



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**



**Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos  
girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o  
desenvolvimento e metamorfose**

**Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia**  
*Médica Veterinária*

**Jaboticabal**  
**São Paulo - Brasil**  
**2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos  
girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o  
desenvolvimento e metamorfose**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em  
Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP –  
CAUNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor em  
Aqüicultura.

**VERÔNICA REGINA LOBATO DE OLIVEIRA BAHIA**  
Doutoranda

Profa. Dra. **LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI**  
Orientadora

Profa. Dra. **MARTA VERARDINO DE STÉFANI**  
Co-orientadora

**Jaboticabal/SP**  
**Junho de 2007**

O48 Bahia, Verônica Regina Lobato de Oliveira  
m Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos  
girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o  
desenvolvimento e metamorfose / Verônica Regina  
Lobato de Oliveira Bahia. ---Jaboticabal, 2007  
xiii, 130 f.: il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Centro de Aqüicultura da UNESP, 2007

Orientador: Laura Satiko Okada Nakaghi

Banca examinadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério,  
João Martins Pizauro Junior, Maria Célia Portella, Maria  
Helena Corrêa Varella

Bibliografia

1. rã-touro. 2. Sistema digestório. 3. Enzimas  
digestivas. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.94

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** "Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos da rã-touro (Rana catesbeiana) durante o desenvolvimento e metamorfose".

**AUTORA:** VERÔNICA REGINA LOBATO DE OLIVEIRA BAHIA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



**Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi**



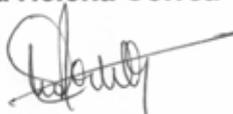
**Dra. Claudia Maris Ferreira Mostério**



**Dr. João Martins Pizzaro Junior**

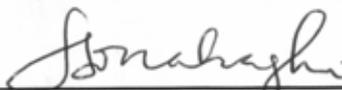


**Dra. Maria Helena Correa Varela**



**Dra. Maria Célia Portella**

**Data da realização: 25 de junho de 2007.**



**Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi**

*Sonho que se sonha só*

*É só um sonho que se sonha só*

*Mas sonho que se sonha junto é realidade*

*(Raul Seixas)*

## *Dedicatória*

A Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi  
por confiar mesmo sem conhecer,  
por acreditar mesmo frente a todas as adversidades,  
por apoiar nas horas mais difíceis,  
por nunca transparecer o medo e a insegurança,  
por ser mais que uma orientadora,  
por ser uma grande amiga.

*Amigo é coisa para se guardar  
No lado esquerdo do peito,  
mesmo que o tempo e a distância digam não,  
mesmo esquecendo a canção.  
O que importa é ouvir a voz que vem do coração.  
(Fernando Brant e Milton Nascimento)*

## *Agradecimentos Especiais*

*“A todos que tornaram um sonho realidade”.*

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Laura S. O. Nakaghi, Marta V. De Stéfani, João M. Pizauro Junior, pelos ensinamentos e principalmente pela paciência e compreensão.

Aos técnicos, Sr. Orandi Mateus, Márcio R. Reche, Fátima A. R. Harnich e Claudia A. Rodrigues pelo auxílio e realização de muitas das técnicas de laboratório e manejos com os girinos.

Aos alunos de Iniciação Científica, Leila Buttler e Luis Flávio José, por serem meus braços, o direito e muitas vezes o esquerdo também.

Ao meu marido Marcelo Bahia e aos meus filhos (trigêmeos) Tereza, Carolina e Marcos Fernando, por todo apoio emocional.

## *Agradecimentos*

*“Tenho um amigo, que o sonho dele era participar daqueles agradecimentos especiais em que se diz sem essa pessoa esse trabalho não se realizaria.... pois é, eu não tenho uma única pessoa, tenho várias e gostaria de antemão agradecer a todos vocês, pois sem vocês esta tese não se realizaria”.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo auxílio concedido na forma de Bolsa de Doutorado (processo nº: 03/12575-6) e auxílio pesquisa (processo nº: 04/15415-2).

Ao Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), pelo fornecimento do material biológico necessário a este estudo.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, ao Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal (FCAV/UNESP) pelo empréstimo de toda infraestrutura e serviços gentilmente prestados.

Aos membros do Setor de Ranicultura do CAUNESP, em especial a Profa. Dra. Marta V. De Stéfani, Márcio R. Reche e Idair Mauricio Marcelino, pela orientação e ajuda no manejo com os girinos.

Aos membros do Laboratório de Histologia (FCAV/UNESP), Profa. Dra. Laura S. Nakaghi, Profa. Dra Isabel Boleli, Profa. Dra. Maria Rita Pacheco e Sr. Orandi Mateus pela orientação, auxílio na interpretação das análises histológicas e confecção das lâminas.

Aos membros do Laboratório de Enzimologia Aplicada (FCAV/UNESP), Prof. Dr. João M. Pizauro Jr., Fátima Harnich, Vanessa, Gisele, Flávio, Gustavo, Diogo, Michel, Márcia e Tiago pela orientação e pela ajuda das análises bioquímicas.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), Cláudia A. Rodrigues e Antônio Carlos Homem, pela realização do processamento das amostras de

microscopia eletrônica.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia – Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP/USP pelos serviços gentilmente prestados a este trabalho (Maria Dolores Seabra Ferreira).

A Profa. Dra. Maria Helena C. Varella, pelas sugestões nas análises anatômicas.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros, pelo auxílio na análise estatística.

A Érika Neumann, pelos desenhos esquemáticos em nanquim.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério, Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior, Profa. Dra. Maria Célia Portella, Profa. Dra. Maria Helena Corrêa Varella, pela atenção e pelas valiosas sugestões que enriqueceram meu trabalho.

Aos companheiros de laboratório e reuniões científicas, Clara, Marilda, Angélica, Camila, Daniela, Daniella Almada, Érico, Érika, Fernanda, Francine, Leila, Lilian, Márcio, Maria do Carmo, Maria Isabel, Luciana e Peter pela amizade, opinião e ajuda no meu trabalho, pela companhia, momentos de descontração e festas realizadas que estarão sempre na minha memória.

A todos os professores, técnicos e alunos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental FMRP/USP em especial a Profa. Dra. Katarina Takahashi, Profa. Dra. Tiemi S. Hojo, por todo carinho e atenção.

À comunidade paraense e seus agregados de Ribeirão Preto, Ana Paula, Nilson, “menino Plínio”, Eliana, Ciane, Eleonidas, Giovane, Keyko, Fábio, Renata, Maria Sol, Rachel, Carmem, Danilo, Stefano, Patrícia, Pierre, Marcio, Richard e Marineide por todo amor, dedicação e aos longos almoços ajantarados inesquecíveis.

Aos meus pais Raymundo e Terezinha, às minhas irmãs Enedina, e Heloisa, minha sobrinha Chloé, minha sogra Belizia e ao meu cunhado Márcio por todo apoio emocional, paciência e dedicação durante todo período de execução a elaboração da Tese de

Doutorado.

Ao meu Marido e meus filhos trigêmeos por todo amor e apoio incondicional (e por tudo).

Aos meus tios Carlos, Consolação, Adelino, Célia, Nazareth e Maria de Jesus, obrigada por todo carinho.

À professora Oneide, por todo incentivo e por perceber que pequenas limitações não são grandes obstáculos.

À minha orientadora de Iniciação Científica e Mestrado Cláudia Azevedo-Ramos, o que você diz não está escrito nos livros.

Às minhas babás Ana Paula, Luiza e Talita e ao Colégio Santo André em nome de todo corpo docente do berçário e mini-maternal, muito obrigada por cuidar dos meus filhos e proporcionar toda tranquilidade para execução desta tese.

Aos meus amigos de Belém, Ribeirão Preto e Jaboticabal, Renata, Mônica, Jane, Diva, Diana, D. Lourdes, Hildegard, Juliana, Andréia, Alessandra, Marcelo, Gabriel, Ivelise, Claudinha, Sheyla, Nathan, Thales, Rose, Deborah, Karina, Fernando, Karla, Rodrigo, Sandra, Carlos Henrique, Abayomi, Clara Sofia, Silvana, José, Sirlei, Eugenia, Sérgio, Teresinha, Marina, Gabriela, Valéria, Nadma, Gilberto, Débora, Daniela, Silvana, Cândida, Tais, Tânia, Família Okada Nakaghi (Laura, Edson, Eduardo, Leonardo, Ricardo), Luzia Nakaghi, Veralice, Fátima, D. Ana, Suerli, Virginia, Cristiana, Liliam e Micheli por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

Não esquecendo de agradecer a Deus, Nossa Senhora e a todos os Santos (Antônio, Francisco, Benedito, Longuinho, Miguel, etc...) por proporcionar alívio nas horas de desesperos.

A todos vocês um obrigado especial por tornar a jornada do Doutorado

inesquecível.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I – Considerações Gerais</b> .....	<b>8</b>
O processo de metamorfose.....	<b>11</b>
Desenvolvimento do sistema digestório dos girinos durante a metamorfose.....	<b>12</b>
Perfil das enzimas digestivas dos girinos durante a metamorfose.....	<b>15</b>
Referências.....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO II – Desenvolvimento ontogenético do aparato oral e cavidade orofaríngea dos girinos da rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>)</b> .....	<b>23</b>
Resumo.....	<b>24</b>
Introdução.....	<b>25</b>
Material e Métodos.....	<b>27</b>
<i>Classificação dos girinos</i> .....	<b>27</b>
<i>Animais experimentais</i> .....	<b>28</b>
<i>Morfogênese da cavidade bucal</i> .....	<b>28</b>
Resultados.....	<b>29</b>
Discussão.....	<b>31</b>
Conclusão.....	<b>35</b>
Referências.....	<b>44</b>

**CAPÍTULO III – Sintopia e análise morfométrica do sistema digestório dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o processo de metamorfose.... 48**

Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
<i>Classificação dos girinos.....</i>	52
<i>Animais experimentais.....</i>	52
<i>Sintopia dos órgãos do sistema digestório.....</i>	53
<i>Morfometria.....</i>	53
<i>Análise estatística.....</i>	54
Resultados.....	54
Discussão.....	58
Conclusão.....	62
Referências.....	72

**CAPÍTULO IV – Histologia do intestino anterior, médio e posterior dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose..... 79**

Resumo.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	83
<i>Classificação dos girinos.....</i>	83
<i>Animais experimentais.....</i>	83
<i>Análise histológica.....</i>	84
Resultados.....	85
Discussão.....	87
Conclusão.....	90
Referências.....	95

<b>CAPÍTULO V – Morfologia e enzimologia do pâncreas e fígado dos girinos da rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>) durante o desenvolvimento e metamorfose.....</b>	<b>101</b>
Resumo.....	102
Introdução.....	103
Material e Métodos.....	106
<i>Animais experimentais</i> .....	106
<i>Análise histológica</i> .....	106
<i>Análises enzimáticas</i> .....	107
<i>Obtenção dos extratos enzimáticos</i> .....	108
<i>Determinação da atividade da amilase pancreática</i> .....	108
<i>Determinação da atividade da tripsina pancreática</i> .....	109
<i>Dosagem de proteína</i> .....	109
<i>Análise estatística</i> .....	109
Resultados.....	110
<i>Histologia do fígado e pâncreas</i> .....	110
<i>Perfil das enzimas digestivas</i> .....	111
Discussão.....	112
Conclusão.....	115
Referências.....	121
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>128</b>

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO III**

**Tabela 1:** Médias do comprimento e do peso do intestino dos girinos de *R. catesbeiana* e razão entre o comprimento do intestino com o comprimento total e parcial dos girinos nos diversos estágios de desenvolvimento..... **70**

**Tabela 2:** Médias do peso e coeficiente somático do fígado e pâncreas dos girinos de *R. catesbeiana* nos diversos estágios de desenvolvimento..... **71**

**CAPÍTULO V**

**Tabela 1:** Atividade da tripsina e da amilase de extrato de pâncreas de girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*), nos diversos estágios de desenvolvimento. Os resultados representam as médias de três determinações e seus respectivos desvios padrão..... **120**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Eletronmicrografias do aparato oral do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Eletronmicrografias do aparato oral do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 3.</b> Eletronmicrografias do aparato oral do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 4.</b> Eletronmicrografias da cabeça do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 5.</b> Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 6.</b> Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b> Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 8.</b> Eletronmicrografias do teto da região orofaríngea do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b> Eletronmicrografias do teto da região orofaríngea do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Eletronmicrografia da maxila do imago de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>43</b>

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografia de girino de <i>R. catesbeiana</i> mostrando os comprimentos total (CT) e parcial (CP).....	<b>54</b>
<b>Figura 2.</b> Desenhos esquemáticos dos órgãos do sistema digestório do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de <i>R. catesbeiana</i> ....	<b>64</b>
<b>Figura 4.</b> Desenhos esquemáticos dos órgãos do sistema digestório do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de <i>R. catesbeiana</i> ....	<b>66</b>
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografia da cavidade visceral do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia da região ventral do fígado do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia da vesícula biliar do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia do ducto colédoco do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>67</b>

<b>Figura 10.</b> Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de <i>R. catesbeiana</i> ...	<b>68</b>
<b>Figura 11.</b> Médias dos valores dos comprimentos total e parcial dos girinos (cm) ao longo dos estágios de desenvolvimento .....	<b>69</b>
<b>Figura 12.</b> Médias dos valores de peso (g) dos girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao longo dos estágios de desenvolvimento.....	<b>69</b>

#### CAPÍTULO IV

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias da região próxima a faringe do manicoto glandular do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografias da região próxima ao intestino médio do manicoto glandular do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias do estômago do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>92</b>
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografias do estômago do imago de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>92</b>
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografias dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografias dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografias dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografias dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>94</b>
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografias dos intestinos do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>94</b>

#### CAPÍTULO V

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias do fígado do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>116</b>
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografias da vesícula biliar do girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>116</b>
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias do pâncreas de girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>117</b>
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografias do pâncreas de girino de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>118</b>
<b>Figura 5.</b> Perfil da atividade específica da tripsina pancreática dos girinos de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>119</b>
<b>Figura 6.</b> Perfil da atividade específica da amilase pancreática dos girinos de <i>R. catesbeiana</i> .....	<b>119</b>

## RESUMO GERAL

A importância da fase de girino para a ranicultura reside no fato de que após a metamorfose existirão animais em condições compatíveis com os índices zootécnicos. Entretanto, a compreensão dos processos morfológicos e fisiológicos pelos quais os girinos passam durante o seu desenvolvimento e metamorfose ainda é limitada. Neste contexto, este estudo tem como objetivo descrever as mudanças morfológicas do sistema digestório e o perfil das enzimas digestivas dos girinos da rã touro (*Rana catesbeiana*), durante seu desenvolvimento e metamorfose. Os girinos utilizados foram cedidos pelo Setor de Ranicultura do CAUNESP. As análises biométricas, anatômicas e histológicas foram realizadas no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e as análises das enzimas digestivas realizadas no Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP. Para a biometria, anatomia e histologia, os girinos foram separados em estágios de desenvolvimento, anestesiados em água com gelo a 4°C e tiveram seu comprimento total, parcial e peso registrados. Posteriormente, o tubo digestivo foi dissecado e avaliou-se o comprimento, a largura e o peso do intestino, fígado e pâncreas. Para a microscopia de luz, o tubo digestivo foi fragmentado em intestino anterior, intestino médio e posterior, fígado e pâncreas, que foram fixados em Bouin e processados de acordo com a metodologia do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Para microscopia eletrônica de varredura, a região oral foi dissecada, fixada em solução de Karnovsky e pós-fixada em tetróxido de ósmio, e as amostras processadas de acordo com o Laboratório de Microscopia Eletrônica. Para a análise das enzimas digestivas, os girinos foram separados em estágios de desenvolvimento e permaneceram em jejum por 24 horas antes da coleta. O pâncreas foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado para as análises enzimáticas. As atividades da amilase e tripsina foram realizadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia. Para medir as diferenças na

morfometria e no perfil enzimático entre os estágios de desenvolvimento foi utilizada análise de variância (ANOVA). Anatomicamente, as maiores mudanças ocorreram nos estágios iniciais da metamorfose em que o girino deixa de se alimentar. A cavidade bucal sofreu uma remodelação, sendo que o aparato oral degenerou e ocorreu o desenvolvimento da língua e da boca propriamente dita. Concomitantemente, houve uma reestruturação de todos os órgãos da cavidade visceral. O estômago aumentou de tamanho e migrou da região lateral direita para região lateral esquerda. O fígado também cresceu, passando a ocupar a maior parte da cavidade visceral, enquanto que o pâncreas e o intestino sofreram uma diminuição de seu tamanho. Histologicamente, os epitélios tanto do estômago quanto do intestino sofreram remodelação. O epitélio neoformado apresentou características próprias tais como: a presença da submucosa e das pregas no epitélio do estômago e intestino, que permaneceram em toda a fase adulta. O pâncreas também sofreu reestruturação do tecido endócrino e exócrino. As células do fígado não se alteraram morfológicamente durante a metamorfose. Em relação à atividade enzimática observou-se um aumento tanto da amilase quanto da tripsina, a partir do estágio 35, que diminuiu no período da metamorfose. Os resultados obtidos no presente estudo são basicamente consistentes com as mudanças encontradas no sistema digestório das espécies *Xenopus laevis* e *Rana temporaria*. Entretanto, estas mudanças não podem ser extrapoladas para outras espécies de anuros, pois entre as várias espécies, existe uma grande variedade de modos de alimentação que resultarão em uma diversidade de estruturas do sistema digestório.

