ± 112,29	179,53 ± 42,04
	T1 (H)	24,06 ± 2,03	747,74 ± 72,45	137,77 ± 16,01
12	T2 (N)	26,70 ± 3,27	672,05 ± 125,09	187,50 ± 32,88
	T2 (H)	24,11 ± 4,79	921,55 ± 127,88	154,38 ± 16,86
	T3 (N)	24,25 ± 2,89	902,90 ± 171,88	168,29 ± 42,41
	T3 (H)	26,36 ± 3,54	824,63 ± 131,83	145,72 ± 13,89
	F	0,22 ^{NS}	0,62 ^{NS}	0,36 ^{NS}

^{NS} – não significativo

Er – número de eritrócitos (10⁴/mm³); VCM – volume corpuscular médio (fL); HCM – hemoglobina corpuscular média (pg/cel);

MZ – momento zero; T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro;

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=62

TABELA 5 – Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta

Dias		Ht	Hb	CHCM
0	MZ (N)	22,67 ± 3,69	3,96 ± 0,99	18,66 ± 1,60
	MZ (H)	18,00 ± 0,00	3,49 ± 0,26	17,19 ± 0,00
1/4	T1 (N)	21,50 ± 2,04	4,41 ± 0,00	23,21 ± 0,00
	T1 (H)	20,87 ± 3,95	4,11 ± 0,13	21,73 ± 5,41
	T2 (N)	23,00 ± 0,00	3,85 ± 0,11	20,17 ± 0,00
	T2 (H)	23,00 ± 0,00	4,11 ± 0,32	20,17 ± 0,00
	T3 (N)	20,47 ± 3,44	4,69 ± 1,26	22,24 ± 3,29
	T3 (H)	19,50 ± 0,41	4,64 ± 0,00	24,41 ± 0,00
4	T1 (N)	13,00 ± 0,00	5,04 ± 0,55	32,18 ± 0,00
	T1 (H)	14,00 ± 3,27	3,31 ± 0,25	26,92 ± 5,02
	T2 (N)	17,75 ± 2,66	2,75 ± 0,25	17,31 ± 2,11
	T2 (H)	20,00 ± 0,58	3,42 ± 0,44	16,64 ± 1,81
	T3 (N)	16,00 ± 1,53	3,52 ± 0,22	22,29 ± 1,74
	T3 (H)	13,00 ± 2,45	4,30 ± 0,09	44,09 ± 0,00
8	T1 (N)	16,00 ± 3,27	4,66 ± 0,62	32,94 ± 3,10
	T1 (H)	18,00 ± 1,63	3,46 ± 0,31	20,90 ± 0,90
	T2 (N)	16,50 ± 2,86	3,43 ± 0,62	13,38 ± 0,00
	T2 (H)	19,00 ± 2,52	3,60 ± 0,26	20,05 ± 4,26
	T3 (N)	15,50 ± 0,00	4,80 ± 1,04	23,40 ± 5,08
	T3 (H)	15,50 ± 2,04	3,17 ± 0,37	23,40 ± 5,08
12	T1 (N)	13,00 ± 1,52	3,30 ± 0,57	32,30 ± 9,02
	T1 (H)	18,07 ± 1,98	3,27 ± 0,31	19,69 ± 1,58
	T2 (N)	14,75 ± 1,66	4,41 ± 0,36	29,78 ± 3,14
	T2 (H)	23,83 ± 2,95	3,63 ± 0,52	16,66 ± 0,98
	T3 (N)	18,86 ± 3,22	3,50 ± 0,49	20,29 ± 3,10
	T3 (H)	17,50 ± 2,56	3,80 ± 0,40	27,92 ± 6,88
	F	0,85 ^{NS}	0,75 ^{NS}	0,83 ^{NS}

^{NS} – não significativo

Ht - hematócrito (%); Hb – taxa de hemoglobina (g/100 mL); CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média (%);

MZ – momento zero; T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro;

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=116

Avaliando-se os dados segundo o teste de Tukey para as diferentes características hematológicas foi observado que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos nos diferentes dias de coleta para todas as análises.

Resultados similares foram encontrados por FRANÇA *et al.* (2006a) que trabalharam com probióticos em girinos desta mesma espécie, Ht: $15,94 \pm 1,87\%$; Er: $29,53 \pm 6,02 \times 10^4/\text{mm}^3$; Hb: $3,20 \pm 0,43 \text{ g}/100 \text{ mL}$; VCM: $584,5 \pm 87,4 \text{ fL}$; HCM: $117,0 \pm 14,0 \text{ pg/cel}$ e CHCM: $20,23 \pm 2,93 \%$; enquanto, o presente trabalho encontrou em valores médios de Ht: $18,33 \pm 2,51\%$; Er: $25,43 \pm 3,68 \times 10^4/\text{mm}^3$; Hb: $3,67 \pm 0,49 \text{ g}/100 \text{ mL}$; VCM: $816,05 \pm 111,71 \text{ fL}$; HCM: $158,89 \pm 23,99 \text{ pg/cel}$ e CHCM: $22,81 \pm 3,76 \%$. Ainda FRANÇA *et al.* (2006b), relatando os valores médios em imagos, alimentados com probióticos, encontraram Ht: $19,76 \pm 1,93\%$; Er: $28,38 \pm 3,09 \times 10^4/\text{mm}^3$; Hb: $5,33 \pm 0,25 \text{ g}/100 \text{ mL}$; VCM: $688,2 \pm 49,9 \text{ fL}$; HCM: $191,24 \pm 10,0 \text{ pg/cel}$ e CHCM: $28,01 \pm 2,80 \%$. Estas informações são valiosas para análise e composição dos valores basais, ou considerados normais, para organismos desta espécie. Trata-se de um ponto de partida para futuras comparações com animais expostos a condições adversas. Entretanto, a partir destes dados pouco se pode inferir sobre animais em situação de estresse, pois trabalhos nesta linha de pesquisa ainda são escassos no Brasil.

Complementando estas informações, FIORANELLI *et al.* (2004) afirmam que os valores de hematócrito, o número de eritrócitos e a taxa de hemoglobina aumentam à medida que avança a idade em *R. catesbeiana*. Esta assertiva é corroborada quando são confrontados os resultados do presente trabalho, os de FRANÇA *et al.* (2006a e b) que trabalhou com girinos e imagos, respectivamente e, os de COPPO (2003), que em adultos de *R. catesbeiana* obteve valores de Ht: $30,1\%$, Hb: $6,80 \text{ g/dL}$, Er: $42 \times 10^4/\text{mm}^3$, VCM: 709 fL , HCM: 157 pg/cel e CHCM: $23,3\%$.