## GENERAL ABSTRACT

The importance of the tadpole phase to the raniculture is due to the fact that from this phase animals that are in agreement with zootechnical indexes must be obtained, after metamorphosis. However, few studies aim to understand the physiological and morphological processes that tadpoles undergo during their development and metamorphosis. In such context, the present study describes the morphological changes and the enzymatic profile of the bullfrog tadpole's (*Rana catesbeiana*) digestive system, during development and metamorphosis. The animals used in the tests were made available by the CAUNESP's Frog Farming Sector. Biometrical, anatomical and histological analyses were performed at the *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal* and *Laboratório de Microscopia Eletrônica*. The analysis of the digestive enzymes were performed at the *Laboratório de Tecnologia* of *FCAV-UNESP*. For biometry, anatomy and histology, tadpoles were separated according developmental stages and anesthetized in water with ice at 4°C. Their total and partial lengths, as well as their weight were recorded. Afterwards, the digestive tubes were removed and the length, width and weight of the intestine, liver and pancreas were registered. For light microscopy, the digestive tube was fragmented into stomach, esophagus, medium and posterior intestines, liver and pancreas. Fragments were fixated in Boiun's solution according to the methodology of the Histology Laboratory of the *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal*. For scanning electronic microscopy, oral region was dissected and fixated in Karnovsky's solution. A second fixation was performed in osmium tetroxide. All samples were processed according to the *Laboratorio de Microscopia Eletrônica*. For the analysis of digestive enzymes, tadpoles were separated according their developmental stages and unfed for 24 hours before harvesting. The pancreas were harvested, frozen in liquid nitrogen and, afterward, homogenized for enzymatic analysis. Amylase and trypsin activity measurements were performed following the protocol of the *Laboratorio de Enzimologia Aplicada* of the

*Departamento de Tecnologia.* Analysis of the variance (ANOVA) was used to measure differences in the morphometry and enzymatic profiles according to the stages of metamorphosis where tadpoles stop feeding. The tadpole oral cavity underwent changes such as the degeneration of oral apparatus and development of tongue and true mouth. At the same time, there was a new organization of all organs of the visceral cavity. The stomach enlarged and migrated from the right lateral region to the left. Also, we observed that the liver increased filling most of the visceral cavity while pancreas and gut reduced their sizes. Histologically, a new epithelium developed in the stomach and gut. Such new epithelium showed specific features that remained throughout the adult phase. The pancreas also showed changes in its endocrine and exocrine tissue and liver cells were the only ones that did not suffer morphological changes during metamorphosis. Regarding the enzymatic activity, both amylase and trypsin peaked around stage 35, followed by a decrease during metamorphosis. The results obtained in the present study are consistent with previous reports on the changes in the digestive system of *Xenopus laevis* and *Rana temporaria* during metamorphosis. However, such changes should not be extrapolated to other anura species, since there is a variety of food habits among different species that will ultimately impact the digestive system structures.

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da ranicultura nacional, tornaram-se necessários mais estudos visando minimizar os custos com a produção das rãs nas suas diversas fases de desenvolvimento. A criação de girinos é a etapa fundamental para o bom funcionamento do ranário, pois dela haverá de resultar, após a metamorfose, animais em condições compatíveis com os índices zootécnicos. Entretanto, a alimentação constitui-se em um dos pontos críticos.

Estudos têm destacado a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas de alimentação e nutrição de girinos. No entanto, a maioria dos trabalhos sobre exigências nutricionais dos mesmos está relacionada às necessidades de proteína bruta, havendo poucos estudos relacionados à digestão de nutrientes e necessidades de carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais. Em consequência deste pouco conhecimento, normalmente, utiliza-se para alimentação dos girinos, rações empíricas ou destinadas para peixes ou aves, animais que possuem necessidades nutricionais diferentes dos girinos.

O domínio da criação da rã-touro ocorrerá somente quando for ministrado às rãs e aos girinos alimento com a composição nutricional adequada à cada fase de desenvolvimento, bem como o manejo adequado deste alimento. Para que isso ocorra, faz-se necessário um maior conhecimento sobre os processos que envolvem a digestão dos nutrientes (morfofisiologia do sistema digestório), manejo alimentar (consumo, quantidade e frequência) e necessidades nutricionais (proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais), para cada fase de desenvolvimento.

Os estudos nesta linha poderão contribuir para o desenvolvimento de melhores técnicas de formulação de rações compatíveis com as necessidades dos girinos e, assim,

proporcionar um maior aproveitamento pelos girinos dos alimentos a serem oferecidos e, conseqüentemente, um maior desempenho e lucro na produção das rãs.

## OBJETIVOS GERAIS

Descrever a anatomia funcional do sistema digestório e a morfometria do tubo digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento larval e metamorfose.

Descrever o perfil das enzimas digestivas em cada estágio do desenvolvimento dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever a morfologia do aparato oral e da cavidade orofaríngea dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose.

Descrever a sintopia e analisar a morfometria do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*).

Descrever o desenvolvimento do intestino anterior, médio e posterior dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose.

Descrever o desenvolvimento do fígado e do pâncreas dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose.

Descrever o perfil enzimático das atividades da tripsina e amilase pancreáticas durante os estágios de desenvolvimento e metamorfose dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*).

## *CAPÍTULO I*

---

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Os girinos representam a fase larvária dos anfíbios e seu ciclo de vida pode ser dividido em três fases: embrionária, larval e metamorfose. A fase embrionária constitui o período da fecundação e o desenvolvimento dentro do ovo, a fase larval inicia-se com a eclosão do ovo e todo o período de desenvolvimento do girino, enquanto que a metamorfose se caracteriza pelo momento em que ocorrem as mudanças do girino para o anfíbio adulto (ALTIG; McDIARMID, 1999).

Diversas classificações foram feitas para caracterizar o desenvolvimento dos girinos (SHUMWAY, 1940; TAYLOR; KOLLROS, 1946; GOSNER, 1960; ETKIN, 1968; HOUILLON, 1973) sendo as tabelas de Gosner (1960) e de Etkin (1968) as mais utilizadas.

Gosner (1960) propôs uma classificação para o desenvolvimento dos girinos baseado nas alterações morfológicas que ocorrem neste período. Esta classificação é dividida em 46 estágios de desenvolvimento, sendo que os estágios 1 ao 24 correspondem ao desenvolvimento embrionário, enquanto que os estágios 25 ao 35 correspondem à fase de crescimento do corpo e o desenvolvimento dos membros posteriores. Dos estágios 36 ao 41 há uma estabilização do crescimento corporal e uma maturação dos membros posteriores e, finalmente, dos estágios 42 ao 46 ocorre a metamorfose propriamente dita, com desenvolvimento dos membros anteriores, reabsorção da cauda e reestruturação da mandíbula (Anexo 1).

Etkin (1968), entretanto, definiu o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimentos dependentes dos hormônios da tireóide: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax metamórfico, este último subdividido em três fases: inicial, média e tardia. A pré-metamorfose corresponde aos estágios 01 ao 30 da tabela de Gosner (1960), nos quais o desenvolvimento dos girinos é independente da função tireoideana. A pró-metamorfose

inicia-se no estágio 31 com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios tireoideanos e vai até o estágio 41 da tabela de Gosner (1960). O clímax metamórfico inicia-se no estágio 42 e vai até o estágio 46 da tabela de Gosner (1960).

A eclosão dos girinos ocorre a partir do estágio 20 da tabela de Gosner (1960) e, neste estágio, os girinos não possuem movimentos natatórios e se alimentam das suas reservas nutritivas (saco vitelínico). No estágio 25 (GOSNER, 1960) ocorre a absorção total do saco vitelínico, encapsulação das brânquias e maturação de estruturas anatômicas utilizadas na captura do alimento. Nesta fase, os girinos passam a consumir organismos planctônicos e movimentam-se livremente à procura de alimento (DUELLMAN; TRUEB, 1986; ALTIG; McDIARMID, 1999).

À medida que os girinos crescem ocorrem mudanças mais abrangentes no comportamento alimentar, como consumo de material vegetal e animal, podendo ainda, haver consumo de carcaça de outros girinos, de ovos de peixes e de anfíbios e das próprias fezes (STEINWASCHER, 1978; DUELLMAN; TRUEB, 1986).

Os girinos se alimentam raspando, com a boca, materiais aderidos ao substrato e liberando na água as partículas de alimento que são posteriormente filtradas. Alternativamente, a filtração é feita à medida que aspiram a água, havendo a ingestão de partículas de proteínas, gorduras e bactérias (KENNY, 1969; DUELLMAN; TRUEB, 1986; ALTIG; McDIARMID, 1999).

Burry e Whelan (1985) verificaram que os girinos de rã-touro alimentam-se, principalmente, de plantas aquáticas e alguns micro invertebrados. Veiga (1989) observou que os girinos se alimentam tanto de proteína de origem vegetal quanto de animal, sendo que a de origem vegetal promove um maior crescimento, retardando, contudo, o processo de metamorfose.

## O processo de metamorfose

A metamorfose é um período de grandes transformações pós-embriônicas que envolvem mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, na qual um organismo altera seu modo de vida. Nos anfíbios, a metamorfose é caracterizada por três grandes alterações: (1) regressão de estruturas e funções utilizadas apenas nos girinos, (2) transformações de estruturas larvais em estruturas úteis nos adultos e (3) desenvolvimento de estruturas e funções que são essenciais apenas nos adultos. Cada uma das três classes de anfíbios, Anura, Caudata e Gymnophiona, passam por metamorfose, embora nem todas as espécies de cada classe sofram tal processo (DUELLMAN; TRUEB, 1986; AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY, 2007).

A metamorfose nos anuros é um fenômeno principalmente endócrino regulado pelos hormônios tireoideanos. Gundernatsch (1912 apud DUELLMAN; TRUEB, 1986) descobriu que a metamorfose dos girinos de *Rana temporaria* era acelerada quando alimentados com tireóide de cavalos. Posteriormente, análises mais detalhadas confirmaram a função destes hormônios no processo de metamorfose.

Etkin (1964 apud GARCIA; FERNANDEZ, 2001) observou que girinos tireoidectomizados nunca sofriam metamorfose no decorrer do seu desenvolvimento, entretanto, o mesmo não ocorria com girinos tireoidectomizados tratados com quantidades crescentes de hormônios tireoideanos (triiodotironina - T<sub>3</sub> e tiroxina - T<sub>4</sub>). Com isso, Etkin (1968) calculou a concentração dos hormônios tireoideanos nas diversas fases de desenvolvimento dos girinos, sendo o clímax metamórfico a fase em que ocorre o maior nível de secreção destes hormônios.

Os hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> induzem mudanças morfológicas e funcionais dos tecidos conjuntivo e muscular, da pele, dos rins, dos sistemas nervoso, sensorial, digestório e respiratório, atuando tanto nos processos degenerativos, como no desenvolvimento e diferenciação celular (DUELLMAN; TRUEB, 1986; KAWAI et al., 1994; TATA, 1999).

Outros hormônios também atuam no processo de metamorfose de forma sinérgica ou antagônica com os hormônios tireoideanos. Os corticosteróides atuam na regressão do intestino, no surgimento dos membros anteriores e na reabsorção da cauda, sendo sua ação sinérgica ao T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TATA, 1999). A prolactina atua no crescimento larval e age de forma antagônica aos hormônios tireoideanos, além de exercer uma ação inibitória diretamente na glândula tireóide (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TATA, 1999).

As mudanças que ocorrem durante a metamorfose nos anuros são extremamente radicais. As mudanças bioquímicas são menos visíveis: observa-se um aumento na produção de proteínas séricas, alteração no metabolismo do ferro devido ao aumento da ceruloplasmina, mudança no tipo de hemoglobina, mudança no ciclo da uréia e aumento da síntese de DNA e RNA (THEIL, 1973; JUST; ATKINSON, 1988; MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; DUELLMAN; TRUEB, 1986).

As alterações morfológicas são mais exuberantes: observa-se o desenvolvimento dos membros, a degeneração das brânquias concomitante ao desenvolvimento dos pulmões, a reabsorção da cauda, o desenvolvimento das glândulas dermais, dos olhos, a formação da boca e da língua e a diferenciação do trato digestório (BONNEVILLE, 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; THIBAudeau; ALTIG, 1988; PAULSON et al., 1995; ROVIRA et al., 1995; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

### **Desenvolvimento do sistema digestório dos girinos durante a metamorfose**

Uma das mudanças mais drásticas que ocorre durante a metamorfose é a remodelação do sistema digestório. Durante este período, ocorre uma acentuada diminuição do intestino, além do desenvolvimento do estômago, degeneração da região oral do girino com a formação da boca e desenvolvimento da língua (BONNEVILLE, 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; PAULSON et al., 1995; ROVIRA et al.,

1995; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

A região oral dos girinos possui vários dentículos e papilas na região labial, além de um bico córneo que facilita a captura do alimento. No interior da cavidade, mais especificamente no assoalho da faringe, existem quatro arcos branquiais, sendo que a superfície dorsal destes arcos é coberta pelas guelras filtradoras que filtram a água e retém o alimento. Durante a metamorfose, as guelras e os arcos branquiais desaparecem e ocorre o desenvolvimento da mandíbula e da língua (THIBAudeau; ALTIG, 1988; PAULSON et al., 1995; ALTIG; McDIARMID, 1999).

Simultaneamente, a região gástrica sofre consideráveis alterações histológicas, sendo que, o estômago propriamente dito pode ser definido somente através de critérios histológicos. Na fase inicial do desenvolvimento dos girinos de *Rana temporaria*, a região gástrica é constituída por uma espessa camada de mucosa e uma fina camada muscular e serosa. A mucosa é constituída por um epitélio simples colunar, composto de células ciliadas e caliciformes, possuindo glândulas constituídas principalmente pelas células oxínticas e ocasionalmente por células endócrinas (ROVIRA et al, 1995; VILLARO et al., 1998, 2001).

Durante a metamorfose, importantes mudanças histológicas e histogênicas ocorrem. Rovira et al. (1995) observaram que a camada mucosa do estômago foi a mais afetada pelos processos histológicos durante o início da metamorfose em girinos de *R. temporaria*. Há uma redução do seu tamanho, com distinção de duas zonas: uma mais apical com distintas áreas de degeneração e presença de células fagocíticas e uma mais basal com intensa regeneração de tecido. A submucosa, que na fase inicial do desenvolvimento do girino não era distinguida, desenvolve-se e a camada muscular passa a ser constituída de duas camadas, uma mais interna circular e outra externa longitudinal (ROVIRA et al., 1995; VILLARO et al., 1998).

No final da metamorfose, o estômago está completamente formado. As camadas

submucosa e muscular estão bem desenvolvidas e a mucosa está diferenciada em epitélio mucosecretório com a presença de células oxintopépticas, produtoras de ácido clorídrico e pepsinogênio (ROVIRA et al., 1995; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

O intestino é o órgão do sistema digestório que mais sofre modificação durante o processo de metamorfose. Nos estágios iniciais do desenvolvimento dos girinos, o intestino é caracterizado por um epitélio simples colunar bastante desenvolvido, denominado tecido primário, seguido por uma fina camada de tecido conjuntivo e muscular (BONNEVILLE 1963; MARSHALL; DIXON, 1978; ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1987; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

No início da metamorfose, ocorre uma intensa degeneração na mucosa do tecido primário do intestino. Observa-se uma grande quantidade de lisossomos no interior das células epiteliais que, quando examinados sob microscopia eletrônica, mostram características de vacúolos autolíticos e corpos residuais (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996). A degeneração não é confinada apenas no interior dos lisossomos, mas envolve todo o citoplasma das células do tecido primário. As microvilosidades tornam-se irregulares e desaparecem, e os restos celulares remanescentes do tecido primário são expulsos para o lúmen intestinal (BONNEVILLE 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

Concomitantemente à degeneração do epitélio, um processo de histogênese é iniciado. Intensas proliferações de células primordiais são observadas próximo aos limites do epitélio colunar com o tecido conjuntivo. Com o avançar da metamorfose, observa-se um grande número de mitoses nas células primordiais, resultando no desenvolvimento das pregas e vilosidades do epitélio intestinal definitivo, as células se diferenciam em forma de “borda em escova” com a formação das microvilosidades. Também, nota-se o aumento da camada do tecido conjuntivo e muscular (BONNEVILLE, 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; MARSHALL; DIXON, 1978; ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA,

1987; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

Das glândulas anexas ao sistema digestório, o pâncreas sofre a remodelação mais extrema durante a metamorfose. Ocorre diminuição em torno de 80 a 85 % do seu volume, devido aos processos degenerativos que afetam principalmente o tecido acinar. A histólise do tecido pancreático ocorre principalmente por apoptose e as células degeneradas são eliminadas pelos ductos pancreáticos ou fagocitadas por macrófagos. Após a metamorfose, o tecido acinar inicia o processo de reorganização do pâncreas através de uma histogênese do tecido acinar e endócrino, com a visualização de muitas células em mitose (BURGGREN; JUST, 1992; MILANO; CHIMENTI, 1995).

As alterações metamórficas do fígado ocorrem principalmente a nível celular e bioquímico. Entre estas mudanças, pode-se citar as alterações na forma das mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (TATA, 1971; GRAHAM; WAREING, 1976 apud GARCIA; FERNADEZ, 2001), aumento na produção de albumina e ceruloplasmina, síntese da hemoglobina do adulto e das enzimas do ciclo da uréia, síntese de DNA e RNA e acúmulo, nos hepatócitos, de lipídios e glicogênio (THEIL, 1973a, 1973b; JUST; ATKINSON, 1988; MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; DUELLMAN; TRUEB, 1986).

### **Perfil das enzimas digestivas dos girinos durante a metamorfose**

As transformações morfológicas da região gastroentérica estão, também, associadas às mudanças funcionais, tais como a produção e secreção de enzimas e ácido clorídrico.

Durante a fase inicial do desenvolvimento dos girinos, as principais enzimas secretadas na região gástrica são as proteinases, principalmente as do grupo das catepsinas (catepsina E) (INOKUCHI; KOBAYASHI; HORIUCHI, 1991; MINETA et al., 1998). Com o desenvolvimento do estômago durante a metamorfose e o surgimento das células oxintopépticas, inicia-se a secreção e produção de ácido clorídrico e pepsinogênio (precursor da pepsina). Nesta fase há um decréscimo da atividade da catepsina E e um

aumento contínuo da atividade de pepsina, a qual permanece por toda a fase adulta (INOKUCHI; KOBAYASHI; HORIUCHI, 1991; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996; MINETA et al., 1998). As quitinases também são secretadas pelo estômago, porém sua atividade é registrada somente após a metamorfose e na fase adulta (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

As enzimas pancreáticas mais encontradas durante o desenvolvimento dos girinos são tripsina, amilase e lipase (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996). A amilase possui maior secreção durante a fase inicial do desenvolvimento, havendo, no entanto, decréscimo da mesma no final da metamorfose. Isto ocorre em decorrência da dieta dos girinos que consomem quantidades significativas de carboidratos quando comparados com o adulto (carnívoro) (LEONE et al., 1976).

A atividade da lipase também tem sido reportada durante todo o processo de desenvolvimento dos girinos, inclusive na fase adulta. Leone et al. (1976) monitoraram a atividade da lipase durante o desenvolvimento dos girinos de *Xenopus laevis* e registraram pico de atividade no início da metamorfose.

A maioria das hidrolases encontradas no intestino dos girinos está associada à digestão e absorção de nutrientes nas microvilosidades. Hourdry et al. (1979) observaram em homogeneizado de intestino de girinos de *Rana catesbeiana*, a atividade da maltase, glicoamilase e  $\gamma$ -glutamil transferase.

Maltase e glicoamilase são enzimas que participam da hidrólise dos carboidratos e estão presentes durante a fase de girinos e adultos. A  $\gamma$ -glutamil transferase está relacionada com a hidrólise de proteínas, sendo observada uma maior atividade desta enzima nos adultos em relação aos girinos (HOURDRY et al., 1979).

Todas as mudanças ocorridas no trato gastroentérico estão influenciadas diretamente pelos hormônios tireoideanos. O epitélio gástrico é altamente sensível ao estímulo dos hormônios tireoideanos, que causam o desenvolvimento do estômago,

enquanto no intestino, estes hormônios são responsáveis pela degeneração do epitélio primário e neoformação do epitélio definitivo (DODD; DODD, 1976; DUELLMAN; TRUEB, 1986). As secreções enzimáticas estão relacionadas principalmente com a hidrocortizona, insulina, gastrina e prostaglandina que atuam nas diferentes regiões do sistema digestório causando uma maior ou menor liberação das enzimas digestivas (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996).

Nota-se que a mudança do trato gastroentérico durante a metamorfose é intensamente marcada por processos de histólise, histogênese e, principalmente, por uma grande diferenciação celular. Tais processos estão relacionados com a passagem do ambiente aquático para o terrestre e com a mudança do hábito alimentar, de uma dieta herbívora para uma carnívora.

O conhecimento da morfologia e da enzimologia do sistema digestório dos girinos oferece informações para o melhor manejo alimentar na produção de rãs minimizando, assim, um dos problemas da ranicultura atual. O estudo da morfologia e enzimologia dos girinos da rã-touro durante o desenvolvimento e metamorfose é apresentado nesta tese em quatro artigos: 1) Desenvolvimento ontogenético do aparato oral e cavidade orofaríngea, 2) Sintopia e morfometria do sistema digestório, 3) Histologia do intestino anterior, médio e posterior e 4) Morfologia e enzimologia do pâncreas e fígado.

---

**REFERÊNCIAS**

ALTIG, R.; McDIARMID, R. W. Body plan: developmental and morphology. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDIARMID and R. ALTIG. Chicago Press, Chicago, p.24-51, 1999.

AMPHIBIAN METAMORPHOSIS ASSAY. Disponível em: [http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edmvac/amphibian\\_degitz\\_0405.pdf#search='amphibian%20metamorphosis%20assay%20%5B'](http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edmvac/amphibian_degitz_0405.pdf#search='amphibian%20metamorphosis%20assay%20%5B') Acesso em: 03 fev 2007.

BONNEVILLE, M. A. Fine structural changes in the intestinal epithelium of the bullfrog during metamorphosis. **The Journal of Cell Biology**, Boston, v.18, p.579-597, 1963.

BONNEVILLE, M. A.; WEINSTOCK, M. Brush border development in the intestinal absorptive cells of *Xenopus* during metamorphosis. **The Journal of Cell Biology**, Boston, v. 44, p.151-171, 1970.

BURGGREN, W. W.; JUST, J. J. Developmental changes in physiological system. In: **Environmental Physiology of the Amphibians**. Ed. M. E. Feeder and W.W. Burggren, Chicago Press, Chicago, p.467-530, 1992.

BURRY, R. B.; WHELAN, J. A. **Ecology and management of the bullfrog**. Washington D. C.U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1985, 23p.

DODD, M. H. I.; DODD, J. M. The biology of metamorphosis. In: **Physiology of the Amphibia**. Ed. B. Lofts, Academic Press, New York, v.3, p.467-599, 1976.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. In: **Biology of Amphibians**. Ed. W. E. Duellman and L. Trueb. McGraw-Hill, New York, 1986, 670 p.

ETKIN, W. In: **Metamorphosis. A problem in development biology**. Ed. By W. Etkin and L. T. Gilbert. Appleton – Century – Crofts, New York, p.313-348, 1968.

GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. Metamorfose em anfíbios. In: **Embriologia** 2ed. Ed. S. M. L. Garcia e C. G. Fernandez. Artmed. Porto Alegre, RS, p.181-183, 2001.

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

HOUILLON, C. **Embriologia**. Omega barcelona. 1973.

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

HOUDRY, J., CHABOT, J. G.; MENARD, D.; HUGON, J. S. Intestinal brush border enzyme activities in developing amphibian *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v.63, p.121-125, 1979.

INOKUCHI, T.; KOBAYASHI, K. I.; HORIUCHI, S. Acid proteinases of the fore-gut in metamorphosing tadpoles of *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.99b, p.653-662, 1991.

ISHIZUYA-OKA, A., SHIMOZAWA, A. Development of the connective tissue in the digestive tract of the larval and metamorphosing xenopus laevis. **Anatomischer Anzeiger**, Jena, v. 164, p.81-93, 1987.

JUST, J. J.; ATKINSON, B. G. Hemoglobin transition in the bullfrog, *Rana catesbeiana*, during spontaneous and induced metamorphosis. **Experimental Zoology**, Hoboken, v.182, p.271-280, 1988.

KAWAI, A.; IKEYA, J.; KINOSHITA, T.; YOSHIZATO, K. A Three-Step mechanism of action of thyroid hormone and mesenchyme in metamorphic changes in anuran larval skin. **Developmental Biology**, San Diego, v.166, p.477-488, 1994.

KENNY, J. L. Feeding mechanisms in anuran larvae. **Journal of Zoology**, London, v.69(2), p.213-251, 1969.

LEONE, F.; LAMBERT-GARDINI, S.; SARTORI, C.; SCARPIN, S. Ultra-structural analysis of some functional aspects of *Xenopus laevis* pancreas during development and metamorphosis. **J. Embryology and Experimental Morphology**, London, v.36 (3), p.711-724, 1976.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. I. Site of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.49, p.372-379, 1971a.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 49, p.380-389, 1971b.

MARSHALL, J. A.; DIXON, K. E. Cell specialization in the epithelium of the small intestine of feeding *Xenopus laevis* tadpoles. **Journal of Anatomy**, London, v.126 (1), p.133-144, 1978.

MILANO, E. G.; CHIMENTI, C. Morphogenesis of the Pancreas of *Bufo* during Metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.97, p.239-249, 1995.

MINETA, T.; INOKUCHI, T.; KOBAYASHI, K.; HORIUCHI S. Distribution of cathepsin E in the larval and adult organ of the bullfrog with special reference to the mature form in the larval fore-gut. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.**, New York, v.121, p.333-340, 1998.

PAULSON, R. B.; ALLEY, K. E.; SALATA, L. J.; WHITMYER, C. C. A scanning electron-microscopic study of tongue development in the frog *Rana pipiens*. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 40 (4), p.311-319, 1995.

ROVIRA, J.; VILLARO, A. C.; BODEGAS, M. E.; VALVERDE, E.; SESMA, P. Metamorphic changes in the stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles. **Tissue & Cell**, Essex, v.27(1), p.13-22, 1995.

SHUMWAY, W. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. I external form. **Anatomical Record**, New York, v.78, p.139-144, 1940.

STEINWASCHER, K. The effect of coprophagy on the growth of *Rana catesbeiana*. Tadpoles. **Copeia**, Laurence, v.1, p.130-134, 1978.

TATA, J. R. Protein synthesis during amphibian metamorphosis. **Currents topics in Development Biology**, New York, v.6, p.79-110, 1971.

TATA, J. R. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. **Biochimie**. Paris, v.81. p.359-366. 1999.

TAYLOR, A. C.; KOLLROS, J. J. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. **Anatomical Record**, New York, v.94, p.2-23, 1946.

THEIL, E. C. Amphibian red blood cell ferritin. **Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, v.248(2), p.622-628, 1973a.

THEIL, E. Red cell ferritin content during the hemoglobin transition of amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, San Diego, v.34, p.282-288, 1973b.

THIBAudeau, D. G.; ALTIG, R. Sequence of ontogenetic development and atrophy of the oral apparatus of 6 anuran tadpoles. **Journal of Morphology**, New York, v.197 (1), p.63-69, 1988.

VEIGA, N. Importância da alimentação e nutrição em ranicultura. In: **Minisimpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**. Botucatu, p.45-49, 1989.

VILLARO, A. C.; ROVIRA, J.; BODEGAS, M. E.; BURREL, M. A.; SESMA, P. Relationship between epithelial and connective tissues in the stomach of the frog *Rana temporaria* during metamorphosis: an ultrastructural study. **Tissue & Cell**, Essex, v.30 (4), p.427-445, 1998.

VILLARO, A. C.; ROVIRA, J.; BODEGAS, M. E.; BURREL, M. A.; GARCÍA-ROS, D.; SESMA, P. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of endocrine cells in the larval stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles: a comparison with adult specimens. **Tissue & Cell**, Essex, v.33 (5), p.462-477, 2001.

## *CAPÍTULO II*

---

## **Desenvolvimento ontogenético do aparato oral e da cavidade orofaríngea dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*)**

### **RESUMO**

As estruturas que compõem o aparato oral e a cavidade orofaríngea são utilizadas universalmente na identificação taxonômica dos girinos de anuros, contudo pouco se conhece da função e ontogenia destas estruturas. Este trabalho descreve a morfologia do aparato oral e da cavidade orofaríngea dos girinos da rã-touro durante seu desenvolvimento e metamorfose. As análises foram realizadas no setor de Ranicultura do CAUNESP-UNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV-UNESP. Girinos a partir da eclosão do ovo até a metamorfose foram coletados, tendo em seguida seu aparato oral e a cavidade orofaríngea dissecados para as análises. Tais estruturas foram fixadas em solução de Karnovsky, pós-fixadas em tetróxido de Ósmio, metalizadas em ouro paládio e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410). O desenvolvimento do aparato oral iniciou-se com a formação e queratinização da bainha córnea da mandíbula e da maxila, com o desenvolvimento de uma fileira de dentículos córneos na maxila e duas na mandíbula, e as papilas marginais. Com o início da alimentação exógena, observou-se a formação das papilas sub-marginais, da terceira fileira de dentículos córneos na mandíbula, e da segunda fileira de dentículos córneos da maxila. Durante a metamorfose, observou-se a atrofia do aparato oral e a formação da boca e dos lábios. Internamente, observou-se a formação da língua e reestruturação das coanas. O desenvolvimento do aparato oral, assim como sua atrofia nos girinos de *Rana catesbeiana*, apresentaram similaridades com *R. esculenta* e *R. sylvatica*. Entretanto, não se pode extrapolar estes resultados para outras espécies de anuros, devido à grande variedade de modos de alimentação e de estruturas do aparato e cavidade oral.

## INTRODUÇÃO

O ciclo de vida dos anfíbios anuros geralmente compreende uma fase larval aquática e, após a metamorfose, um adulto terrestre. Conseqüentemente, mudanças no hábito alimentar também ocorrem. Os girinos, que raspam o substrato e filtram as partículas de alimentos liberadas na água, transformam-se em um adulto que utiliza a língua para capturar e transportar o alimento até a boca. Esta modificação do hábito alimentar reflete uma ampla remodelação do aparato oral dos girinos durante a metamorfose (DUELLMAN; TRUEB, 1986; ALTIG; McDIARMID, 1999).

As estruturas que compõem o aparato oral dos girinos possuem características únicas; seu tamanho e forma são utilizados universalmente na identificação taxonômica dos gêneros e das espécies dos mesmos (WASSERSUG, 1976a, 1976b; 1980). Anatomicamente, o aparato oral é composto por: 1) bico córneo, que também pode ser denominado de bainha córnea da mandíbula e maxila; 2) papilas marginais e sub-marginais, que margeiam o bico córneo e 3) fileiras transversais de dentículos queratinizados, denominados de dentículos labiais, situados em cima e abaixo da bainha córnea. Tanto a bainha córnea quanto os dentículos labiais, na maioria das vezes, são em forma de cúspides ou multicúspide. A presença, forma e quantidade dos mesmos estão intimamente ligadas ao hábito alimentar (WASSERSUG, 1976a, 1980).

Apesar da grande utilização do aparato oral na identificação sistemática dos girinos, pouco se conhece da função e ontogenia destas estruturas. Os estudos ontogênicos da região oral são baseados em um número reduzido de táxon e, geralmente, de espécies que vivem no mesmo “habitat” e possuem hábito alimentar semelhante, o que ocasiona uma similaridade na morfologia oral (FIORITO DE LOPEZ; ECHEVERRIA, 1984; MARINELLI et al. 1985; THIBAudeau; ALTIG, 1988; AGARWAL; NIAZI, 1980; TUBBS et al., 1993).

O desenvolvimento do aparato oral nos girinos inicia-se por volta do estágio 17 (GOSNER, 1960) com a visualização da cavidade oral primitiva ou estomodeo. A partir do estágio 21, ocorre o rompimento da membrana orofaríngea, desenvolvimento das papilas labiais e queratinização dos bicos e dentículos córneos (FIORITO DE LOPEZ; ECHEVERRIA, 1984; THIBAudeau; ALTIG, 1988).

Internamente, a cavidade bucofaríngea é composta pelo aparato filtrador ou faringe e glotis, *velum* ventral e dorsal, coanas, papilas bucais e linguais. As papilas bucais podem ser subdivididas nas papilas infralabiais e papilas do assoalho e teto da cavidade bucal, possuindo funções quimiorreceptoras e tácteis e sua distribuição e número são espécie-específicos. As papilas linguais possuem, principalmente, função quimiorreceptora e gustativa, e desaparecem com o decorrer do desenvolvimento da língua (HAMMERMAN, 1969; VIERTEL, 1985; PAULSON et al., 1995).

A maioria dos estudos ontogenéticos concentra-se na formação do aparato oral e função das papilas bucais (HAMMERMAN, 1969; WASSERSUG, 1980; THIBAudeau; ALTIG, 1988). Poucos são os estudos que descrevem a atrofia do aparato oral; em geral, esta atrofia ocorre em sentido inverso ao desenvolvimento do animal. Observa-se, primeiramente, a degeneração dos dentículos e bico córneos, seguida da atrofia das papilas labiais. Concomitantemente, observam-se o desenvolvimento da mandíbula e maxila e a formação da boca (THIBAudeau; ALTIG, 1988).

As características morfológicas da região oral encontram-se em estreita dependência com a natureza dos alimentos consumidos (WASSERSUG, 1976a, 1980; BRAMBLE; WAKE, 1985). Portanto, torna-se fundamental o conhecimento destas estruturas para o entendimento da ecologia alimentar dos girinos, pois assim será possível se obter uma melhor compreensão do manejo alimentar destes animais em cativeiro.

A fase de girino é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da criação de rãs, pois dela haverá de resultar, após a metamorfose, animais em condições compatíveis

com os índices zootécnicos. Desta forma, a determinação de instalação apropriada e técnica de manejo adequada para esta fase são de fundamental importância para o desenvolvimento da ranicultura (SILVA et al., 1994). Visando fornecer maiores subsídios ao manejo alimentar, este trabalho teve como objetivo descrever, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, a morfologia do aparato oral e da cavidade orofaríngea dos girinos da rã-touro (*R. catesbeiana*) durante seu desenvolvimento e metamorfose, visto que tal espécie é atualmente a mais utilizada na criação de rãs em cativeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos foram conduzidos no setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal – São Paulo.

### *- Classificação dos girinos*

Os girinos foram classificados segundo a tabela de GOSNER (1960), reproduzida do livro “Tadpoles: The biology of anuran larvae” (Anexo 1), a qual classifica o desenvolvimento dos girinos baseado nas alterações morfológicas dos mesmos. Os estágios 1 ao 20 correspondem da fecundação à eclosão do ovo. Após a eclosão, o girino possui as brânquias exteriorizadas e se alimenta do saco vitelínico. Dos estágios 21 ao 25 ocorre a encapsulação das brânquias, o girino nada livremente em busca do alimento. Os estágios 26 ao 41 correspondem à fase de crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Dos estágios 42 ao 46, quando ocorre a metamorfose propriamente dita, há o desenvolvimento dos membros anteriores, reabsorção da cauda e formação da boca.

*- Animais experimentais*

Os girinos utilizados foram provenientes de fertilização artificial e acondicionados em aquários com capacidade para 2000 litros. A densidade utilizada foi a de um girino para cada dois litros. A temperatura máxima da água foi de  $28,6 \pm 1,6^\circ\text{C}$ , enquanto a mínima foi de  $26,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$ . Semanalmente, foram realizadas coletas dos girinos, sendo separados por estágios de desenvolvimento. Aproximadamente dez girinos de cada estágio foram coletados.

*- Morfogênese da cavidade bucal.*

Girinos dos estágios 18 ao 46 foram coletados, anestesiados em água com gelo a  $4^\circ\text{C}$  e decapitados. O aparato oral e a cavidade orofaríngea foram dissecados e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5%) por 2 horas. Estas amostras foram lavadas em tampão Cacodilato de Sódio e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% por 4 horas. Em seguida, foram lavadas novamente em tampão, desidratadas em bateria alcoólica de concentrações crescentes (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), secas em secadora de ponto crítico com  $\text{CO}_2$  líquido, montadas em suporte de cobre, metalizadas em ouro paládio e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

**RESULTADOS**

Os estudos da morfogênese do aparato oral foram conduzidos a partir da visualização do estomodeo e da membrana orofaríngea que ocorreu a partir do estágio 20 (Figura 1A). No estágio seguinte (21) ocorreu o rompimento da membrana orofaríngea (Figura 1B). Os estágios 22 e 23 foram caracterizados pela formação da bainha córnea da mandíbula e início de sua queratinização (Figuras 1C-D).

A formação e queratinização da bainha córnea da maxila foram visualizadas a partir do estágio 24 (Figura 2A). Neste mesmo estágio, notou-se, na comissura do bico córneo, pequenas papilas que originaram as papilas marginais. Em cima da bainha córnea da maxila e abaixo da bainha da mandíbula observou-se um espessamento do tecido, onde surgiram as fileiras de dentículos córneos (Figura 2A).

No estágio 25, o aparato oral foi constituído pelas papilas marginais situadas contornando a periferia do disco oral. Estas papilas mostraram-se ausentes apenas na região superior às bainhas córneas da maxila (Figura 2B). Logo após as papilas labiais e em direção ao bico córneo, visualizaram-se as fileiras de dentículos córneos dispostos em uma série na maxila (anterior 1 ou A-1) e duas séries na mandíbula (posterior 1 e 2 ou P-1 e P-2), sendo a P-1 interrompida na direção da sínfise mandibular e a P-3 não se apresentou queratinizada (Figura 2B). Após as séries de dentículos, observou-se o bico córneo ou bainha córnea da maxila e mandíbula completamente serrilhada com várias cúspides em formato de meia lua, sendo a convexidade da mandíbula mais acentuada que a da maxila (Figura 2B).

O estágio 26 foi caracterizado pela presença das papilas sub-marginais, localizadas entre as papilas marginais e as séries de dentículos córneos da região mandibular, além da queratinização da terceira fileira de dentículos córneos na mandíbula (P-3) (Figura 2C). No estágio 29 notou-se a formação de uma segunda fileira de dentículos córneos na maxila (A-2), sendo esta visível apenas nas laterais da mesma (Figura 2D). A partir deste estágio, o aparato oral apresentou-se completamente formado.

Durante os estágios 30 ao 41 não ocorreram mudanças significativas nas estruturas do aparato oral, ocorrendo apenas um aumento e espessamento das papilas e dentículos córneos.