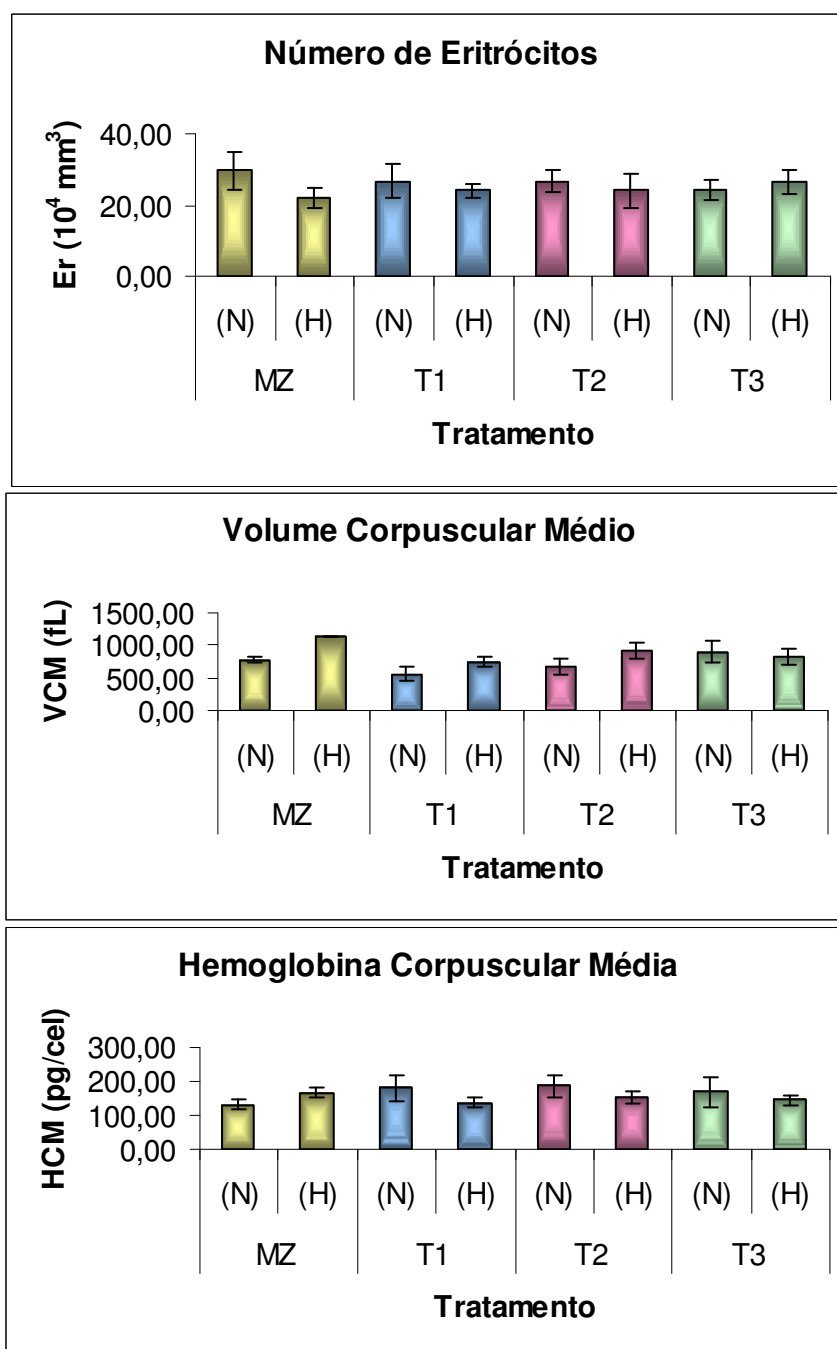


FIGURA 13- Valores médios dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação (MZ) momento zero, (T1) 1 girino/L, (T2) 5 girinos/L, (T3) 10 girinos/L (N) normóxia e (H) hipóxia

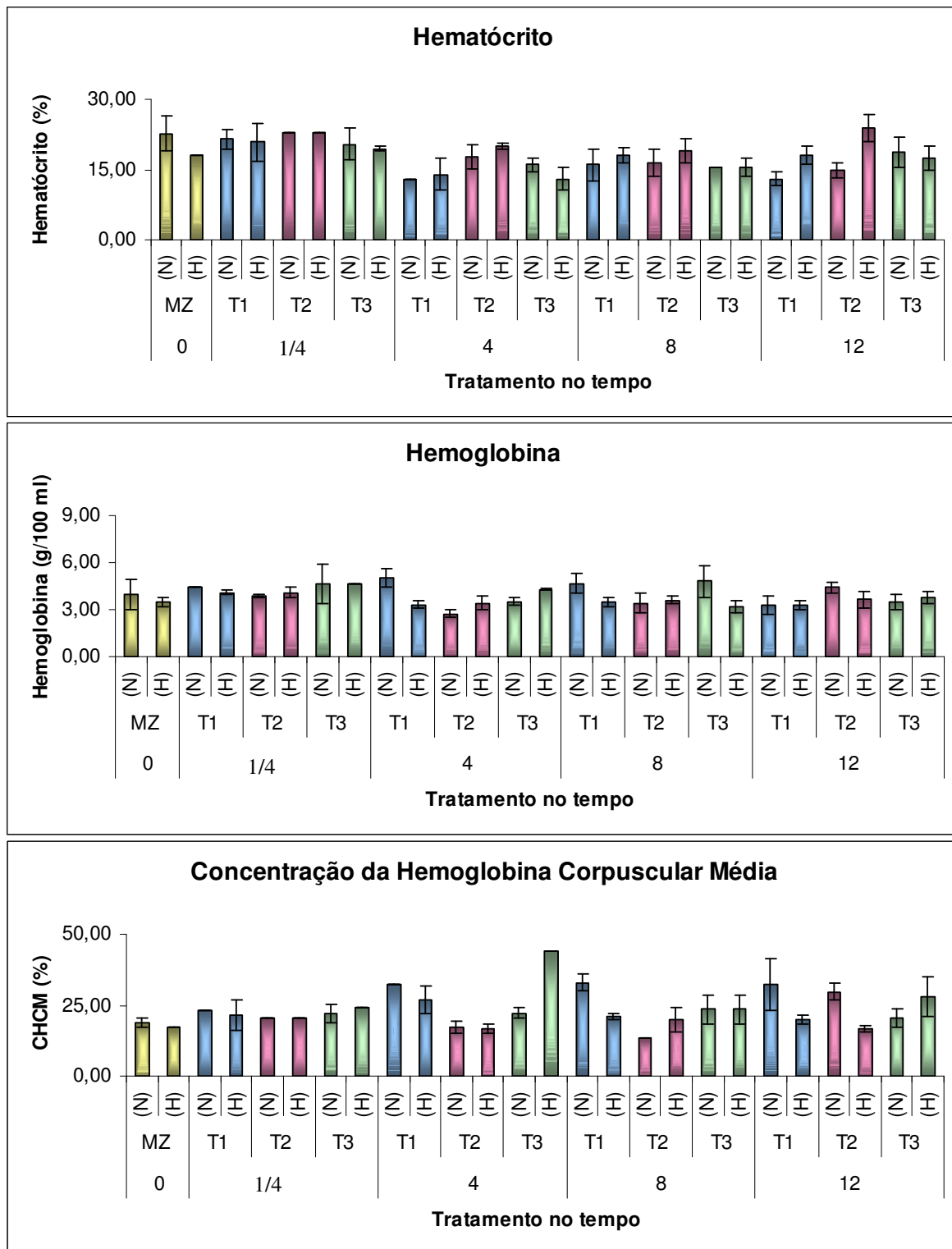


FIGURA 14- Valores médios dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea nos diferentes dias de coleta; 0 (MZ), 1/4 (6 horas), 4, 8 e 12 dias
 (MZ) momento zero, (T1) 1 girino/L, (T2) 5 girinos/L, (T3) 10 girinos/L
 (N) normóxia e (H) hipóxia

Em estudos de estresse, PICKERING *et al.* (1982) trabalhando com *Salmo trutta*, e ELLSAESSER e CLEM (1986), trabalhando com *Ictalurus punctatus*, não observaram alterações significantes no número de eritrócitos. Outros autores também observaram este mesmo resultado em hematócrito (ELLSAESSER e CLEM, 1986; CARNEIRO e URBINATI, 1998) e em hemoglobina (CARNEIRO e URBINATI, 1998), corroborando o presente trabalho que não apresentou alterações significativas no número de eritrócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina, bem como nos índices hematimétricos absolutos.

Os trombócitos dos peixes têm sido descritos como as células sanguíneas mais abundantes, depois dos eritrócitos (UEDA *et al.*, 2001). Porém sua função e ocorrência ainda permanecem controvertidas. Os trombócitos têm sido geralmente considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (GARDNER e YEVICH, 1969; CASILLAS e SMITH, 1977), desempenhando papel análogo às plaquetas (PENHA *et al.*, 1996). Em anfíbios, estas células possivelmente têm papel na fagocitose de corpos estranhos como descrito por DIAS e SENHORINI (1991) e PENHA *et al.* (1996).

Os valores médios dos trombócitos de girinos de *R. catesbeiana* submetidos aos efeitos estressores de densidade e hipóxia estão apresentados na Tabela 6 e Figura 14.