No decorrer da metamorfose, verificou-se a degeneração do aparato oral e formação da boca. No estágio 42 (clímax metamórfico) observou-se a diminuição das

séries de dentículos córneos, espessamento da mandíbula e da maxila com o desaparecimento progressivo da bainha córnea e diminuição do tamanho e número das papilas labiais (Figuras 3A-C).

No estágio 43 notou-se o início da formação da boca, e as papilas labiais estavam ainda presentes (Figura 3D). No estágio 44 a boca estava quase formada, identificando-se a mandíbula e a maxila propriamente dita. Contudo, observou-se na comissura bucal resquício das papilas labiais (Figura 4A). Nos estágios 45 e 46 a boca estava formada similarmente à do adulto, ocorrendo apenas aumento progressivo do tamanho (Figura 4B).

Internamente, os estudos da morfogênese da cavidade orofaríngea iniciaram-se a partir do estágio 25. A cavidade orofaríngea foi formada pelo assoalho (região ventral) e pelo teto (região dorsal), sendo que cada região apresentou-se subdividida em porções oral e faríngea. No estágio 25, a porção ventro-oral foi constituída pela bainha da mandíbula, pelas papilas infralabiais, situadas nas laterais da mandíbula, e por duas papilas linguais. A porção ventro-faríngea foi constituída pelas papilas do assoalho da mandíbula, *velum* ventral, glote e região branquial (Figuras 5A-B).

As alterações no assoalho da cavidade orofaríngea ocorreram antes do clímax metamórfico com a formação da língua. No estágio 28 verificou-se aumento das papilas linguais de duas para quatro (Figura 6A). No estágio 30 iniciou-se um espessamento do tecido em torno das papilas linguais, apresentando um formato semelhante à língua (Figura 6B). Dos estágios 31 ao 40 esse espessamento aumentou de tamanho, e a partir do estágio 41 a língua começou a se destacar do assoalho da cavidade bucal (Figuras 6C-D). No estágio 42, a língua estava completamente destacada em sua região caudal e fixa na região cranial. Observou-se também, uma pequena protuberância em sua região posterior (Figura 7A). Dos estágios 43 ao 46 a língua estava totalmente formada verificando-se apenas o aumento de seu tamanho (Figuras 7B-D).

A região dorso-oral, no estágio 25, foi formada pela bainha córnea da maxila,

papilas pré e pós-nasais, válvulas nasais e coanas. A porção dorso-faríngea foi formada pelas papilas do teto, zona glandular e *velum* dorsal (Figuras 8A-B).

O teto da cavidade orofaríngea se remodelou a partir do estágio 42. Houve uma diminuição do número e tamanho das papilas nasais (pré e pós), válvulas nasais e projeção da região dorso-oral na direção rostral (Figuras 8C-D). No estágio 43, verificou-se aumento da região maxilar e desaparecimento das papilas e válvulas nasais. Nos estágios 44 e 45, o contorno de toda a maxila estava bem delimitado e as coanas situadas na região rostral. No estágio 46 a maxila estava completamente formada e revestida por um fino lábio, e entre as coanas visualizaram-se os dentes vomerianos (Figuras 9A-B e 10).

## DISCUSSÃO

Os girinos possuem características estruturais específicas que são ausentes nos adultos. O aparato oral é um excelente exemplo, pois é uma estrutura presente apenas no girino (DUELLMAN; TRUEB, 1986). As características principais do aparato oral são as papilas labiais, as fileiras de dentículos e o bico córneo na abertura da cavidade oral. A presença destas estruturas, assim como o número, a densidade, o tamanho e a forma das mesmas, variam entre as espécies de girinos e estão relacionadas ao meio em que vivem e ao hábito alimentar (ALTIG; McDIARMID, 1999).

O presente estudo mostrou que o girino da rã-touro possui o aparato oral composto pelas papilas labiais de tamanho moderado, duas fileiras de dentículos acima da bainha córnea e três abaixo, além de bainha córnea protrátil em formato de U. Os dentículos e a bainha córnea auxiliam na raspagem de superfícies não planas e de diversos graus de resistência, e tanto os movimentos das papilas labiais, como da bainha córnea, auxiliam na respiração aérea em ambientes de pouca oxigenação (WASSERSUG; YAMASHITA, 2001).

Os girinos da rã-touro alimentam-se em qualquer região do curso d'água e podem raspar qualquer tipo de superfície em busca de alimento (REEDER, 1964; VEIGA 1989), sugerindo, assim, um hábito alimentar generalista.

A ontogenia do aparato oral dos girinos é pouco estudada e baseada em um número reduzido de *taxon*. Thibaudeau e Altig (1988) estudaram seis espécies de girinos e observaram que o desenvolvimento do aparato oral iniciou-se pela invaginação do estomodeo, seguida da delimitação e queratinização da bainha córnea e das fileiras de denticulos labiais, sugerindo um padrão para a seqüência de eventos que sucedem o desenvolvimento do aparato oral.

Este processo foi similar ao observado no presente estudo, contudo observaram-se diferenças temporais nas seqüências do desenvolvimento do aparato oral do girino da *R. catesbeiana* em que a queratinização da bainha córnea ocorreu no estágio 23, iniciando-se pela bainha da mandíbula, seguida da queratinização da bainha da maxila. No entanto, somente a partir do estágio 29 é que se observou o aparato oral constituído por todos os seus componentes, enquanto Thibaudeau e Altig (1988) observaram, para *R. pipiens*, o início da queratinização da bainha córnea ocorrendo nos estágios 20 e 21 e, a partir do estágio 25, todas as estruturas do aparato orais já estavam desenvolvidas.

As estruturas internas da cavidade orofaríngea dos girinos variam consideravelmente entre as espécies de anuros e estão relacionadas com as características embriológicas (desenvolvimento direto ou indireto com a presença de larva), hábito alimentar (generalista, especialista ou larvas que não se alimentam) e a capacidade de respiração aérea (WASSERSUG, 1980; WASSERSUG; DUELLMAN, 1984; BELL; WASSERSUG, 2003).

O girino da rã-touro possui a organização morfológica da cavidade orofaríngea bastante desenvolvida, especialmente o sistema papilar (WASSERSUG, 1980). Este sistema apresenta papilas infralabiais, linguais, do assoalho e teto da cavidade orofaríngea,

todas apresentando função quimiorreceptora ou táctil. O sistema papilar é posicionado para produzir um fluxo que auxilia na coleta de partículas orgânicas para o *velum* oral e que serão conduzidas para o esôfago e intestino (WASSERSUG; HOFF, 1979; PAULSON et al., 1995).

Poucos são os trabalhos existentes relacionados com a morfogênese da cavidade orofaríngea, sendo que a maioria descreve o desenvolvimento da língua, as características das estruturas quimiorreceptoras e a superfície branquial (HAMMERMAN, 1965, 1969; FIORITO DE LOPEZ; ECHEVERRIA, 1984; PAULSON et al., 1995; VIERTTEL; RICHTER, 1999).

Estudos com girinos de *R. pipiens* descreveram o desenvolvimento da língua iniciando-se no período entre os estágios 26 ao 30, quando se observa o espessamento do tecido abaixo das papilas linguais, sendo que no período que compreende os estágios 31 ao 41, a língua se destaca do assoalho da cavidade orofaríngea, e no clímax metamórfico encontra-se completamente formada (PAULSON et al., 1995). No presente estudo observou-se o início da formação da língua ocorrendo a partir do estágio 30, contudo, apenas no período da metamorfose (a partir do estágio 42) foi visualizada a língua com as características do adulto, ou seja, livre na sua porção caudal e presa na sua porção rostral.

A presença e o número das papilas linguais nos girinos variam de acordo com as espécies, havendo desde espécies sem língua, como os Pipidae, até espécies com mais de uma dúzia de papilas linguais, como no gênero *Ascaphys* (WASSERSUG, 1980). No gênero *Rana*, a quantidade de papilas varia entre as espécies podendo-se encontrar desde duas papilas (*R. pipiens* e *R. esculenta*) até quatro (*R. clamitans* e *R. catesbeiana*) (PAULSON et al., 1995; VIERTTEL; RICHTER, 1999).

A ausência da língua durante o período larval está associada à forma de alimentação. Os girinos são filtradores e a língua completamente desenvolvida ocuparia um espaço da cavidade orofaríngea que impediria um fluxo maior de água e prejudicaria

tanto a alimentação como a respiração (PAULSON et al., 1995).

Durante a metamorfose, o girino pára de se alimentar e tanto o aparato oral como a cavidade orofaríngea se remodelam. A remodelação destas estruturas reflete as mudanças no comportamento do animal que deixa de ser uma larva aquática filtradora para se tornar um adulto terrestre predador, o qual utiliza a língua para capturar as presas (BRAMBLE; WAKE, 1985; DUELLMAN; TRUEB, 1986). A maioria dos estudos a respeito do aparato oral e cavidade orofaríngea está relacionada com a morfogênese ou com a descrição para identificação sistemática. Poucos são os estudos relacionados com atrofia metamórfica e remodelação do aparato oral e da cavidade orofaríngea (ALTIG; McDIARMID, 1999).

A remodelação da boca dos girinos durante a metamorfose não segue um padrão pré-estabelecido. Geralmente, esta ocorre inversamente ao seu desenvolvimento, iniciando-se pela atrofia das papilas labiais, fileiras de dentículos córneos e bainha córnea (THIBAUDEAU; ALTIG, 1988). Diferente do que ocorre com as outras espécies, observou-se nos girinos de *R. catesbeiana* a atrofia metamórfica do aparato oral ocorrendo na mesma seqüência da morfogênese, observando-se o desaparecimento da bainha córnea, dos dentículos córneos e, por último, das papilas labiais.

## CONCLUSÃO

Neste estudo, enfatizou-se a formação do aparato oral do girino de *R. catesbeiana* e todas as modificações que ocorrem durante a metamorfose. Concluiu-se que em cada fase de desenvolvimento dos girinos de *R. catesbeiana*, o aparato oral possui estruturas bem definidas e adaptadas ao estilo de vida e hábito alimentar, e que as alterações metamórficas remodelam o aparato oral para a adaptação ao novo hábito alimentar.

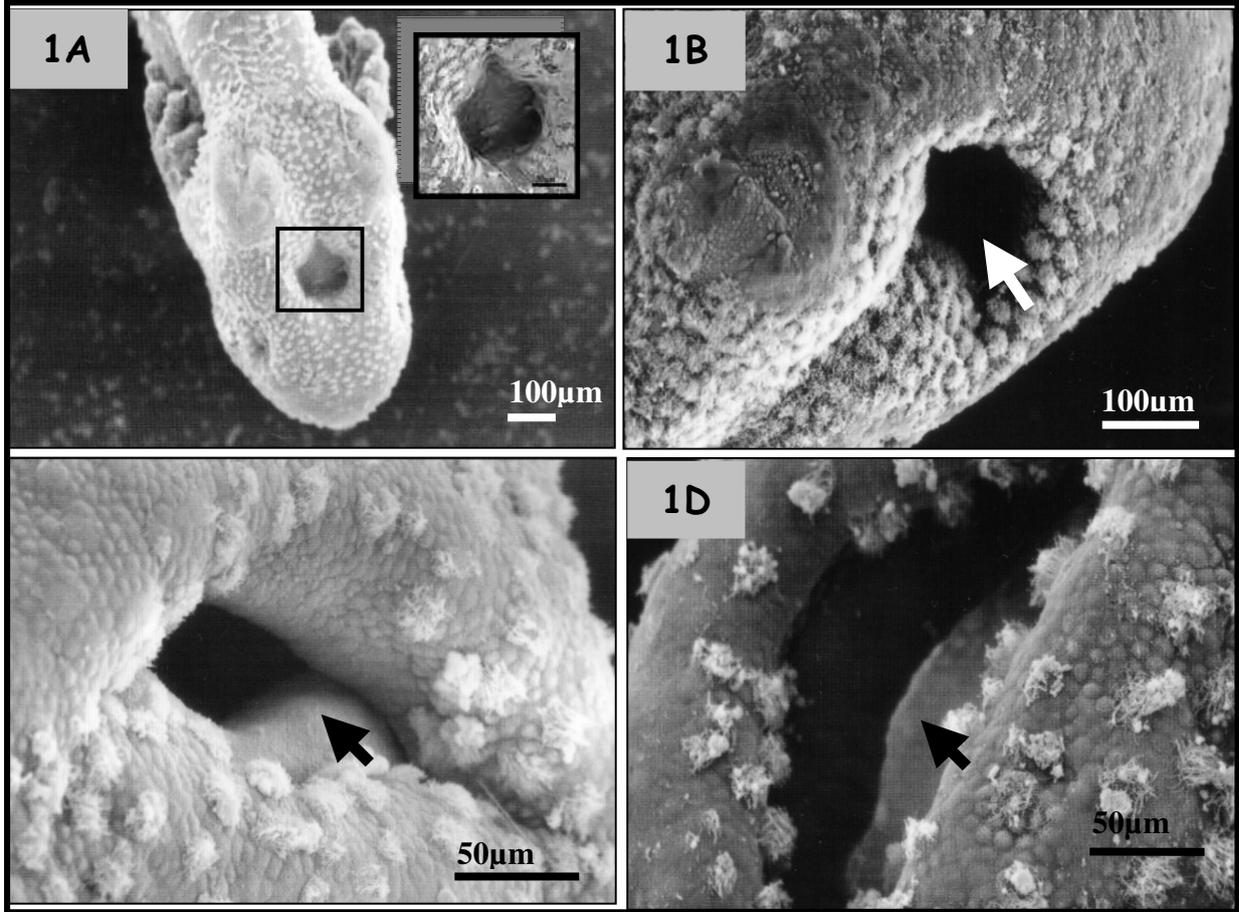
**Figura 1.** Eletronmicrografias do aparato oral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 20** - abertura do estomodeo obstruída pela membrana orofaríngea (detalhe).

**B: Estágio 21** - abertura do estomodeo logo após a ruptura da membrana orofaríngea (seta).

**C: Estágio 22** - bainha córnea da mandíbula (seta).

**D: Estágio 23** - início da queratinização da bainha córnea da mandíbula (seta).



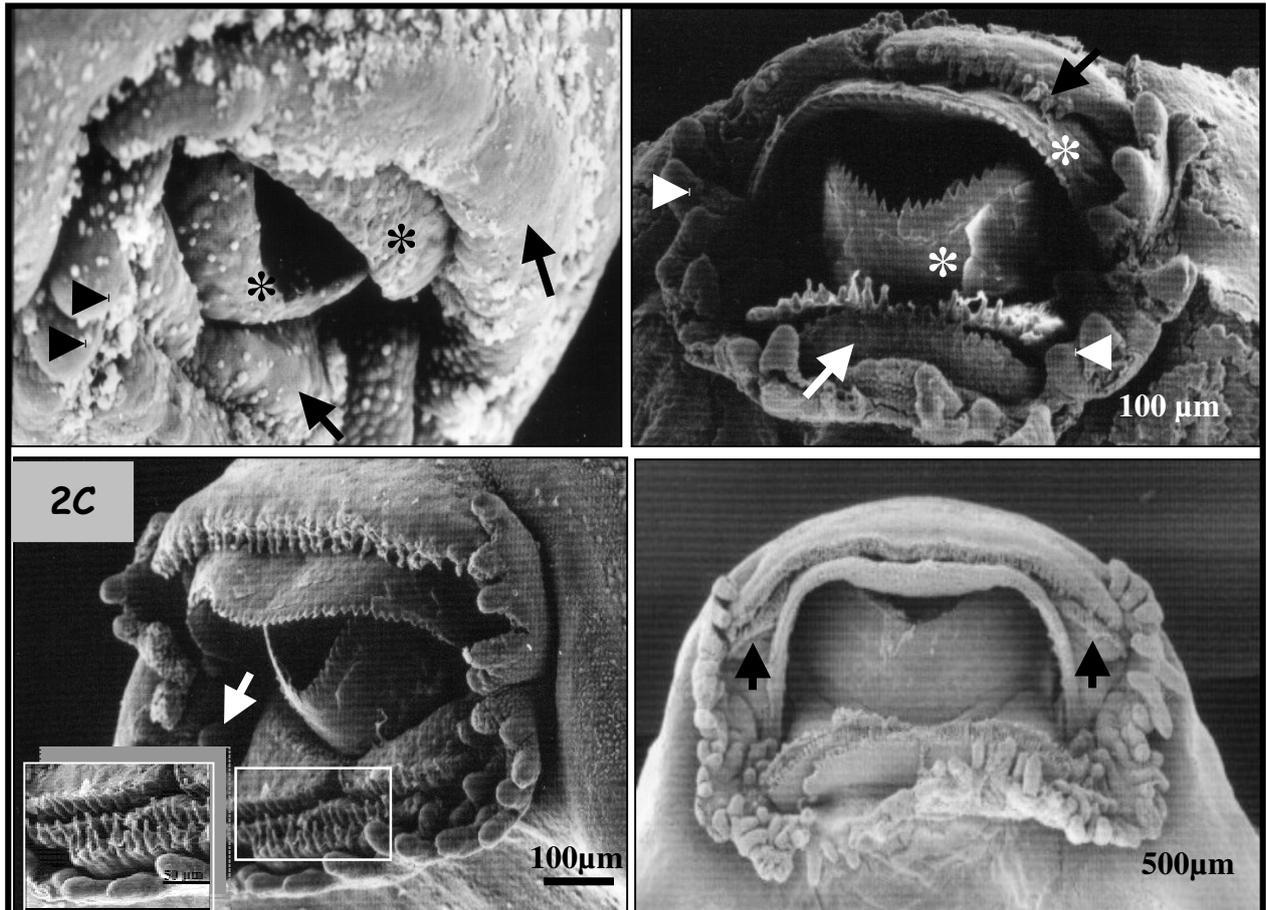
**Figura 2.** Eletronmicrografias do aparato oral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 24** - queratinização da bainha córnea da mandíbula e maxila (\*), delimitação das fileiras dos dentículos córneos (seta); papilas marginais (ponta de seta).

**B: Estágio 25** - bainha córnea da mandíbula (\*), duas fileiras de dentículos córneos da mandíbula (seta branca), anteriormente à maxila destaca-se uma série de dentículos (seta preta) e externamente aos dentículos córneos notam-se as papilas labiais marginais (ponta de seta).

**C: Estágio 26** - queratinização da terceira fileira de dentículos córneos da mandíbula (detalhe); papilas labiais sub-marginais (seta).

**D: Estágio 29** - segunda fileira de dentículos córneos nas laterais da maxila (seta).



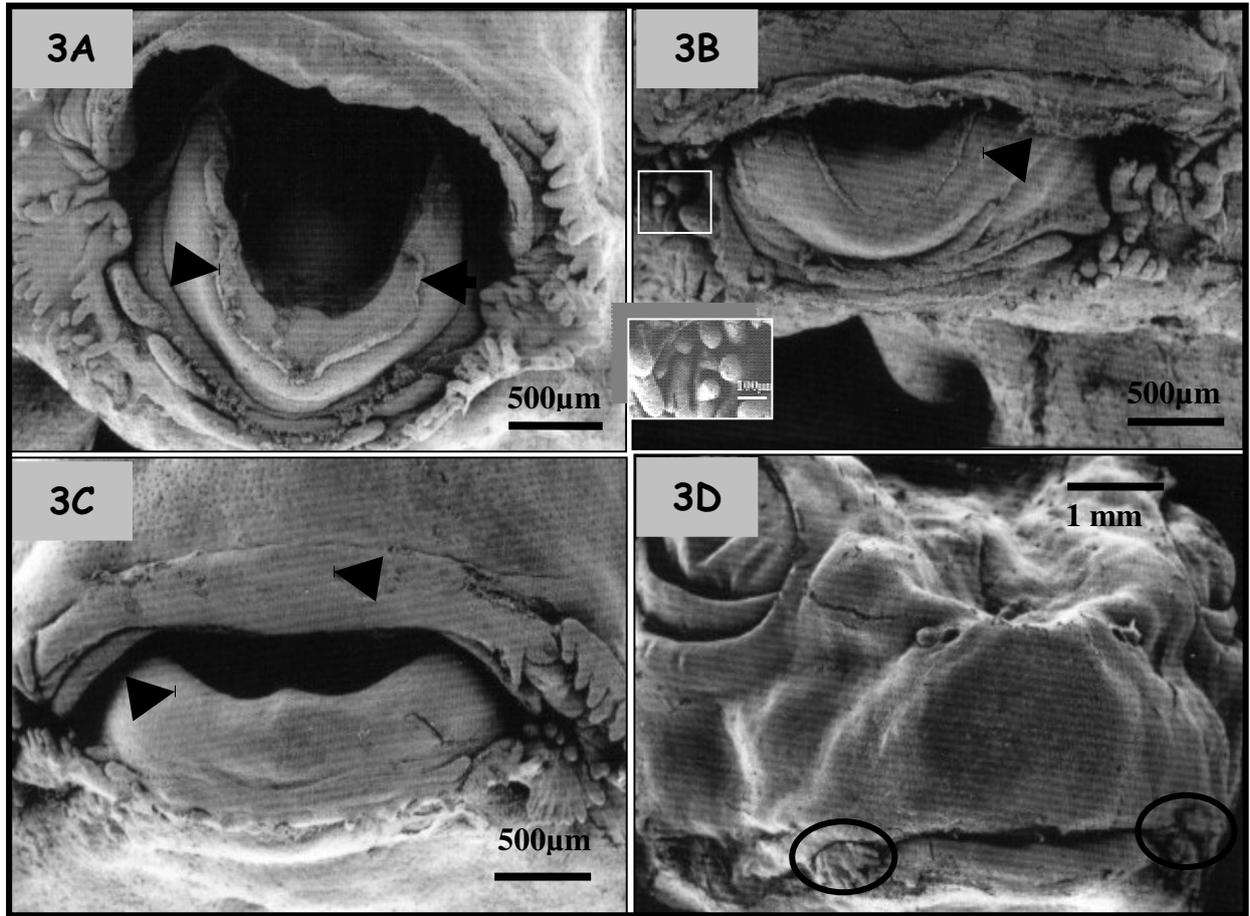
**Figura 3.** Eletronmicrografias do aparato oral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 42** - espessamento da mandíbula, diminuição da bainha córnea (ponta de seta).

**B: Estágio 42** - diminuição das papilas labiais (detalhe) e da bainha córnea da maxila e da mandíbula (ponta de seta).

**C: Estágio 42** - desaparecimento das bainhas córneas (ponta de seta).

**D: Estágio 43** - formação da boca com a presença de resquícios das papilas labiais (círculo).



**Figura 4.** Eletronmicrografias da cabeça do girino de *R. catesbeiana*.

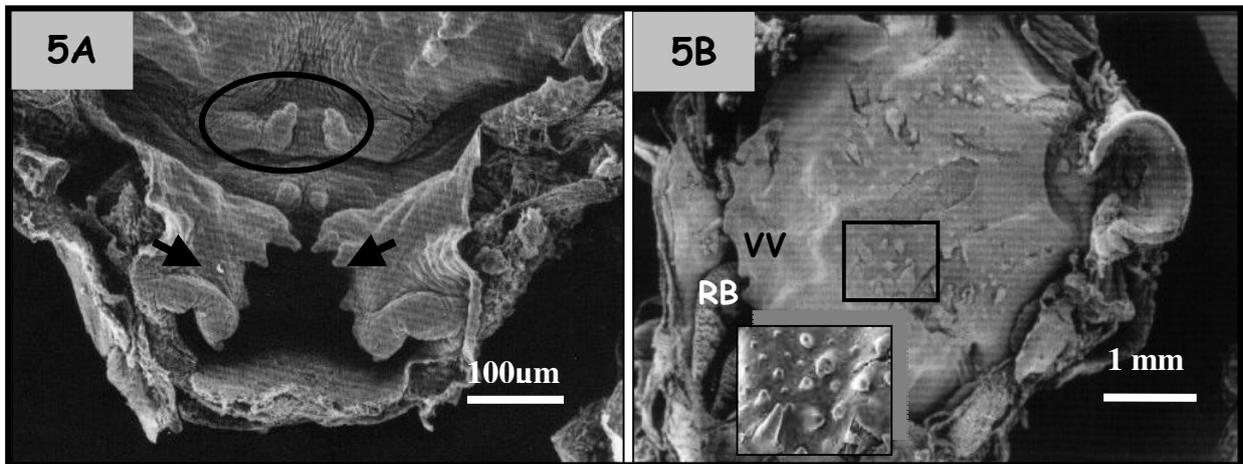
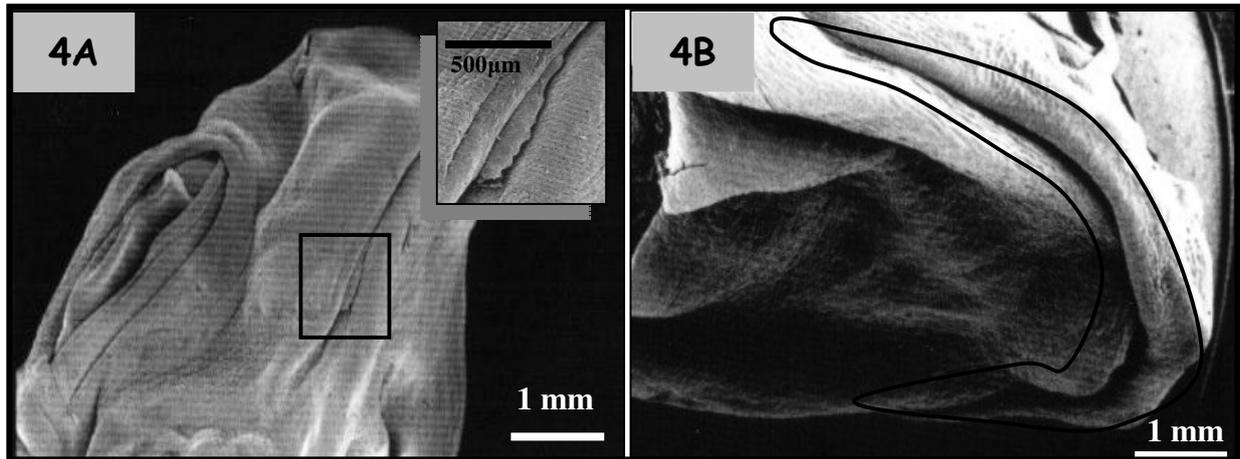
**A: Estágio 44** - resquícios das papilas labiais (detalhe).

**B: Estágio 45** - boca completamente formada, similar ao do adulto (em destaque).

**Figura 5.** Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - papilas linguais (círculo) e papilas infralabiais (seta).

**B: Estágio 28** - papilas da arena da mandíbula (detalhe); *velum* ventral (VV); região branquial (RB).



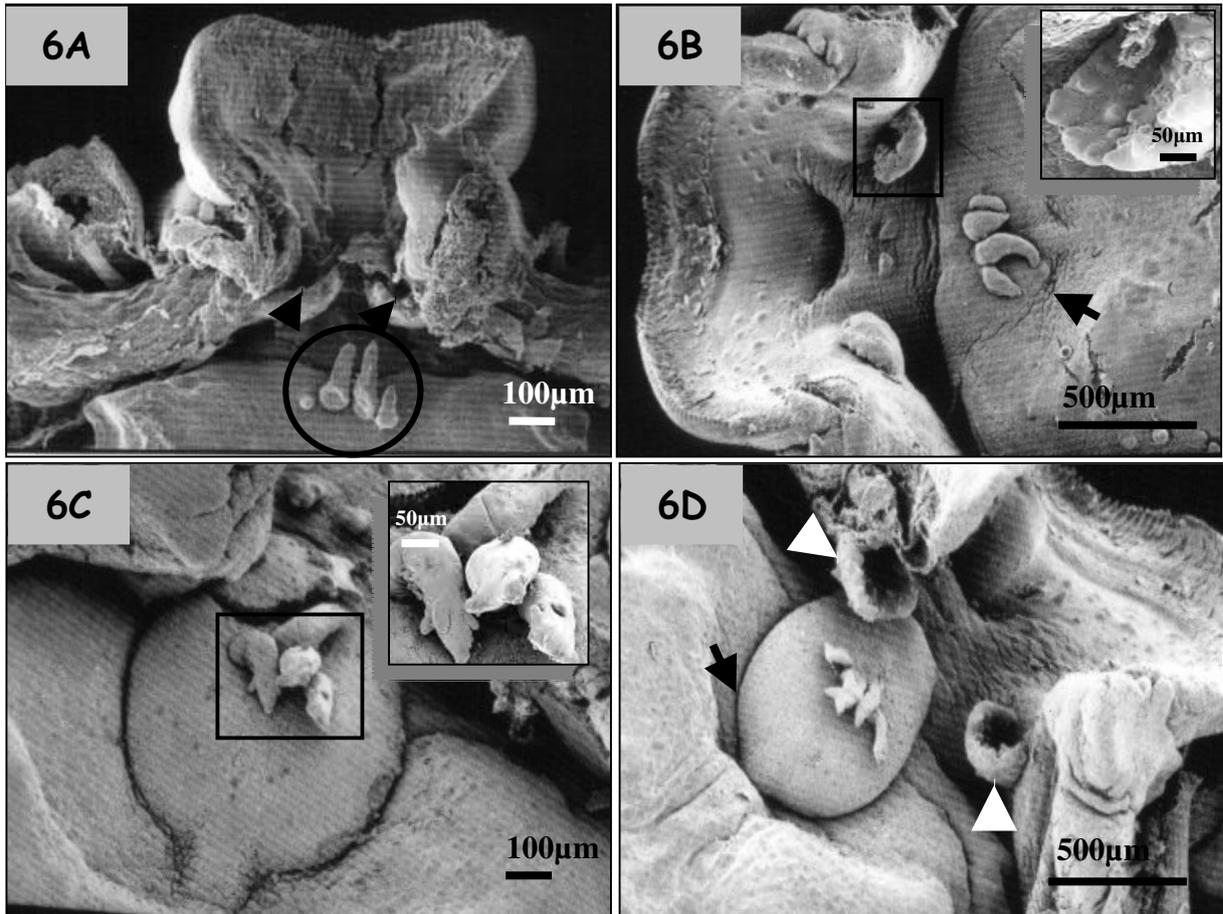
**Figura 6.** Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 28** - dois pares de papilas linguais (círculo); papilas infralabiais (ponta de seta).

**B: Estágio 30** - espessamento do tecido onde desenvolver-se-á a língua (seta); papilas infralabiais (detalhe).

**C: Estágio 40** - formação da língua evidenciando as papilas linguais (detalhe).

**D: Estágio 41** - bulbo da língua inflado começando a se destacar do assoalho da cavidade bucal (seta); papilas infralabiais (ponta de seta).



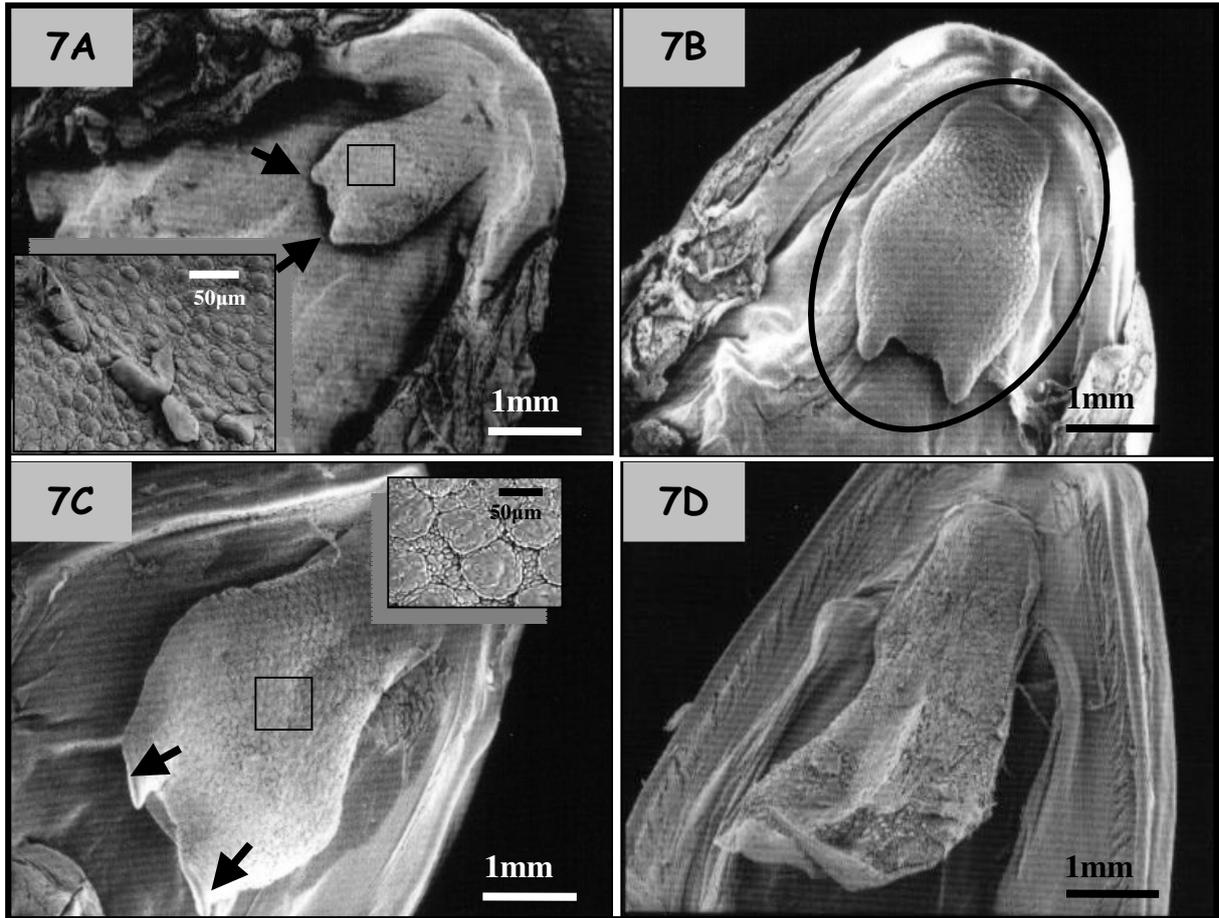
**Figura 7.** Eletronmicrografias do assoalho da região orofaríngea do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 42** - regressão das papilas linguais (detalhe); nota-se duas protuberâncias na região posterior da língua (seta).

**B: Estágio 44** - língua quase formada (círculo).

**C: Estágio 45** - botões gustativos (detalhe); língua livre em sua extremidade posterior com as protuberâncias mais evidentes (seta).

**D: Estágio 46** - língua completamente formada.



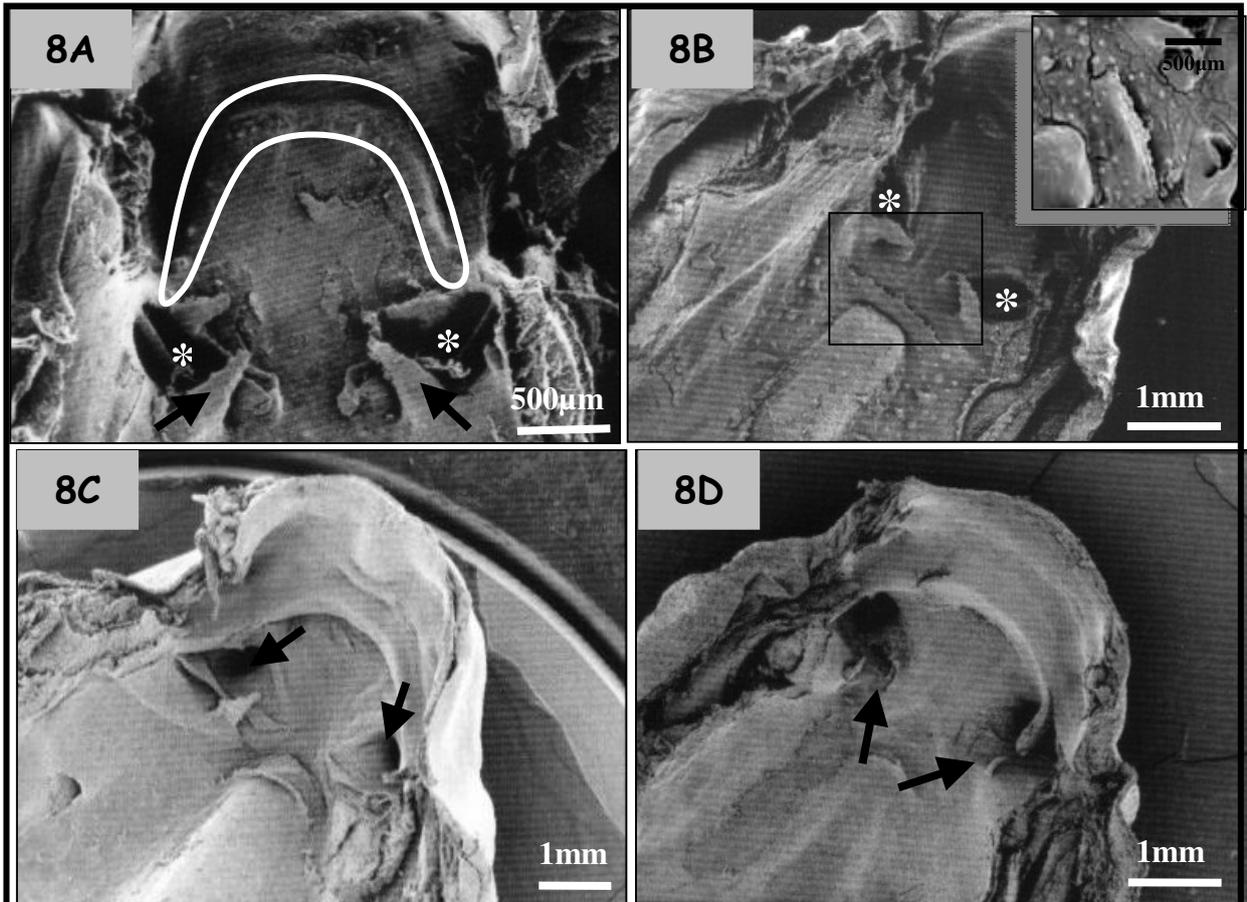
**Figura 8.** Eletronmicrografias do teto da região orofaríngea do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - papilas pré-nasais (destaque); coanas (\*); válvulas nasais (seta).