TABELA 6 – Valores médios e erro padrão do número de trombócitos (trombócitos/mm³) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação

	Trombócitos
MZ (N)	932,30 ± 551,55
MZ (H)	951,87 ± 414,51
T1 (N)	4.676,16 ± 4.063,99
T1 (H)	2.963,55 ± 1.503,71
T2 (N)	1.188,41 ± 576,46
T2 (H)	254,12 ± 167,44
T3 (N)	2.308,58 ± 1.352,33
T3 (H)	701,53 ± 363,84
F	0,48 ^{NS}

^{NS} – não significativo

MZ – momento zero; T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=62

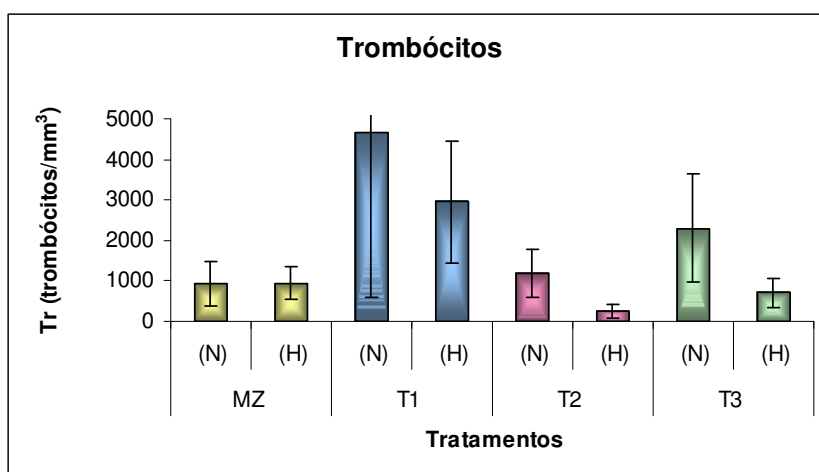


FIGURA 15- Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação

■ (MZ) momento zero, ■ (T1) 1 girino/L, ■ (T2) 5 girinos/L, ■ (T3) 10 girinos/L
(N) normóxia e (H) hipóxia

Avaliando-se os dados, segundo o teste de Tukey, foi observado que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos nos diferentes dias de coleta.

O número médio de trombócitos neste trabalho foi de $1.747,06 \pm 1.124,28$ trombócitos/ mm^3 . Esses resultados diferem dos observados por FRANÇA *et al.* (2006b), que relataram valores médios de $2.083,84 \pm 706,81$ em imagos e DIAS (2006) que relatou valores médios de $9.612,10 \pm 4.173,69$ em rãs adultas.

Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos também são responsáveis pela grande variação dos dados. Os dados disponíveis sobre a percentagem de trombócitos no sangue periférico de organismos aquáticos são escassos, uma vez que é difícil a identificação entre linfócitos e trombócitos (UEDA *et al.*, 2001). Mesmo tendo-se trabalhado com a mesma espécie, e adotado a mesma metodologia, variações foram observadas, talvez em função do estágio de desenvolvimento dos animais e/ou da quantidade de anticoagulante utilizado durante a punção sanguínea.

Os tipos celulares de leucócitos mais abundantes encontrados nos exemplares de *R. catesbeiana*, neste trabalho, foram linfócitos e neutrófilos corroborando os resultados de FERREIRA (2002) e MARCANTÔNIO (2005), e de forma mais escassa eosinófilos, basófilos e monócitos (Figura 15).

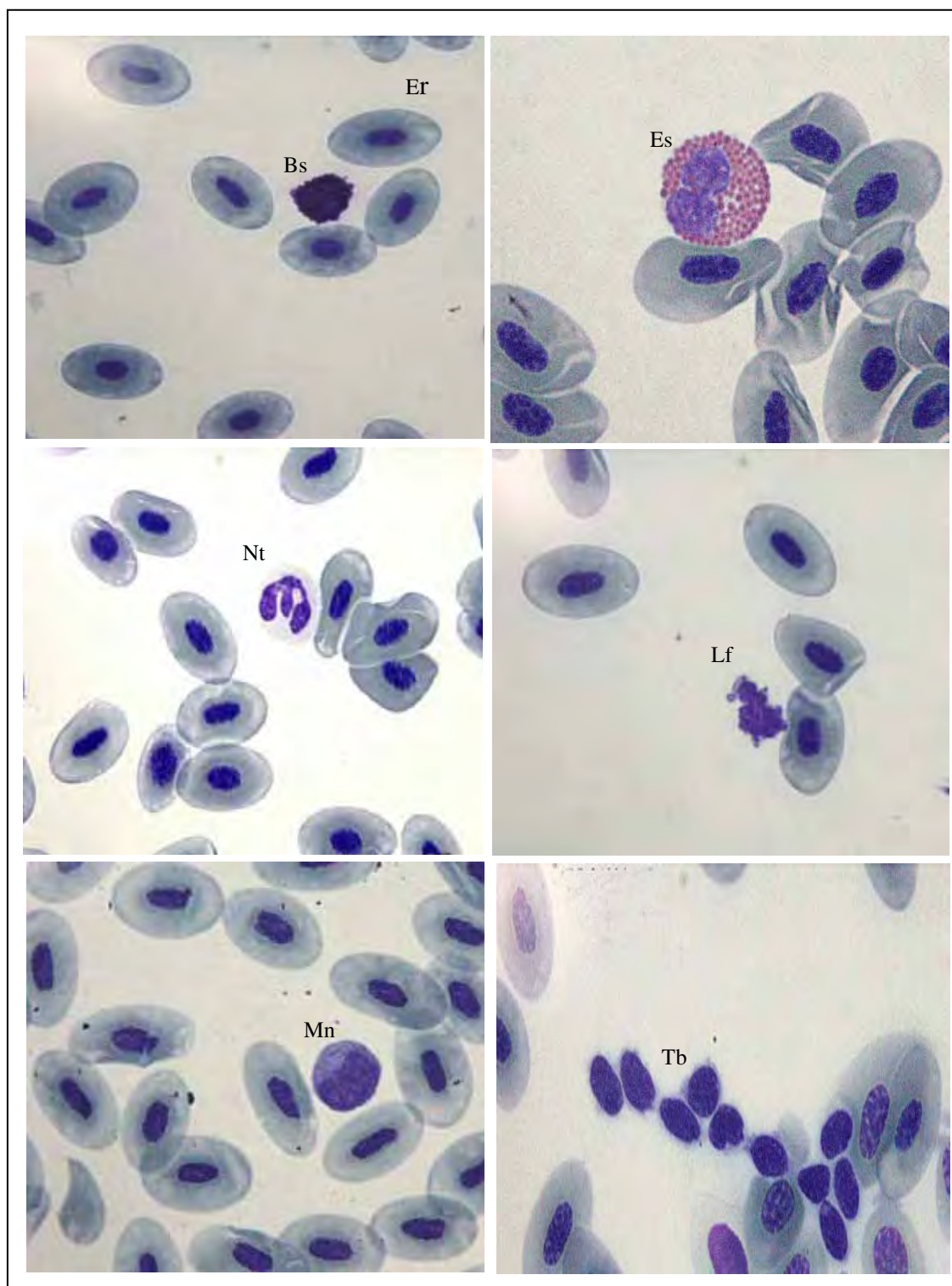


FIGURA 16 - Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de rã-touro *R. catesbeiana*; Er (eritrócito), Bs (basófilos), Es (eosinófilos), Nt (neutrófilos), Lf (linfócitos), Mn (monócitos) e Tb (trombócitos). May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947). Aumento 1000X

Os valores médios em porcentagem de leucócitos (Tabela 7) e em número absoluto de leucócitos (Tabela 8) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea, estão apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

TABELA 7 – Valores médios e erro padrão de leucócitos, em porcentagem, de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação

	Lf	Nt	Bs	Es	Mn
MZ (N)	79,25 ± 3,15 ^a	8,25 ± 1,04 ^a	3,12 ± 1,00	8,90 ± 3,58 ^a	0,48 ± 0,48
MZ (H)	91,83 ± 3,47 ^b	3,33 ± 2,35 ^{ab}	1,44 ± 1,44	3,41 ± 1,44 ^b	0,00 ± 0,00
T1 (N)	97,97 ± 0,50 ^b	1,21 ± 0,35 ^b	0,33 ± 0,17	0,50 ± 0,08 ^b	0,00 ± 0,00
T1 (H)	95,74 ± 1,31 ^b	2,99 ± 1,05 ^b	0,43 ± 0,20	0,84 ± 0,31 ^b	0,00 ± 0,00
T2 (N)	93,19 ± 1,40 ^b	4,10 ± 0,56 ^{ab}	0,99 ± 0,74	1,72 ± 0,44 ^b	0,00 ± 0,00
T2 (H)	96,21 ± 0,76 ^b	2,22 ± 0,49 ^b	0,54 ± 0,26	1,02 ± 0,36 ^b	0,00 ± 0,00
T3 (N)	94,89 ± 0,61 ^b	1,54 ± 0,36 ^b	2,32 ± 0,68	0,95 ± 0,37 ^b	0,29 ± 0,22
T3 (H)	93,78 ± 0,97 ^b	3,62 ± 0,79 ^{ab}	0,93 ± 0,56	1,46 ± 0,37 ^b	0,21 ± 0,13
F	11,556 ^{***}	2,117 ^{**}	4,338 ^{NS}	6,745 ^{***}	0,283 ^{NS}

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

^{NS} – não significativo

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

*** - extremamente significativo

Lf – linfócitos (%); Bs – basófilos (%); Nt – neutrófilos (%); Es – eosinófilos (%); Mn – monócitos (%);

MZ – momento zero; T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro;

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=62

TABELA 8 – Valores médios e erro padrão de leucócitos, em número absoluto, de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero e aos 12 dias de experimentação

	Lc	Lf	NT	Bs	Es	Mn
MZ (N)	8.177,41 ±	6.543,09 ±	682,74 ±	264,34 ±	614,76 ^a ±	72,48 ±
	2.352,03	2.036,06	233,03	95,67	226,06	72,48
MZ (H)	10.412,43 ±	9.586,44 ±	360,81 ±	127,03 ±	338,15 ^{ab} ±	0,00 ±
	812,03	936,74	260,55	127,03	133,76	0,00
T1 (N)	12.937,74 ±	12.717,24 ±	122,92 ±	33,63 ±	63,94 ^b ±	0,00 ±
	3.024,84	2.989,32	31,73	15,53	15,44	0,00
T1 (H)	14.473,21 ±	13.824,65 ±	461,79 ±	77,42 ±	109,34 ^b ±	0,00 ±
	2.515,19	2.400,16	161,14	50,89	44,06	0,00
T2 (N)	8.563,20 ±	7.940,84 ±	361,53 ±	122,05 ±	138,79 ^b ±	0,00 ±
	1.076,21	941,94	76,26	90,97	34,29	0,00
T2 (H)	11.177,18 ±	10.727,13 ±	190,92 ±	102,49 ±	156,64 ^b ±	0,00 ±
	2.608,30	2.484,41	54,12	55,63	75,31	0,00
T3 (N)	8.907,52 ±	8.457,47 ±	163,20 ±	154,19 ±	92,23 ^b ±	40,43 ±
	1.653,11	1.561,46	54,76	29,42	46,04	30,14
T3 (H)	14.492,17 ±	13.626,24 ±	517,27 ±	136,42 ±	187,04 ^b ±	25,20 ±
	2.055,41	1.986,77	106,01	68,24	44,77	15,13
F	0,86 ^{NS}	1,033 ^{NS}	2,130 ^{NS}	0,821 ^{NS}	4,171 ^{**}	1,328 ^{NS}

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

^{NS} – não significativo

^{**} - significativo ao nível de 1% de probabilidade

Lc – leucócitos totais/mm³; Lf – linfócitos/mm³; Bs – basófilos/mm³; Nt – neutrófilos/mm³; Es – eosinófilos/mm³; Mn – monócitos/mm³;

MZ – momento zero; T1 - 1 girino/litro; T2 – 5 girinos/litro; T3 – 10 girinos/litro;

(N) Normóxia - coleta de sangue no tempo zero; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar; n=62

Avaliando-se os dados segundo o teste de Tukey para as diferentes características hematológicas no leucograma foi observado que houve diferença significativa para a porcentagem de linfócito ($P<0,001$), neutrófilo ($P<0,01$) e eosinófilo ($P<0,001$) entre os tratamentos nos diferentes dias de coleta, porém quando se considera o número absoluto dessas células, verifica-se que apenas para o eosinófilo ($P<0,01$) ocorreu diferença significativa entre os tratamentos nos diferentes dias de coleta.

No presente trabalho, encontrou-se valores médios em porcentagem de leucócitos sendo Lf $92,86 \pm 1,52\%$; Nt $3,41 \pm 0,87\%$; Bs $1,26 \pm 0,63\%$; Es $2,35 \pm 0,87\%$ e Mn $0,12 \pm 0,10\%$, resultado este muito próximo aos de FERREIRA *et al.* (2004) que, em girinos da mesma espécie encontraram Lf $88,0 \pm 1,4\%$; Nt $3,8 \pm 0,9\%$; Bs $5,8 \pm 0,7\%$; Es $2,0 \pm 0,3\%$ e Mn $0,4 \pm 0,1\%$ e FRANÇA *et al.*, (2006b) que, em imagos, encontraram Lf $82,64 \pm 2,86\%$; Nt $8,61 \pm 1,98\%$; Bs $6,38 \pm 1,45\%$; Es $1,82 \pm 0,41\%$ e Mn $0,56 \pm 0,24\%$.

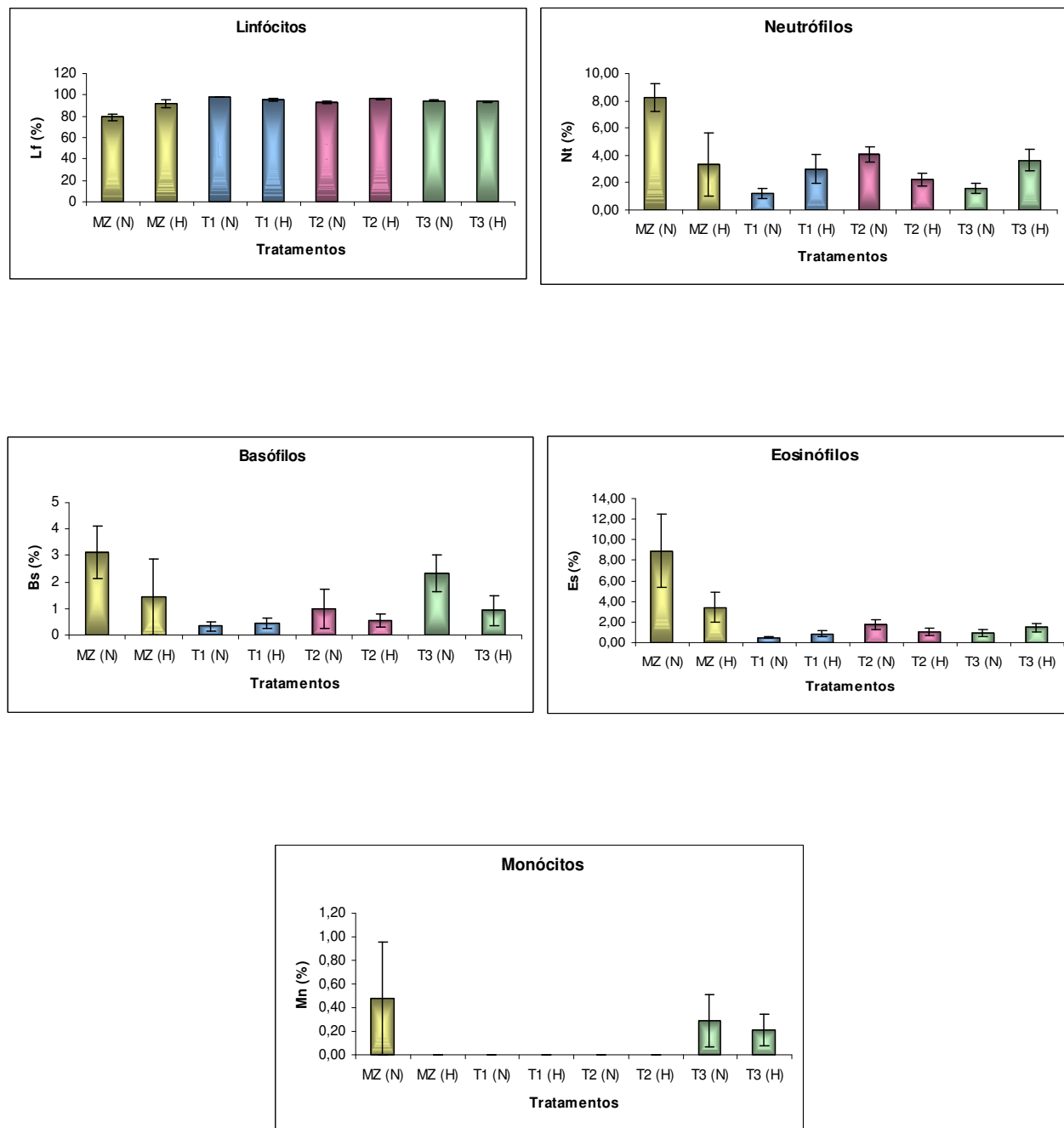


FIGURA 17- Valores médios dos números relativos de leucócitos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação
 ■ (MZ) momento zero, ■ (T1) 1 girino/L, ■ (T2) 5 girinos/L, ■ (T3) 10 girinos/L
 (N) normóxia e (H) hipóxia