**B: Estágio 29** - papilas pós-nasais (detalhe); coanas (\*).

**C: Estágio 42** - diminuição das papilas pré-nasais e válvulas nasais e deslocamento das coanas em direção rostral (seta).

**D: Estágio 42** - desaparecimento das papilas pré-nasais e válvulas nasais (seta).



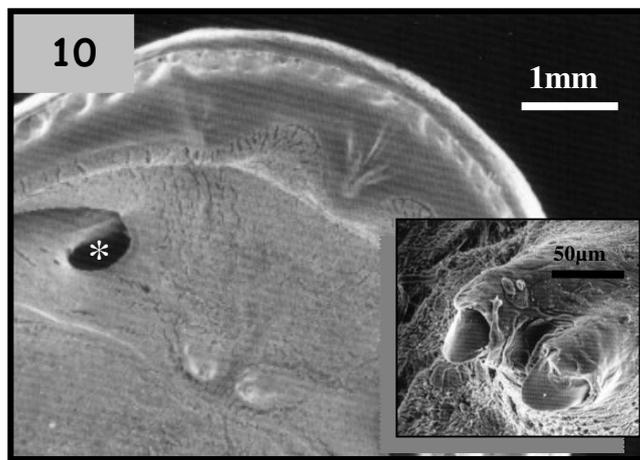
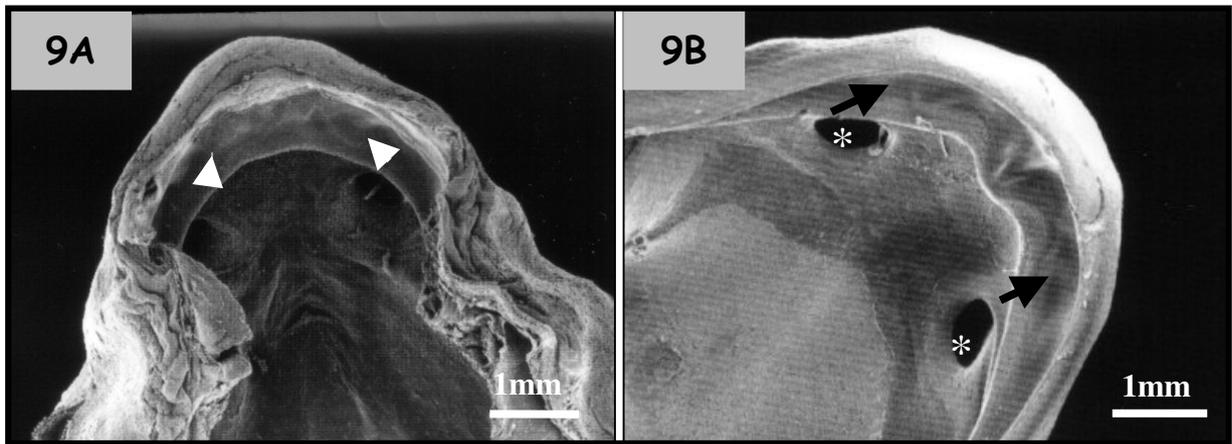
**Figura 9.** Eletronmicrografias do teto da região orofaríngea do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 44** - formação da maxila (ponta de seta).

**B: Estágio 45** - formação de um fino lábio recobrindo a maxila (seta); coanas (\*).

**Figura 10.** Eletronmicrografia da maxila do imago de *R. catesbeiana*.

**Estágio 46** - maxila formada recoberta por um fino lábio; dentes vomerianos (detalhe); coana (\*).



## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. K.; NIAZI, I. A. Development of the mouth-parts in the tadpoles of *Rana tigrina* (Daud). **Proceeding of the Indiana Academy of Science**, Indianápolis v. 89, p. 127-131, 1980.

ALTIG, R; McDIARMID, R. W. Body plan: developmental and morphology. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago Press, Chicago, p. 24-51, 1999.

BELL, B. D.; WASSERSUG, R. J. Anatomical features of *leiopelma* embryos and larvae: implications for anuran evolution. **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p.160-170, 2003.

BRAMBLE, D. M.; WAKE, D. B. Feeding mechanisms in lower tetrapods. In: **Functional and Vertebrate Anatomy** (Eds Hildebrand M.; Bramble D. M.; Liem K.F.; Wake D.B.), Chap. 13., The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, M. A., p.230-261, 1985.

DUELLMAN, W. E. TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill. New York, p.508-509, 1986.

FIORITO DE LOPEZ, L. E; ECHEVERRÍA, D. D. Morfogénesis de los dientes larvales y pico córneo de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). **Zoologia**, Nova York, v. 13, p. 573-578, 1984.

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

HAMMERMAN, D. L. Development of the tongue of *Rana clamitans*. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 5, p. 250-251, 1965. (Abstr.)

HAMMERMAN, D. L. The frog tongue: II. Histogenesis of fungiform papillae in *Rana catesbeiana*. **Acta Zoológica**. Stockholm, v.50, p. 25-33, 1969.

KAUNG, H. C. Development of the horny jaws of *Rana pipiens* larvae. **Developmental Biology**, New York, v. 11, p. 25-49, 1975.

KAUNG, H. C.; KOLLROS, J. J. Cell turnover in the beak of *Rana pipiens*. **Anatomical Record**, New York, v. 188, p. 361-370, 1976.

MARINELLI, M.; TEI, S.; VAGNETTI, D.; SENSI, M. P. SEM observation on the development and the regression of the oral disc of *Bufo vulgaris* larva. **Acta Embryologiae et Morphologiae Experimentalis**, Palermo, v. 6, p. 31-39, 1985.

PAULSON, R. B.; ALLEY, K. E.; SALATA, L. J.; WHITMYER, C. C. A scanning electron-microscopic study of tongue development in the frog *Rana pipiens*. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 40 (4), p. 311- 319, 1995.

REEDER, W. G., The digestive system. In: Moore, J. A. ed. **Physiology of the amphibia**. New York, Academic Press, p.99-150, 1964.

SILVA, J. M. F.; SEIXAS-FILHO, J. C. C.; BRAGA, L. G. T.; STÉFANI, M. V.; VEIGA, N.; BARBALHO, O. J. M.; ALBINATTI, R. C. B.; MELLO, S. C. R. P. Grupo III Nutrição In: **Diagnóstico da Ranicultura: Problemas, Propostas de Soluções e Pesquisas Prioritárias**. Ed. Samuel L. Lima, Mário R.C. Figueredo e Onofre M. de Moura. Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura (ABETRA), Viçosa, p.31-39, 1994.

THIBAudeau, D. G.; ALTIG, R. Sequence of ontogenetic development and atrophy of the oral apparatus of 6 anuran tadpoles. **Journal of Morphology**, New York, v. 197 (1), p. 63-69, 1988.

TUBBS, L. O. E.; STEVENS, R.; WELLS, M.; ALTIG, R. Ontogeny of the oral apparatus of the tadpoles of *Bufo americanus*. **Amphibia-Reptilia**, Leiden, v. 14, p. 333-340, 1993.

VEIGA, N. Importância da alimentação e nutrição em ranicultura. In: **Mini-Simpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, III**, Botucatu, p.45-49, 1989.

VIERTTEL, B. The filter apparatus of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* larvae (Amphibia, Anura). **Zoomorphology**, Berlin, v. 105, p. 345-355, 1985.

VIERTTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: Viscera and Endocrines. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago Press, Chicago, p. 92-148, 1999.

WASSERSUG, R. Oral morphology of anuran larvae: Terminology and general description. **Occasional Papers Natural History University of Kansas**, Kansas v. 48, p.

1-23, 1976a.

WASSERSUG, R. Internal oral features in *Hyla regilla* (Anura: Hylidae) larvae: An ontogenetic study. **Occasional Papers Natural History University of Kansas**, Kansas v. 49, p. 1-24, 1976b.

WASSERSUG, R. Internal oral features of larvae from eight anuran families: Functional, systematic, evolutionary, and ecological considerations. **Miscellaneous Publications Museum of Natural History**, Kansas, v. 68, p. 1-146, 1980.

WASSERSUG, R. J.; DUELMAN, W. E. Oral structures and their development in egg-  
rooding hylid frog embryos and larvae: evolutionary and ecological implications. **Journal of Morphology**, New York, v. 182, p.1-37. 1984.

WASSERSUG, R. J.; HOFF, K. A comparative study of the buccal pumping mechanism of tadpoles. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.12, p.225-259, 1979.

WASSERSUG, R. J.; YAMASHITA, M. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, Part A v.131, p.183-195, 2001.

## *CAPÍTULO III*

---

## **Sintopia e análise morfométrica do sistema digestório dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o processo de metamorfose**

### **RESUMO**

A metamorfose nos girinos é caracterizada por uma reestruturação morfológica e fisiológica. O sistema digestório sofre uma remodelação com o desenvolvimento do estômago e o encurtamento do comprimento do intestino. O presente trabalho teve como objetivo estudar a sintopia e a morfometria do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose. Os experimentos foram conduzidos no setor de Ranicultura do CAUNESP-UNESP e no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP. Os girinos foram coletados, fixados em formol 10%, separados em estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner, sendo registrados o seu peso e comprimentos total e parcial. Posteriormente, registraram-se o comprimento e o peso do intestino, fígado e pâncreas. Com o auxílio de estereomicroscópio foi descrita a relação topográfica de cada órgão do sistema digestório. Durante a metamorfose observou-se a reestruturação de todos os órgãos da cavidade visceral. O estômago aumentou de tamanho e migrou da região lateral direita para região lateral esquerda. O intestino, que nos girinos estava disposto em espirais duplas, sofreu um acentuado encurtamento com a perda da configuração espiralada. O pâncreas também diminuiu de tamanho e acompanhou a migração do estômago. O fígado não apresentou mudança anatômica aparente, passando a ocupar a maior parte da cavidade visceral. Biometricamente, o intestino, fígado e pâncreas apresentaram crescimento contínuo até o início da metamorfose. Durante este período, observou-se a diminuição do crescimento destes órgãos. As alterações observadas no presente trabalho estão associadas à mudança do hábito alimentar do girino onívoro para o adulto carnívoro.

## **INTRODUÇÃO**

A mudança do ambiente aquático para o terrestre em anfíbios é acompanhada por mudanças estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Em particular, o sistema digestório é completamente modificado durante este período (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996). Ocorre uma reestruturação da região bucal, o estômago se desenvolve e o intestino sofre encurtamento do seu comprimento com drástica mudança em sua configuração (CARVER; FRIEDEN, 1977; PRETTY; NAITOH; WASSERSUG, 1995).

As alterações histológicas que ocorrem no epitélio intestinal dos girinos durante o processo de metamorfose são bastante evidentes; ocorre histólise de toda a mucosa do intestino, seguida pela formação de uma nova mucosa, com características distintas do tecido anterior (MARSHALL; DIXON, 1978; ROVIRA et al., 1995; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996; VILLARO et al., 1998).

Acompanhando as mudanças histológicas, também se observam mudanças anatômicas e morfométricas no sistema digestório dos girinos. Entretanto, estudos sobre as alterações anatômicas e morfométricas são raros. Dentre estes, pode-se citar os de Carver; Frieden, 1977; Ribeiro-Filho, 1997; Chalmers; Slack, 1998; Pretty; Naitoh; Wassersug, 1995. Tais autores observaram uma alteração na localização e sintopia dos órgãos do sistema digestório na cavidade visceral dos girinos, além de redução do comprimento do intestino durante a metamorfose.

As características anatômicas do sistema digestório estão diretamente associadas ao hábito alimentar, digestão e absorção de nutrientes (BÉRTIN, 1958; VERIGINA, 1990; BARBIERI; VERANI, 1994; KRAMER; BRYANT, 1995). Observa-se que o comprimento do intestino está associado, principalmente, à dieta dos animais. Os herbívoros e onívoros possuem comprimento relativo do intestino maior que os carnívoros.

Isto ocorre por sua dieta apresentar elementos de digestão mais elaborados, os quais requerem mais tempo para serem digeridos (BÉRTIN, 1958). Em peixes, estudos têm observado a relação do comprimento do intestino com o hábito alimentar, além da influência do comprimento intestinal com os aspectos quantitativos da digestão e absorção de nutrientes (BÉRTIN, 1958; FÄNGE; GROVE, 1979; VERIGINA, 1990; DELARIVA; AGOSTINHO, 2001).

Nos girinos, assim como nos peixes, as estruturas anatômicas do trato digestório, também refletem o hábito alimentar. Os girinos carnívoros, como os da espécie *Ceratophrys dorsata*, possuem o intestino curto quando comparado com as espécies herbívoras ou onívoras que possuem um longo intestino disposto em dupla espiral (NOBLE, 1954; BURGGREN; JUST, 1992).

De maneira geral, o conhecimento das estruturas que compõem o sistema digestório dos anfíbios, nas suas diversas fases, é fundamental para a compreensão dos mecanismos de digestão e absorção de nutrientes, além de fornecer subsídios à nutrição e manejo alimentar dos mesmos em cativeiro. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo estudar a sintopia e a morfometria do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*), atualmente a espécie mais utilizada na criação em cativeiro, durante o desenvolvimento e metamorfose.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos foram conduzidos no Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), e Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo.

#### - *Classificação dos girinos*

Os girinos foram classificados segundo a tabela de Gosner (1960) e Etkin (1968). Gosner (1960) classifica o desenvolvimento dos girinos em 46 estágios baseados nas alterações morfológicas externas. Os estágios 1 ao 20 correspondem ao período da fecundação até a eclosão. Os estágios 21 ao 41 correspondem ao período de desenvolvimento do girino, e os estágios 42 ao 46 correspondem à metamorfose (Anexo 1).

Etkin (1968) define o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimentos dependentes dos hormônios da tireóide, sendo elas: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax. A pré-metamorfose corresponde aos estágios 1 ao 30 de Gosner (1960), a pró-metamorfose inicia-se no estágio 31, com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios tireoideanos, e vai até o estágio 41 de Gosner (1960). O clímax inicia-se no estágio 42 e vai até o estágio 46 de Gosner (1960).

#### - *Animais experimentais*

Os girinos foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros. A densidade utilizada foi a de um girino para cada dois litros. A temperatura máxima da água foi de  $28,6 \pm 1,6$ , enquanto a mínima foi  $26,0 \pm 0,8$ . Semanalmente foram realizadas coletas dos girinos que foram separados por estágios de desenvolvimento. A coleta prosseguiu até o final da metamorfose. Um total de 253 girinos (10 a 12 por estágio) foi coletado, sendo anestesiados em água com gelo a 4°C e, em seguida, sacrificados para posteriores análises de sintopia e morfometria.

#### - *Sintopia dos órgãos do sistema digestório*

As análises foram realizadas em girinos dos estágios 26 ao 45. Os animais foram fixados em formol 10% e abertos com incisão longitudinal ventral para exposição dos

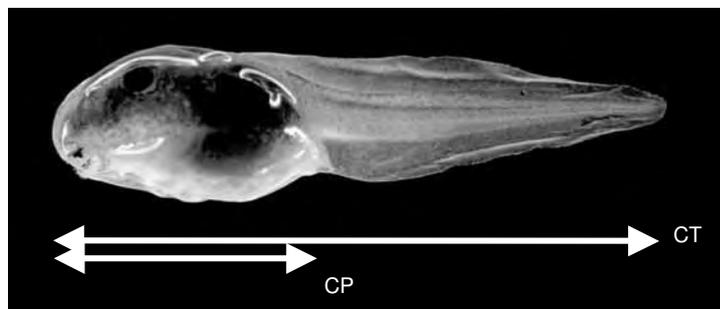
órgãos do sistema digestório. O tubo digestório foi dissecado e identificado como intestino anterior ou manicoto glandular (ROVIRA et al., 1995), intestino médio e intestino posterior (BONNEVILLE, 1963). Em seguida, realizou-se a fotodocumentação em estereomicroscópio LEICA-MZ8 acoplado à câmera de vídeo digital LEICA- DFC 280. A partir das fotomicrografias, foram realizados desenhos esquemáticos em papel vegetal e tinta nanquim para melhor visualização dos órgãos da cavidade visceral.

#### - Morfometria

O estudo morfométrico foi realizado em girinos dos estágios 26 ao 45. Registrou-se com paquímetro digital o comprimento total (início da cabeça até o final da cauda) e o comprimento parcial (início da cabeça até inserção da cauda) (Figura 1). O peso (g) de cada girino foi registrado em balança analítica.

O sistema digestório foi dissecado, e separado em tubo digestório, fígado e pâncreas, os quais foram pesados em balança analítica. Com o auxílio de uma régua, verificaram-se as medidas de comprimento (cm) do tubo digestório.

Para cada estágio de desenvolvimento, avaliaram-se os índices somáticos: relações entre peso do fígado/peso do girino, peso do intestino/peso dos girinos e comprimento do intestino/comprimento dos girinos.



**Figura 1:** Fotomicrografia de girino de *R. catesbeiana* mostrando os comprimentos total (CT) e parcial (CP).

---

- *Análise estatística*

Para todos os dados foram realizados os testes de homogeneidade de variância (Levene) e de normalidade dos erros (Cramer-von Mises). Para os dados cuja a premissa da homogeneidade das variâncias não foi verificada, foram realizadas transformações apropriadas nos dados e, em seguida, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Utilizou-se o programa “SAS system” versão 9.0.

## RESULTADOS

O sistema digestório dos girinos da *R. catesbeiana* foi constituído pelo manicoto glandular, intestino médio, intestino posterior e glândulas anexas: fígado e pâncreas. O manicoto glandular ou intestino anterior dos girinos, no estágio 26, apresentou-se na forma de um tubo longo que inicialmente estava localizado dorsalmente ao fígado, após uma curva, localizou-se na face ventral deste mesmo órgão, e sua e porção final localizou-se na região látero-lateral direita da cavidade visceral e látero-medial ao fígado (Figuras 2A-C e 3A). Uma pequena constrição delimitou o final deste órgão e o início do intestino médio (Figuras 2A-C e 3A).

Dos estágios 26 ao 41 não ocorreram mudanças na sintopia neste órgão, ocorrendo apenas aumento do tamanho (Figuras 2D e 3B). A partir do estágio 42, quando se iniciou o clímax metamórfico, observaram-se alterações na sintopia e no tamanho dos órgãos do sistema digestório. O manicoto glandular se deslocou da região látero-lateral direita para região látero-lateral esquerda da cavidade visceral se fixando nessa posição no estágio 43 (Figuras 2E-F e 3C-D). No estágio 44 ocorreu aumento do diâmetro do manicoto glandular e o esfíncter pilórico apresentou-se bem definido no final deste órgão (Figura 3E). No estágio 45 o manicoto glandular já apresentava características anatômicas e topográficas similares ao estômago do adulto (Figura 3F).

O intestino mostrou-se formado por um tubo longo e delgado, possuindo comprimento de quatro a cinco vezes superior ao tamanho do girino, sendo a maior parte de seu segmento disposto em espirais duplas e voltado para o lado esquerdo da cavidade visceral. No estágio 26 ainda não se observava a separação dos intestinos médio e posterior (Figuras 4A e 5A). A partir do estágio 27, estes intestinos se diferenciaram.

O intestino médio estendeu-se do final do estômago até a última espiral, sendo a região localizada entre a constrição do estômago e o ducto colédoco denominada de região duodenal. O intestino posterior iniciou-se na última espiral do intestino médio e seguiu até a cloaca.

Dos estágios 26 ao 41 não ocorreram mudanças topográficas, ocorrendo apenas aumento do tamanho e diâmetro das alças intestinais (Figuras 4A-C e 5A-B). A partir do estágio 42 ocorreu uma diminuição abrupta do tamanho das alças intestinais (Figura 5C). No estágio 43 iniciou-se o processo de deslocamento da região látero-lateral esquerda da cavidade visceral para a região caudal (Figuras 4D e 5D). Nos estágios 44 e 45 as alças intestinais já se encontravam na região caudal e iniciou-se a perda da configuração espiralada do intestino (Figuras 4E-F e 5E-F).

No estágio 26, o fígado (glândula anexa) não se apresentou anatomicamente definido e localizou-se adjacente ao esôfago e ao estômago em posição látero-ventral direita à cavidade visceral (Figura 6). A partir do estágio 27, a estrutura hepática mostrou-se definida em três lobos, denominados de direito, médio e esquerdo (Figura 7). Os lobos localizaram-se de forma ântero-ventral ao estômago e ventral à cavidade visceral. A vesícula biliar apresentou-se de forma arredondada, localizando-se entre os lobos direito e médio, na face dorsal do fígado. O ducto colédoco emergiu da região posterior do fígado e ligou-se à primeira porção do intestino, o duodeno (Figuras 8 e 9). A partir deste estágio e nos seguintes, até a metamorfose, não houve alterações topográficas.

O pâncreas (segunda glândula anexa) situou-se na parte direita do plano médio do

corpo do girino (Figura 10), possuindo apenas um lobo em forma arqueada. É constituído por uma porção mais larga localizado na porção final do manicoto glandular e vai se afinando até formar uma porção mais delgada, como cauda, na região do duodeno. Possui coloração bem clara, quase branca, e consistência mole (Figura 10).

No estágio 25, o pâncreas apresentou a porção mais espessa localizada na porção final do manicoto glandular e ventralmente ao fígado, sobrepondo-se a este e cranialmente ao intestino. A porção mais delgada apareceu lateralmente ao intestino, contornando-se caudalmente ao manicoto glandular e ao fígado, como pode ser observado na Figura 10.

Nos estágios seguintes (26 a 41), observou-se apenas crescimento do pâncreas, sem mudanças significativas no formato ou localização anatômica (Figura 10A). Porém, a partir do estágio 42, visualizou-se o órgão com o tamanho menor que o estágio anterior (41), ainda localizado no plano direito do corpo do girino (Figura 10B). No estágio 43, este órgão apareceu no plano médio do girino, isso ocorreu porque o pâncreas acompanhou a migração do manicoto glandular do lado direito para o lado esquerdo da cavidade visceral (Figura 10C).

O pâncreas continuou diminuindo de tamanho até o final da metamorfose (estágio 45), onde passou a ter forma de fita fina, dificilmente sendo localizado devido à forma diminuta e por passar a ter sua localização dorsal ao estômago e ao fígado (Figura 10D).

#### - Morfometria

Observou-se, durante o desenvolvimento dos girinos de *R. catesbeiana*, um crescimento contínuo e significativo dos mesmos (Figuras 11 e 12). O maior crescimento corporal (comprimento total, parcial e peso) dos girinos ocorreu no estágio 42. A partir deste estágio, não se observou crescimento corporal. No estágio 45 verificou-se uma nítida diminuição do comprimento total devido ao processo de reabsorção da cauda, que fez com que o comprimento total quase se igualasse ao comprimento parcial (Figuras 11 e 12).

O tubo digestório, compreendido pelo manicoto glandular, intestino médio e intestino posterior, apresentaram, durante o desenvolvimento dos girinos, crescimento contínuo do comprimento e do peso até o estágio 41. A partir do estágio 42 observou-se queda crescente tanto do comprimento quanto do peso, até o estágio 45 (Tabela 1). Da mesma forma, quando calculada a relação comprimento do intestino/comprimento total e comprimento do intestino/comprimento parcial, os maiores valores se encontraram no estágio 41, enquanto os menores valores pertenceram ao estágio 45 (Tabela 1).

O desenvolvimento inicial do pâncreas ao longo dos estágios estudados mostrou aumento contínuo do peso, acompanhando o crescimento e desenvolvimento dos animais nos estágios 26 a 41, como pode ser observado na Tabela 2. Com o início da metamorfose, que começa a ocorrer no estágio 42, observou-se uma diminuição considerável do peso do pâncreas, chegando a uma redução de 93% do peso ao final da metamorfose, no estágio 45. O índice somático do pâncreas acompanhou o mesmo padrão do peso, observando-se uma diminuição deste índice durante o período da metamorfose (Tabela 2).

O fígado, durante o desenvolvimento, também apresentou um crescimento contínuo até o estágio 41 e nos estágios seguintes observou-se uma diminuição do peso, similar ao ocorrido no intestino e pâncreas. Contudo, o índice somático do fígado não mostrou alteração durante todo o desenvolvimento (Tabela 2).

## **DISCUSSÃO**

As características anatômicas do sistema digestório estão diretamente associadas ao hábito alimentar, à forma da cavidade peritoneal e, por sua vez, com a forma do corpo (BÉRTIN, 1958). Animais herbívoros e onívoros possuem um tubo digestório bastante longo quando comparado aos carnívoros. Isto se deve ao fato de alguns componentes da dieta herbívora serem de difícil digestão e requererem longo tempo e maior exposição para

serem absorvidos (BÉRTIN, 1958; FÄNGE; GROVE, 1979; VERIGINA, 1990).

Os girinos onívoros e herbívoros, como os do gênero *Rana*, não possuem estômago anatomicamente diferenciado, havendo apenas uma pequena constrição delimitando o início do intestino (BURGGREN; JUST, 1992; VIERTEL; RICHTER, 1999). Os girinos carnívoros como *Ceratophrys dorsata* e *Lepidobatrachus laevis* apresentam uma estrutura análoga ao estômago do adulto (BURGGREN; JUST, 1992). O intestino dos herbívoros e onívoros, por sua vez, apresenta um longo comprimento, disposto em dupla espiral ocupando a maior parte da cavidade visceral. O mesmo não acontece com os girinos carnívoros em que o intestino é curto e não se apresenta em forma espiralada (NOBLE, 1954). Os resultados encontrados neste estudo mostraram o girino da *R. catesbeiana* apresentando um tubo digestório bastante longo sem distinção anatômica do estômago. Morfometricamente, o intestino chegou a ser seis vezes maior que o próprio girino na fase de maior desenvolvimento do mesmo.

Bértin (1958) relacionou o coeficiente intestinal (comprimento do intestino/comprimento corporal) de peixes com seus respectivos hábitos alimentares, e propôs que a amplitude dos valores do coeficiente intestinal para os carnívoros seria de 0,4 a 2,5; para os onívoros de 0,6 a 8,0 e para os herbívoros de 0,8 a 15. No caso dos girinos de *R. catesbeiana*, os valores do coeficiente intestinal, encontrados antes da metamorfose, classificariam estes girinos com o hábito alimentar onívoro, contrariando os achados de Albinati (1995) que classificou os girinos da *R. catesbeiana* como sendo herbívoro. Contudo, apenas os valores do coeficiente intestinal não são suficientes para determinar se um animal é herbívoro ou onívoro, devendo-se observar o tipo de alimento consumido e se o animal possui características apropriadas para digestão de matéria vegetal.

O girino de *R. catesbeiana* se alimenta principalmente de plantas aquáticas, microinvertebrados e carcaça de girinos mortos (BURRY; WHELAN, 1985), além de consumir proteína tanto de origem vegetal como animal, sendo que a de origem vegetal

promove um maior crescimento, retardando, contudo, o processo de metamorfose (VEIGA, 1989).

Anatômica e morfometricamente, as mudanças ocorridas no sistema digestório dos girinos durante a metamorfose estão relacionadas à mudança no hábito alimentar. Geralmente, os girinos deixam de ser herbívoros ou onívoros para se tornarem adultos carnívoros (DUELLMAN; TRUEB, 1986; BURGGREN; JUST, 1992).

Durante o processo de metamorfose, ocorre um rearranjo dos órgãos do sistema digestório na cavidade visceral, além do desenvolvimento do estômago, e encurtamento do intestino (CARVER; FRIENDEN, 1977; PRETTY; NAITOH; WASSERSUG, 1995; RIBEIRO-FILHO, 1997). Esse encurtamento do intestino pode variar entre as espécies de girinos. Observou-se uma diminuição de 58,15% em *Rana temporaria*, 82,2% em *Rana pipiens*, 90% em *Alytes obstetricans* e 84% em *Rana catesbeiana* quando a metamorfose foi induzida por hormônios tireoideanos (JANES, 1934; CARVER; FRIENDEN, 1977; DAUÇA; HOURDRY, 1985; PRETTY; NAITOH; WASSERSUG, 1995).

As mudanças anatômicas e morfométricas observadas no sistema digestório dos girinos da rã-touro estão estritamente relacionadas com a mudança de hábito alimentar de onívoro para carnívoro. Para se adequar ao novo estilo de vida, o girino, durante a metamorfose, sofre processo de remodelação da cavidade visceral desenvolvendo estruturas compatíveis ao hábito carnívoro. De acordo com Noble (1954) as características anatômicas predominantes em anfíbios carnívoros são a presença de um estômago desenvolvido, e um curto comprimento de intestino.

A diminuição acentuada do peso do pâncreas ocorrida no girino da rã-touro, observada neste estudo, durante o processo de metamorfose, pode estar relacionada com a perda de parte do tecido acinar e endócrino que ocorre neste órgão (NAKAGHI et al., 2006). Estudos com *Xenopus laevis* e *Rana pipiens* evidenciaram que, durante a metamorfose, o pâncreas sofre diminuição de até 85% do volume devido a uma

remodelação tecidual, na qual grande parte do tecido acinar é afetada (LEONE et al., 1976; ORTIZ DE ZARETE et al., 1991; VIERTTEL; RICHTER, 1999).

Milano e Chimenti (1995) observaram que o desenvolvimento do pâncreas ocorre através de uma seqüência complexa. Inicialmente, este órgão tende a aumentar por diferenciação para, posteriormente, durante o clímax metamórfico, regredir. O estudo de Milano e Chimenti (1995) confirma os dados morfométricos do peso do pâncreas apresentado na Tabela 2, em que se observou um aumento contínuo do pâncreas até o início da metamorfose, ocorrendo, posteriormente, a diminuição do mesmo.

Durante a metamorfose, com a desestruturação do pâncreas, observa-se também alteração no perfil das enzimas digestivas. Leone et al. (1976) observaram nos girinos de *Xenopus laevis* diminuição da lipase e amilase neste período. Nakaghi, Buttler e Oliveira-Bahia (2007) observaram mudanças quantitativas no tecido endócrino pancreático dos girinos de *Rana catesbeiana*. Tais mudanças se caracterizaram por uma diminuição das células  $\Delta$  e aumento das células  $\alpha$  durante a metamorfose.

As mudanças ocorridas no pâncreas também podem estar relacionadas com a alteração do hábito alimentar, principalmente no tipo de nutriente a ser consumido nas diversas fases (girino e adulto). Girinos, herbívoros e onívoros, possuem dieta rica em carboidratos, enquanto que o adulto, por ser carnívoro, possui dieta rica em proteína; conseqüentemente, o aporte de enzimas digestivas para cada fase deve ser diferente. Contudo, não existem trabalhos que façam essas relações, sendo que a maioria dos estudos com pâncreas de girinos, ou são descritivos, ou enfocam principalmente o tecido endócrino (LEONE et al., 1976; KAUNG, 1983; FARRAR; HULSEBUS, 1985; MILANO; CHIMENTI, 1995).

O fígado não é um órgão primariamente digestivo, apesar de ser uma glândula anexa ao sistema digestório nos girinos (NOBLE, 1954). Este órgão atua de forma importante na digestão de gorduras através da produção de bile, contudo, sua importância

maior está como depósito de gordura e glicogênio, excreção de produtos nitrogenados e destruição de hemácias (NOBLE, 1954; BROWN; BROWN; COHEN, 1959; THEIL, 1973a; 1973b). As mudanças metamórficas que ocorrem no fígado são principalmente de caráter funcional, dentre elas pode-se citar: o aumento na produção de albumina e ceruloplasmina, a alteração da hemoglobina e das enzimas do ciclo da uréia e o aumento da síntese de DNA e RNA (BROWN; BROWN; COHEN, 1959; PAIK; METZENBERG; COHEN, 1961; THEIL, 1973a; 1973b; SHERIDAN; KAO, 1998).

Anatômica e morfometricamente, o fígado dos girinos da *R. catesbeiana* não apresentou alterações significativas, apesar de possuir uma pequena diminuição em seu peso durante a metamorfose. Tal alteração não modificou a relação do coeficiente hepático (peso do fígado/peso do girino) mostrado na Tabela 2, que permaneceu a mesma durante todo o desenvolvimento e metamorfose.

O conhecimento das transformações ocorridas na metamorfose do sistema digestório é um dos fatores determinantes para o sucesso e sobrevivência das espécies de anfíbios em sua transição ecológica do ambiente aquático para o terrestre. Além disso, a anatomia e a morfometria deste sistema apresentam uma estreita relação com o hábito alimentar, o que faz com que o conhecimento de tais características forneça subsídios para uma melhor compreensão dos fatores inerentes à nutrição destes animais.

## CONCLUSÃO

Durante a metamorfose dos girinos de *R. catesbeiana* houve uma reestruturação anatômica e topográfica da maioria dos órgãos da cavidade visceral, sendo estas alterações adaptativas à mudança do hábito alimentar do girino onívoro para o adulto carnívoro.

**Figura 2.** Desenhos esquemáticos dos órgãos do sistema digestório do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - cavidade visceral - posição látero-lateral direita: duodeno (D); estômago (ET); fígado (F); pâncreas (P); intestino médio (IM); constricção estomacal que divide o estômago do duodeno (círculo). A = 80x.

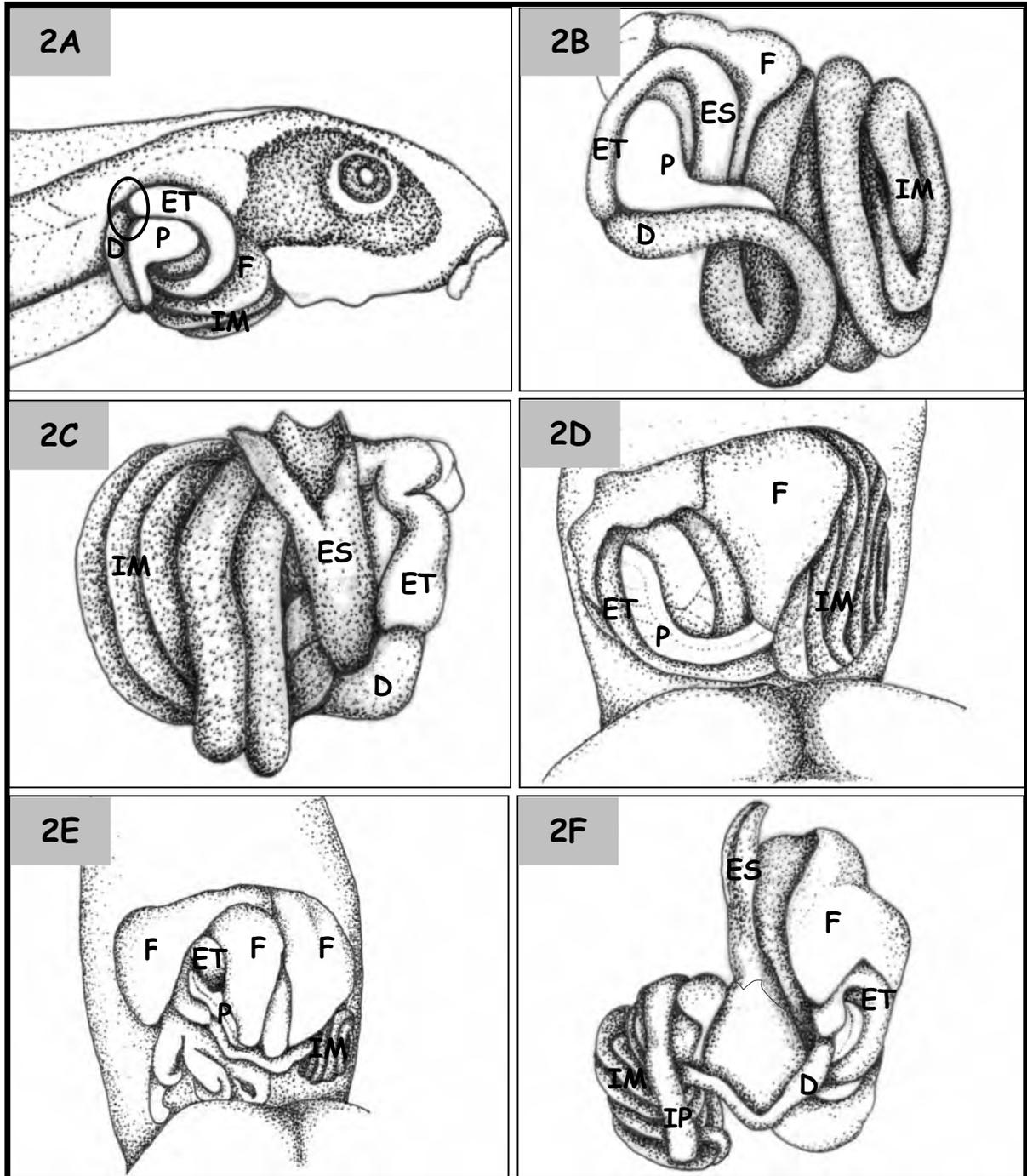
**B: Estágio 25** - vista látero-lateral direita: esôfago (ES); estômago (ET); duodeno (D); intestino médio (IM); fígado (F); pâncreas (P). A = 15x.