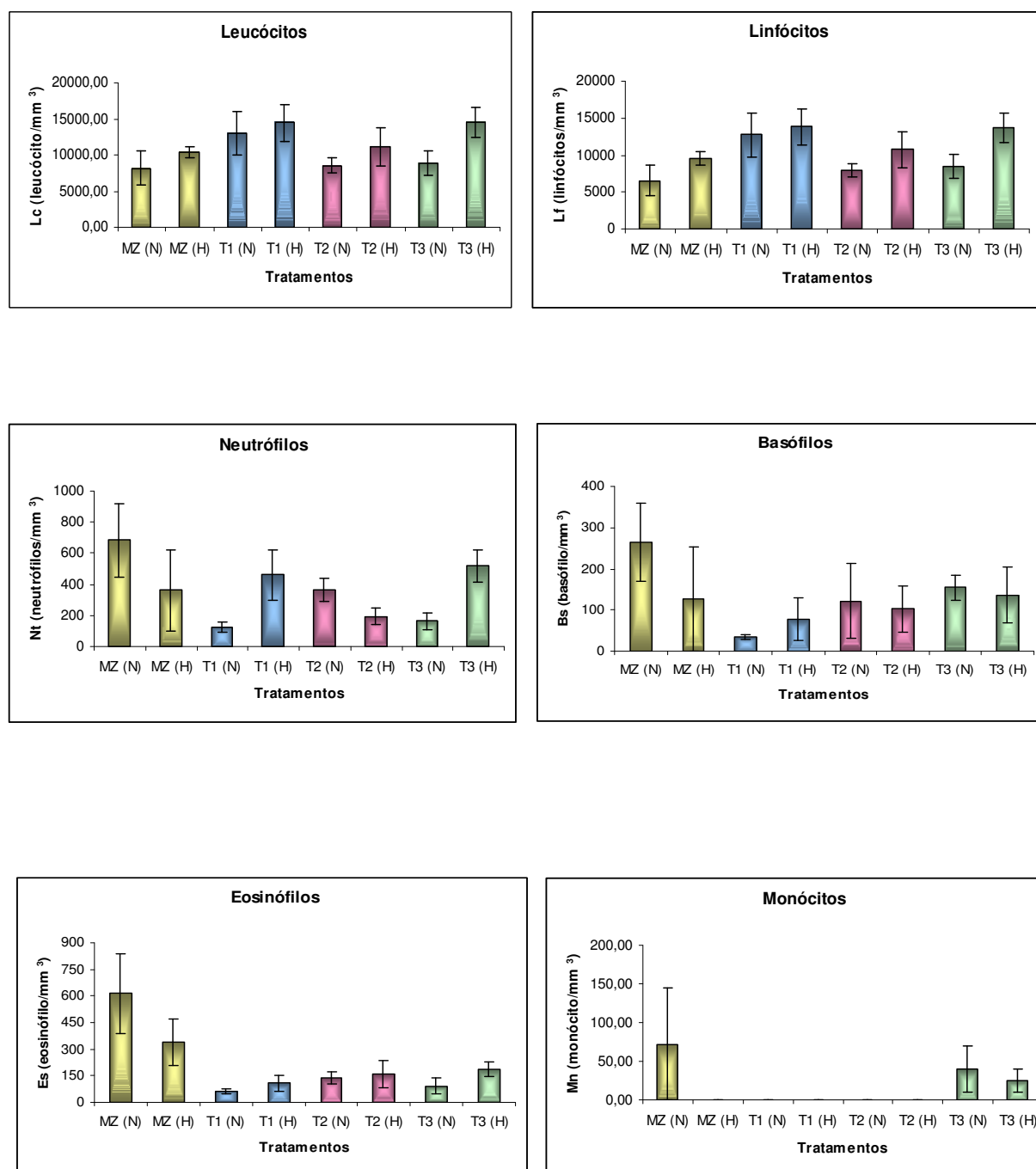


FIGURA 18 - Valores médios dos números absolutos de leucócitos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de densidade e exposição aérea no tempo zero (MZ) e aos 12 dias de experimentação
 (MZ) momento zero, (T1) 1 girino/L, (T2) 5 girinos/L, (T3) 10 girinos/L
 (N) normóxia e (H) hipóxia

Vários trabalhos sugerem que os corticosteróides inibem o sistema imunológico. Segundo PICKERING (1984), *Oncorhynchus mykiss* alimentadas, em apenas uma refeição, com dieta contendo cortisol, apresentaram redução de 65% no número de linfócitos circulantes, retornando ao nível pré-tratamento em 24 horas. Em outro estudo, a alimentação diária e contínua com cortisol provocou 84% de depressão no número de linfócitos, que retornou ao normal somente duas semanas após o término do tratamento (BARTON *et al.*, 1987). Ainda segundo PICKERING *et al.* (1982), um simples estresse de manejo de 2 minutos causou linfopenia em *Salmo trutta* após 8 horas, que levou 72 horas para recuperação à níveis basais. Estes dados sugerem que para estes animais o número de linfócitos permanece baixo tanto tempo quanto permanecer alto o cortisol.

MAHAJAN e DHEER (1979) concluíram que depois dos linfócitos, os neutrófilos são os leucócitos mais importantes e têm grande sensibilidade a modificações do meio ambiente.

Segundo SORENSEN (1991), a diminuição do número de neutrófilos pode indicar a interrupção da capacidade fagocitária ou a redução da resistência dos animais às doenças, corroborando os resultados de RANZANI-PAIVA (1995), que sugere que a diminuição desta célula geralmente é citada na literatura como consequência de alguma enfermidade. Foi observada diminuição do número de neutrófilos, bem como da porcentagem do mesmo no presente estudo, podendo ser sugerido, neste caso, princípio de redução de resistência mesmo não sendo observado qualquer enfermidade no período experimental.

O aumento dos eosinófilos circulantes no término da fase aguda da inflamação geralmente marca o início da recuperação do organismo, segundo GARCIA-NAVARRO e PACHALY (1994). Observou-se diminuição do número de eosinófilos, bem como da porcentagem do mesmo no presente trabalho, indicando que, dessa forma, tem-se que o manejo aplicado e/ou tempo de exposição pareceu provocar estresse pouco expressivo.

Segundo ELLSAESSER e CLEM (1986), o estresse de manejo causou diminuição na porcentagem relativa de monócitos do bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, afetando o sistema imunológico e facilitando a proliferação de organismos patogênicos oportunistas. Mesmo que observada diminuição quase que insignificante na porcentagem, bem como no número absoluto de monócitos no presente trabalho, os animais apresentavam-se em boas condições de saúde.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo tem-se que a exposição aérea por 15 minutos e o adensamento (1, 5 e 10 girinos/L), nas condições experimentais:

- Não provocaram aumento nos valores de cortisol plasmático em animais submetidos a hipóxia amostrados nos intervalos de tempo de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.
- Também não se observou diferença significativa nos valores de cortisol nas diferentes densidades testadas. Porém, observou-se aumento aos 4 e 8 dias de experimentação, mostrando tendência de retorno aos valores basais talvez evidenciando situação de estresse crônico com possível aclimação.
- Influenciaram as taxas de glicemia para o tratamento com 10 girinos/L, mostrando forte correlação com a hipóxia.
- Influenciaram a resposta hematológica principalmente para o número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, aos 12 dias de experimentação, mas sob este aspecto sem prejuízos à saúde dos animais.
- A validação deste tipo de ensaio (precisão – Método de Elisa DSL) para girinos de *Rana catesbeiana* teve como coeficiente de variação intra e inter ensaio 7,85 e 10,63, respectivamente, muito próximos aos informados pelo fabricante.

6 – CONCLUSÕES

O presente estudo teve como conclusões:

O método de Elisa para leitura de valores de cortisol plasmático demonstrou-se eficiente para girinos de *Rana catesbeina*. Entretanto, possivelmente os estressores utilizados (exposição aérea e adensamento) não foram eficazes para este fim, ou girinos desta espécie nesta fase de desenvolvimento não expressam seu estresse através do cortisol plasmático.

Assim, em condições controladas o adensamento de até 10 girinos/litro e a exposição aérea por 15 minutos não provocou mortalidade em girinos de *R. catesbeiana*, durante o período experimental.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA SOARES, H.; FONTANELLO, D.; MANDELLI JR., J.; REIS, J.M.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S. 1983 Efeito da densidade de população no ganho de peso de girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Boletim do Instituto de Pesca*, 10: 47-51.
- BARAS, E.; NDAO, M.; MAXI, M.Y.J.; JEANDRAIN, D.; THOMÉ, J.P.; VANDEWALLE, P.; MÉLARD, C. 2000 Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. I. Ontogeny, dynamics, bioenergetics of cannibalism and prey size selectivity. *Journal of Fish Biology*, 57(4): 1001-1020.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHL, V.M. 2000 Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (Revisão). *Boletim do Instituto de Pesca*, 26 (1): 99-111.
- BARNETT, C.W.; PANKHURST, N.W. 1998 The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Disease*, 10: 3-26.
- BARTON, A. B.; SCHERECK, C.B.; BARTON, L.D. 1987 Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress response in juvenile rainbow trout. *Disease of Aquatic Organisms*, 2: 173-185.
- BARTON, A.B.; PETER, R.E.; PAULENCU, C.R. 1980 Plasma cortisol levels of fingerlings rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 805-811.

- BYRNE, J.J.; WHITE, R.J. 1975 Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 50A: 709-715.
- BUTLER, D.G. 1968 Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *General and Comparative Endocrinology*, 10: 85-91.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 1998 Alterações metabólicas, hematológicas e osmoregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: AQUICULTURA BRASIL '98. *Anais...Recife*, 2: 609-620.
- CASILLAS, E.; SMITH, L.S. 1977 Effects of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, 10: 481-491.
- CHAN, D.K.O.; WOO, N.Y.S. 1978 Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology*, 35: 205-215.
- CHEN, G.R.; SUN, L.T.; LEE, Y.H.; CHANG, C.F. 1995 Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *Journal of Applied Aquaculture*, 5: 21-31.
- CHEN, W.H.; SUN, L.T.; TSAI, C.L.; SONG, Y.L.; CHANG, C.F. 2002 Cold stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 126: 90-100.
- COLLIER, H.B. 1944 The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Assist. Journal*, 50: 550-552.
- COOPER, E. L. 1967 Lympho-mieloid organs of amphibia. I. Appearance during larval and adult stages of *Rana catesbeiana*. *Journal of Morphology*, 122: 381-398.
- COPPO, J.A. 2003 El médio interno de la rana toro *Rana catesbeiana*, Shaw 1802, *Revista Veterinaria*, 14(1): 25-41.

- CULLEY Jr., D.D. 1991 Bullfrog culture. In: NEIMANN-SORENSEN, A.; TRIBE, D.E.; NASH, C.E. Production of aquatic animals: crustaceans, mollusks, amphibians and reptiles, Amsterdam, Elsevier – World Animal Science C4: 185-205.
- DENVER, R.J. 1997 Environmental stress as a developmental cue: corticotrophin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormone and Behavior*, 31: 169-179.
- DIAS, D.C. 2006 *Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802)* Jaboticabal. 80p. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- DIAS, J.L.C. 1992 *Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (Rana catesbeiana Shaw, 1802).* São Paulo. 117p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- DIAS, J.L.C.; SENHORINI, I.L. 1991 Qualitative evaluation of the inflammatory response modulated by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. *Ciência e Cultura*, 43: 304-306.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1986 *Biology of amphibians*, Baltimore - Maryland, The Johns Hopkins University Press. 613p.
- EDDY, F.B. 1981 Effects os stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press. p.77-102.
- ELLIS, A.E. 1977 The leukocytes of fish: a review. *Journal of Fish Biology*, 11: 453-492.
- ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. 1986 Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology*, 28: 511-521.
- FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T.W. 1998 The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120 C: 177-192.

- FARRAR, E.S.; FRYE, B.E. 1977 Seasonal variation in the effects of adrenalin and glucagon in *Rana pipiens*. *General and Comparative Endocrinology*, 33: 76-81.
- FARRAR, E.S.; FRYE, B.E. 1979 Factors affecting normal carbohydrate levels in *Rana pipiens*. *General and Comparative Endocrinology*, 39: 358-371.
- FERREIRA, C.M. 2002 *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) como animais sentinelas*. São Paulo. 109p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, C.M.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; BARBOSA, C.J.S. 2001 Estresse e sistemas de criação. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 16-19 JUL., Bragança Paulista. *Anais...* São Paulo, Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura. p.37-40.
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 33: 14.
- FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TEIXEIRA, P.C.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M. 2003 I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 34: 95.
- FERREIRA, C.M.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2004 Contagem diferencial de glóbulos brancos no sangue periférico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*): determinação dos níveis basais. In: VIII EMBRAPOA, 19-22.OUT., Laguna. *Anais...* Santa Catarina, ABRAPOA. p.196.
- FIORANELLI S.A.; COPPO, N.B.; COPPO, J.A. 2004 Los glóbulos blanco de *Rana catesbeiana* (Anfíbia: Ranidae) Variación según sexo, edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste. Disponible em : <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.pdf>. Acesso em 20/03/2006.

- FONTANELLO, D.; FERREIRA, C.M. 1999 Sistemas de criação de rãs. In: X ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, São Miguel do Iguaçu. *Anais...Paraná*. p.3-20.
- FONTANELLO, D. 1994 Histórico da Ranicultura Nacional. In: LIMA, S.L.; FIGUEIREDO, M.R.C.; MOURA, O.M. (Eds) *Diagnóstico da Ranicultura: problemas, propostas de soluções e pesquisas prioritárias*. Viçosa, ABETRA, p. 3-6.
- FRANÇA, F.M.; DIAS, D.C.; TEIXEIRA, P.C.; ANTONUCCI, A.M.; ROCHA, G.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; MARCANTÔNIO, A.S.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M. 2006a Análises hematológicas de girinos de rãs-touro *Rana catesbeiana*, tratadas com dois probióticos. In: IX ENBRAPOA, 23-27 OUT, Maceió. *Anais... Alagoas*, ABRAPOA.
- FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C.; TEIXEIRA, P. C.; ANTONUCCI, A. M.; ROCHA, G. C.; RANZANI-PAIVA, M. J.; MARCANTONIO, A. S.; STEFANI, M. V.; FERREIRA, C. M. 2006b Análise hematológica de rãs-touro, *Rana catesbeiana*, na fase pós-metamorfose, tratadas com dois probióticos. In: AQUACIÊNCIA 2006, Bento Gonçalves. Aquicultura 2006 - Aquicultura e Sociedade: desafios para uma atividade sustentável e ambientalmente amigável, 2006.
- GAMPERL, A.K.; VIJAYAN, M.M.; BOUTILIER, R.G. 1994 Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 215-255.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. 1994 *Manual de Hematologia Veterinária*. São Paulo: Livraria Varela. p.39-52.
- GARDNER, R.G.; YEVICH, P.P. 1969 Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. *Journal of Fish Research*, 26: 433-447.
- GILMOUR, K.M. 1997 Gas exchange. In Evans, D.H. (Ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, New York, pp.101-127.

- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinic Pathology*, 56: 35-39.
- HERMAN, C.A. 1977 Comparative effects of epinephrine and norepinephrine on plasma glucose and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology*, 32: 321-329.
- HIPOLITO, M 1995 Causas de mortalidade na ranicultura. In: 1st INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY & VIII ENAR – ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, Viçosa. *Anais...Viçosa*, ABETRA/UFV, 2: p.199-206.
- HRUEB, T.C.; SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5^a ed., 1120-1125 p.
- HUTCHISON, V.H.; TURKEY, L.D. 1975 Glucose and lactate concentrations during activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of Comparative Physiology*, 99: 287-295.
- JIRGENSEN, C.B.; LARSEN, L.O. 1967 Neuroendocrine mechanism in lower vertebrates. *Neuroendocrinology*, 2: 485-528.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 1999 *Histologia Básica*. 9^a Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,. 427p.
- KALASHNIKOVA, E.T. 1976 On the classification of morphological elements in the blood of fish. *Journal of Ichthyology*, 3 (16): 459-472.
- KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.A. 1992 Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Medical and Biological Research*, 22: 1019-1022.

- KRUG, E. C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J.; NICOLL, C.S. 1983 Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 52:232-241.
- LAIDLEY, C.W.; LEATHERLAND, J.F. 1988 Cohort sampling, anaesthesia and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33: 73-88.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. 1992 *A tecnologia da criação de rãs*. Viçosa: Imp. Universitária. 168p.
- MAHAJAN, C.L.; DHEER, J.S. 1979 Cell types in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctatus*. *Journal of Fish Biology*, 14:481-487.
- MAHONEY, J.B.; MCNULTY, J.K. 1992 Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*, 121: 261-268.
- MARCANTONIO, A.S. 2005 *Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos*. Jaboticabal. 94p. Tese (Doutorado) –Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. 1977 Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997 Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.) *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 119-144..

- MODRÁ, H.; SVOBODOVÁ, J. 1998 Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Veterinária BRNO*, 67:215-226.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. 1999 Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.
- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. 1997 Cortisol induces changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15 (5): 385-394.
- MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GORDON GRAU, E.; IWAMA, G.K. 1997 Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. *Comparative Biochemistry Physiology*, 117A (3): 391-398.
- NAOUM, P.C.; NAGEL, A.A.; SILVA, F.S. 1986 Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em *Bufo paracnemis* (Amphibia-Anura). *Ciência e Cultura*, 38: 883-892.
- NOETHER, G.E. 1983 *Introdução à Estatística – uma abordagem não paramétrica* (2ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Dois, cap.14.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; PFEIFFER, W.C. 1996 Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34: 190-195.
- PANKHURST, N.,W.; SHARPLES, D.F. 1992 Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper *Pagrus auratus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 43: 345-356.

- PASANEN, S.; KOSKELA, P. 1974 Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. in northern Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47A: 635-654.
- PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. 1996 Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Brazilian Journal Veterinary*, 33(1): 15-18.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. 1989 Stress response and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7 (6): 253-258.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G; CARRAGHER, J.F.; SUMPTER, J.P. 1987 The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta*. *General and Comparative Endocrinology*, 68:249-259.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G; CHRISTIE, P. 1982 Recovery of the trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: A time-course study. *Journal of Fish Biology*, 24: 731-740.
- PICKERING, A.D 1984 Cortisol induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta*. *Freshwater Biology*, 21(1): 47-56.
- PICKERING, A.D. 1981 *Stress and Fish*. Academic Press, London, 367p.
- POTTINGER, T.G. 1998 Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *Journal of Fish Biology*, 53: 728-742.
- POTTINGER, T.G.; YEOMASN, W.E.; CARRICK, T.R. 1999 Plasma cortisol and 17 β -estradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 54: 525-532.

- RANZANI-PAIVA, M.J.T. 1995 Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. *Boletim do Instituto de Pesca*, 22(1): 23-40.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; EIRAS, A.C. 1992 Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná – PR. In: 7º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E 2º ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Peruíbe. *Anais...*São Paulo, Associação Brasileira de Aquicultura e Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, p.173-182.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; GODINHO, H.M. 1985 Estudos hematológicos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Boletim do Instituto de Pesca*, 12(2): 25–35.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. 2004a Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.de los A.P. (Ed.) *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela.p.89-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. 2004b Co-infestation of gills by different parasite groups in the mullet *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae): effects on relative condition factor. *Brazilian Journal of Biology*, 64: 677-682.
- RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU,C.; PELLETIER, E.; AUDET, C.; TJALVE, H. 1999 Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science Technology*, 33: 902-907.
- RIBEIRO-FILHO, O.P. 1998 Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27(4): 658-663.

- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R.; TRANT, J.M. 1988 Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and disease outbreak. *Progressive Fish-Culturist*, 49 (1): 1-12.
- ROOS, R.; RUMPF, R.P. 1987 Plasma levels of glucose, alanine, lactate, and β -hydroxybutyrate after mammalian insulin treatment in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *The Journal of Experimental Zoology*, 224: 49-57
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto do Butantan*, 20: 329-334.
- ROTLLANT, J. e TORT, L. 1997 Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 51: 21-28.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1996 *Fisiologia Animal, Adaptação e Meio Ambiente*. 5^a. Ed., São Paulo, Livraria Santos. 600p.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V. 1999 Comparative effects of ammonium and nitrate compounds on Pacific treefrogs and African clawed frogs embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 200-206.
- SLOMAN, K. A.; METCALFE, N. B.; TAYLOR, A. C.; GILMOUR, K. M. 2001 Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74: 383 -389.
- SMITH, C.L. 1954 The relation between seasonal hyperglycaemia and thyroid activity in the frog (*Rana temporaria*). *Journal of Endocrinology*, 10: 184-191.
- SORENSEM, E.M.B. 1991 Metal poisoning in fish. Florida: *CRC Press*. 597p.

- STÉFANI, M.V. 1996 *Metabolismo e crescimento da rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) alimentada com níveis crescentes de carboidratos*. Jaboticabal. 92p. Tese (Doutorado) –Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- SUMPTER, J.P.; PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. 1985 Stress induced elevation of plasma α -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 59: 257-265.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2004 *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias. 144p.
- TURNER, R.J. 1988 Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N. N.A. *Vertebrate Blood Cells*, New York,. Cambrige University Press,. p. 129-209.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. 2001 Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. *Brazilian Journal Veterinary Research. Animal Science*, São Paulo, 34(5): 270-275.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2004 Estresse em peixes – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. de los A.P. (Ed.) *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela.p.75-88.

- VIJAYAN, M.M.; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. 1991 Cortisol induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*, 82: 476-486.
- VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. 1994 The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU 486. *General and Comparative Endocrinology*, 96: 75-84.
- WANG, J.H.; CHANG, M.H. 1994 Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fish*, 46: 69-87.
- WEDERMEYER, G.A.; McLEAY, D.J. 1981 Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A.D. (Ed.) *Stress and fish*. London: Academic Press. (11): 247-276.
- WENDELAAR BONGA, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 592-625.
- WINBERG, S.; LEPAGE, O. 1998 Elevation of brain 5HT activity. POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *American Journal of Physiology* 274 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 43), R645-R654.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various of vertebrates. *Folia Haematologica*, 51:32-49.
- WRIGHT, P.A. 1959 Blood sugar studies in the bullfrog, *Rana catesbeiana*, *Endocrinology*, 64: 551-558.
- WRIGHT, M.L.; GUERTIN, C.J.; DUFFY, J.L.; SZATKOWSKI, M.C.; VISCONTI, R.F.; ALVES, C.D. 2003 Developmental and diel profiles of plasma corticosteroids in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135A: 585-595.

YOUNG, P.S.; CECH, J.J. 1993 Physiological stress responses to serial sampling and confinement in yong-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Comparative and Biochemistry Physiology*, 105A: 239-244.

ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. New Jersey, Pretice Hall, 718p.

8 – ANEXOS

Anexo 1

Cortisol

O procedimento segue o princípio básico do imunoensaio enzimático, onde existe competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com enzima ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância não marcada que está sendo analisada na amostra. O material não ligado é removido por decantação e lavagem das cavidades (Princípio do Ensaio).

Inicialmente foi aguardado até que todos os reagentes e amostras atingissem a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Preparou-se então a Solução do Conjugado Enzimático diluindo o Concentrado de Conjugado com o Diluente de Conjugado (1 parte de Concentrado: 50 partes de Diluente). Em seguida pipetou-se 25 μL de Padrões, Controles e Amostras nas cavidades apropriadas e adicionou 100 μL de Solução de Conjugado Enzimático diluído a cada cavidade utilizando um dispensador semi-automático. Bateu-se suavemente no suporte de cavidades por 5-10 segundos. Adicionaram-se ainda 100 μL de Anti-soro de Cortisol a cada cavidade utilizando dispensador semi-automático.

Após um período de incubação à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), por 45 minutos, com auxílio de agitador ajustado para 500-700 rpm, aspirou e lavou cada cavidade 5 vezes com a solução de lavagem diluída utilizando uma lavadora de microplacas semi-automática e em seguida drenou invertendo a placa sobre material absorvente. Adicionou-se então 100 μL de Solução de Cromógeno TMB a cada cavidade, incubando novamente as cavidades por mais 10 a 15 minutos à temperatura ambiente no mesmo agitador.

Por final adicionou-se 100 µL de Solução de Interrupção a cada cavidade, agitou-se suavemente com as mãos por 5-10 segundos e realizou-se a leitura de absorbância da solução presente nas cavidades (30 minutos) utilizando-se um leitor de microplacas ajustado para 450nm.

O resultado foi expresso em µg/dL e posteriormente transformado em ng/mL.

Glicose

Inicialmente aguardou-se até que todos os reagentes e amostras atingissem a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Tomou-se então um tubo como “branco”, um como “padrão” e outros como “teste”. No branco foi adicionado 1,0 mL do “Reagente 1”, no “padrão” foi adicionado 1 mL de “Reagente 1” mais 10,0 µL de “Solução Padrão”, e nos tubos testes foram adicionados 1,0 mL de “Reagente 1” mais 10,0 µL de soro.

Misturou-se vigorosamente o conteúdo dos tubos e em seguida estes foram levados para o banho-maria a 37°C , durante 15 minutos, tomando-se o cuidado de manter o nível da água acima do conteúdo dos tubos. Após o tempo de incubação procedeu-se a leitura em absorbância das amostras em espectrofotômetro a 505 nm acertando o zero com o branco.

A glicose foi estimada pela fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Anexo 2

Contagem de Eritrócitos (Er)

O método utilizado para a contagem dos eritrócitos foi o visual, em câmara hematómica de Neubauer. Esta câmara consiste em uma lâmina retangular de vidro espesso contendo dois retículos na porção central, separados longitudinalmente por um sulco profundo sobre a lâmina. Transversalmente, quatro sulcos limitam três plataformas. A central, onde estão os retículos, encontram-se deprimida 0,1mm em relação às laterais, dando a profundidade da câmara, limitada superiormente por uma lamínula especial adaptada firmemente sobre as plataformas laterais. O retículo, na câmara melhorada de Neubauer, é um quadrado de 3mm de lado e 9mm² de superfície, dividido em 9 áreas de 1mm², exceto quatro laterais e o da área central, está dividida em 25 quadrados de 1/25mm², sendo cada um destes subdividido em dezesseis quadradinhos de 1/400mm² totalizando 400 quadradinhos e 0,1mm³ na área central.

Inicialmente foram colocados 400 µL do diluente Hayen em microtubos de polietileno. A este conteúdo foram adicionados 2 µL de sangue, resultando em uma diluição final de 1:200. Em seguida agitou-se por dois minutos e, então, com auxílio de micropipeta, preencheu-se cada retículo da câmara de Neubauer. A contagem foi feita no aumento de 40x. Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em nº células x 10⁴/mm³ de sangue.

Obs. Solução de Hayen

0,6 g de bicloreto de mercúrio

5,0 g de sulfato de sódio

1,0 g de cloreto de sódio

200,0 mL de água destilada

*Conservar em geladeira a 4°C

Determinação do Hematócrito (Ht)

A determinação do hematócrito (Ht) foi feita através da técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971). Foi preenchido um tubo capilar com sangue, em seguida vedado em uma das extremidades com massa de modelar e levado à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram compactados na parte inferior do tubo e mostrado o volume por eles ocupado em relação ao sangue total. A seguir, foi feita a leitura com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem ou volume.

Determinação da Taxa de Hemoglobina (Hb)

A determinação da taxa da hemoglobina (Hb) é uma dos meios mais simples e usual como indicador de anemias e foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944). Com pipeta automática foram colocados 5 mL de cianometahemoglobina em tubo de ensaio e em seguida adicionou-se 20 µL de sangue. Depois de homogeneizado, aguardou-se por um período de 15 minutos. A amostra foi então levada à centrífuga a 3.500 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi colocada em cubetas de cristal e levada ao espectrofotômetro (a 540 nm), para ser realizada a leitura. O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão (branco). O valor encontrado em transmitância foi transformado em absorbância pela seguinte fórmula:

$2 - \log X$ x fator de correção, onde:

X= valor encontrado por espectrofotometria

Fator de correção= 40,86 previamente calculado pela curva de calibração

O resultado final foi dado em g/dL

Índices Hematimétricos Absolutos

Em hematologia existem três índices hematimétricos absolutos que servem para avaliar e classificar morfológicamente o sangue dos animais em geral. Com os valores do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os seguintes índices hematimétricos, segundo WINTROBE (1934):

- ***Volume Corpuscular Médio (VCM)*** permite avaliar o volume dos eritrócitos;

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{nº Eritrócitos}} \times 10 = \text{fL}$$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) permite medir o peso da hemoglobina existente nos eritrócitos;

$$\text{HCM} = \frac{\text{taxa de hemoglobina}}{\text{nº Eritrócitos}} \times 10 = \text{pg/célula}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) permite medir o peso da hemoglobina em 100 ml de sangue;

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina}}{\text{Hematócrito}} \times 100 = \%$$

Obs. Solução de Cianometahemoglobina

0,2 g de ferricianeto de potássio

1,0 mg de bicarbonato de sódio

0,05 g de cianeto de potássio

1000,0 mL de água destilada

*Conservar em geladeira a 4°C

Confecção das extensões sangüíneas

Para cada animal foram feitas duas lâminas de extensões sangüíneas. Previamente, as lâminas foram lavadas com água e sabão, enxaguadas com água e colocadas em álcool/éter (1:1). Procedeu-se em seguida a secagem dessas lâminas com papel absorvente.

As primeiras alíquotas de sangue destinadas à avaliação dos parâmetros hematológicos foram colocadas em uma das extremidades da lâmina, em seguida com outra lâmina, com os cantos recortados, colocada em frente à gotícula e em ângulo de 45° sobre a lâmina inferior, fez-se um movimento para frente de modo a deslizar e espalhar a gotícula de sangue. Depois de prontas, as extensões foram coradas com o corante de ROSENFELD (1947), sendo cobertas por 10 gotas deste corante, ficando de três a cinco minutos em repouso. Em seguida,

foi colocada a mesma quantidade de água destilada e homogeneizado com um bastão. Após 10 minutos as lâminas foram lavadas com água corrente, e secas a temperatura ambiente.

Contagem Total de Leucócitos (CTL) e Contagem Total de Trombócitos (CTT)

A Contagem Total de Leucócitos (CTL) e a Contagem Total de Trombócitos (CTT) foi realizada nas extensões sanguíneas, em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100x) onde foram contadas 2.000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) das quais marcou-se a quantidade de leucócitos e trombócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo aleatório seguinte. Através de uma regra de três, considerando-se o número total de células contado na câmara de Neubauer, calculou-se o número total de leucócitos e de trombócitos. A partir deste cálculo, calculou-se os valores absolutos de cada leucócito, baseado em sua porcentagem (HRUEB e SMITH, 1998).

Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL)

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) foi realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) onde foram contados 200 leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) dos quais marcou-se a

proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo logo seguinte. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem, obtendo-se, desta forma, o valor relativo. O valor absoluto foi calculado por uma regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento.

Obs. Corante May-Grünwald- Giemsa

A técnica de coloração segundo ROSENFELD (1947) é uma mistura de corantes:

0,97 g Giemsa em pó

0,53 g May-Grünwald em pó

1.000 mL Metanol

Obs. Solução de heparina:

1,0 mL de solução de heparina (5.000 UI) (Liquemini[®])

50,0 mL de solução salina 0,7%

* Conservar em geladeira a 4°C