**C: Estágio 25** - vista dorsal: esôfago (ES), estômago (ET); intestino médio (IM); duodeno (D). A = 6,3x.

**D: Estágio 41** - cavidade visceral - posição látero-ventral direita: estômago (ET); fígado (F); intestino médio (IM); pâncreas (P). A = 6,3x.

**E: Estágio 42** - cavidade visceral - vista látero-lateral direita: estômago (ET); fígado (F); intestino médio (IM); pâncreas (P). A = 6,3x.

**F: Estágio 42** - vista dorsal: esôfago (ES); estômago (ET); duodeno (D); intestino médio (IM); intestino posterior (IP); fígado (F). A = 6,3x.



**Figura 3.** Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - posição látero-lateral direita: duodeno (D); estômago (ET); fígado (F); pâncreas (P); constrição estomacal que divide o estômago do duodeno (círculo). A = 80x.

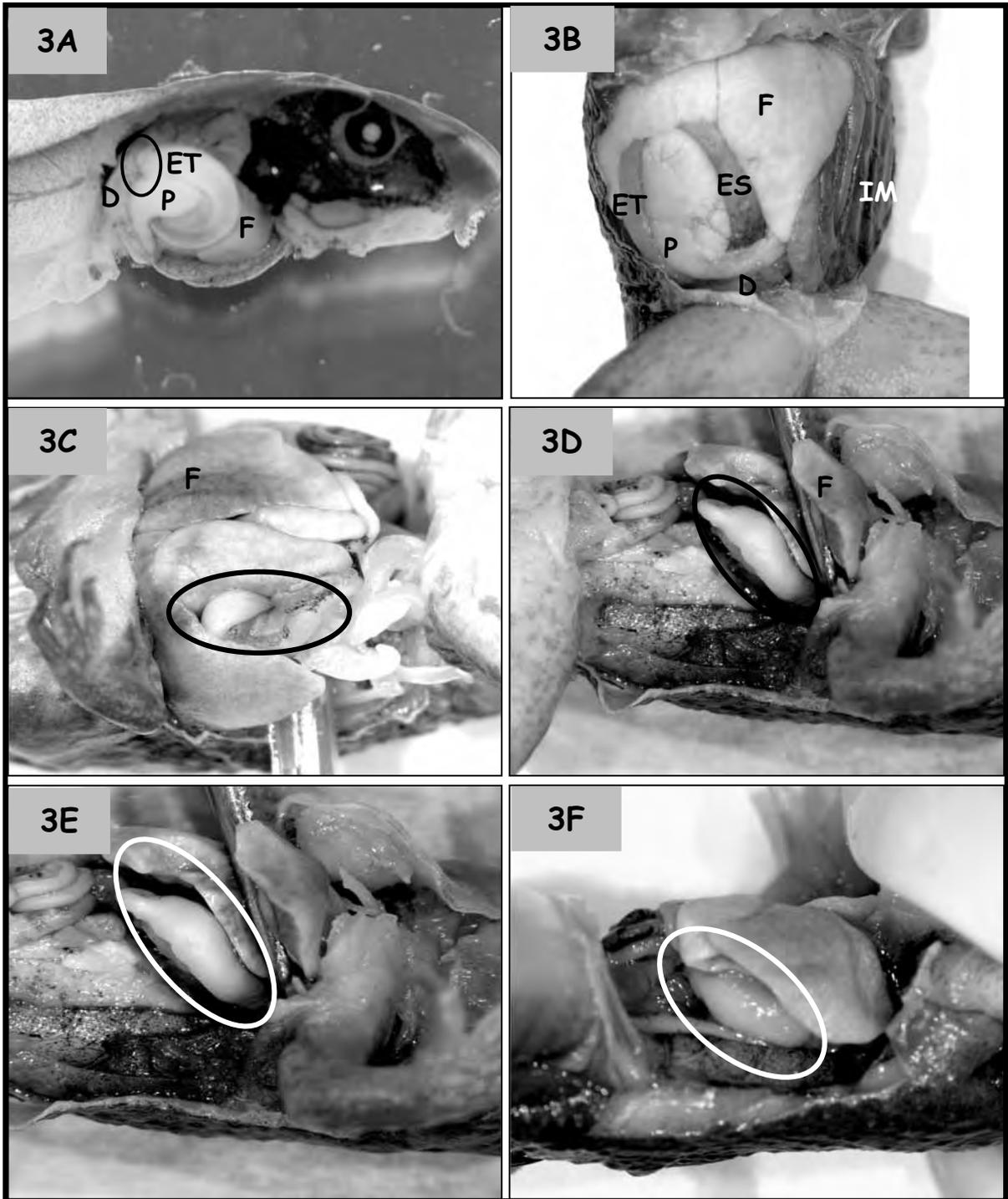
**B: Estágio 41** - vista látero-ventral direita: esôfago (ES); estômago (ET); duodeno (D); intestino médio (IM); fígado (F); pâncreas (P). A = 15x.

**C: Estágio 42** - vista látero-ventral direita: região gástrica formada pelo esôfago e estômago (círculo); fígado (F). A = 6,3x.

**D: Estágio 43** - posição látero-ventral esquerda: estômago (círculo); fígado (F). A = 6,3x.

**E: Estágio 44** - vista látero-ventral esquerda: estômago (círculo). A = 6,3x.

**F: Estágio 45** - vista látero-ventral esquerda: estômago (círculo). A = 6,3x.



**Figura 4.** Desenhos esquemáticos dos órgãos do sistema digestório do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - cavidade visceral - posição ventral: forma espiralada do intestino médio (IM); fígado (F). A = 80x.

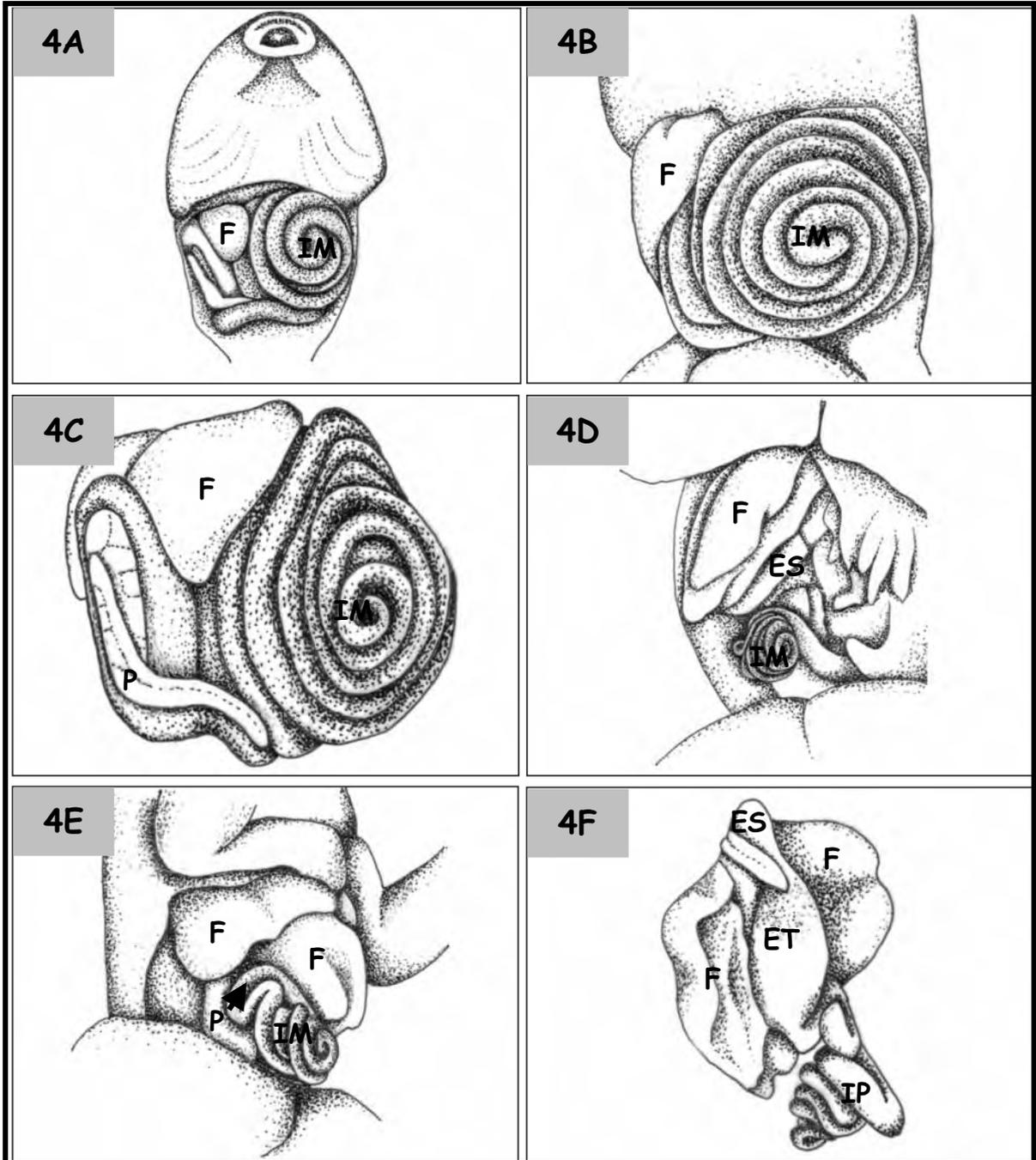
**B: Estágio 41** - posição látero-lateral esquerda: intestino médio (IM); fígado (F). A = 80x.

**C: Estágio 41** - posição látero-ventral direita: intestino médio (IM); fígado (F); pâncreas (P). A = 6,3x.

**D: Estágio 43** - posição látero-lateral esquerda: intestino médio (IM); fígado (F); estômago (ET). A = 6,3x.

**E: Estágio 45** - vista lateral direita: início da perda da configuração espiralada do intestino médio (IM) (seta); fígado (F); pâncreas (P). A = 6,3x.

**F: Estágio 45** - vista lateral esquerda: intestino médio (IM); intestino posterior (IP); fígado (F); estômago (ET); esôfago (ES). A = 6,3x.



**Figura 5.** Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - posição ventral: forma espiralada do intestino (seta); fígado (F). A = 80x.

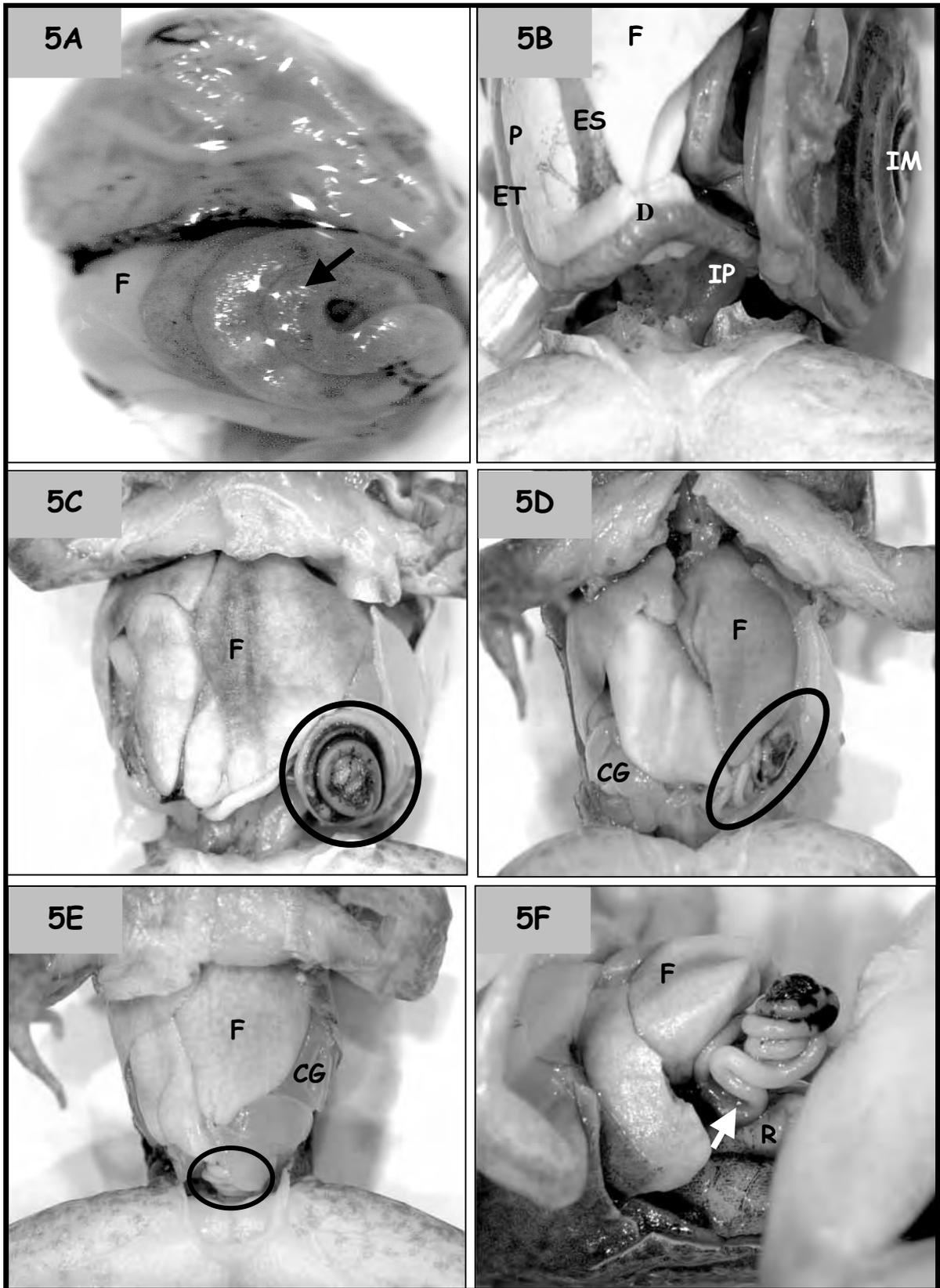
**B: Estágio 41** - posição látero-ventral direita: estômago (ET); esôfago (EF); fígado (F); intestino médio (IM); intestino posterior (IP); duodeno (D) e pâncreas (P). A = 80x.

**C: Estágio 42** - posição ventral: diminuição do comprimento e diâmetro do intestino médio (círculo); fígado (F). A = 6,3x.

**D: Estágio 43** - posição ventral: intestino médio (círculo); fígado (F); corpos gordurosos (CG). A = 6,3x.

**E: Estágio 44** - posição ventral: intestino médio localizado na região ventro-caudal (círculo); fígado (F); corpos gordurosos (CG). A = 6,3x.

**F: Estágio 45** - vista lateral direita: início da perda da configuração espiralada do intestino (seta); fígado (F); rim (R). A = 6,3x.

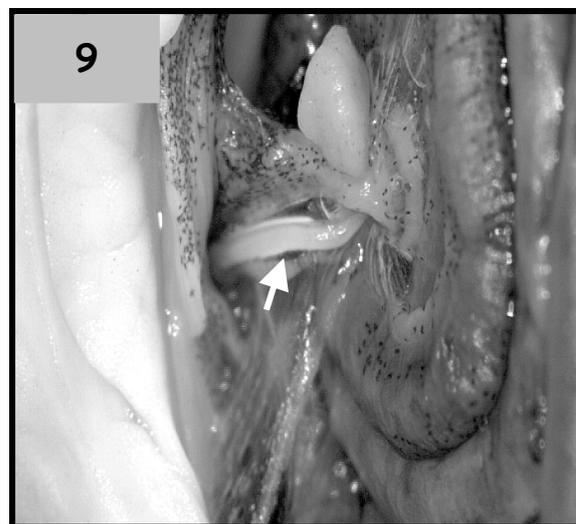
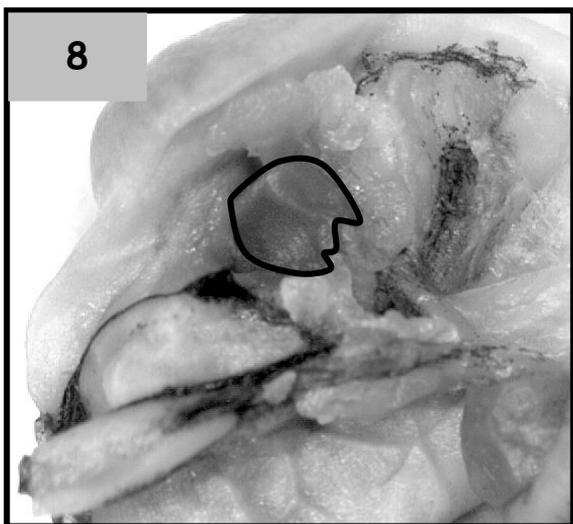
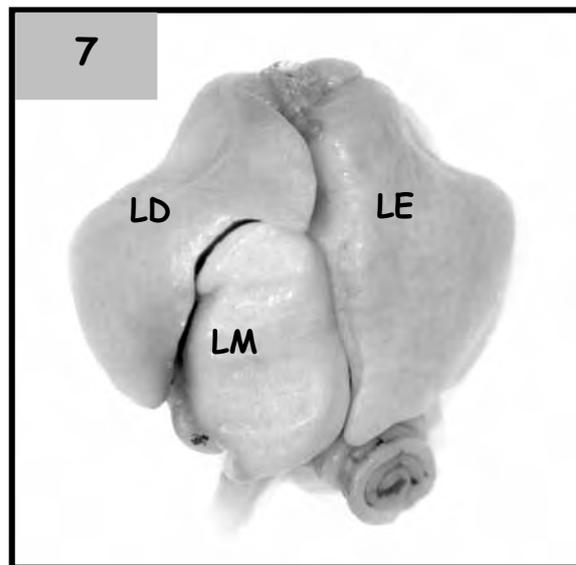


**Figura 6.** Fotomicrografia da cavidade visceral do girino de *R. catesbeiana*. **Estágio 25** - posição látero-lateral direita: fígado (F). A = 80x.

**Figura 7.** Fotomicrografia da região ventral do fígado do girino de *R. catesbeiana*. **Estágio 42** - lobo direito (LD); lobo médio (LM); lobo esquerdo (LE). A = 6,3x

**Figura 8.** Fotomicrografia da vesícula biliar do girino de *R. catesbeiana*. **Estágio 42** - vesícula biliar (destaque). A = 6,3x

**Figura 9.** Fotomicrografia do ducto colédoco do girino de *R. catesbeiana*. **Estágio 42** - ducto colédoco (seta). A = 10x



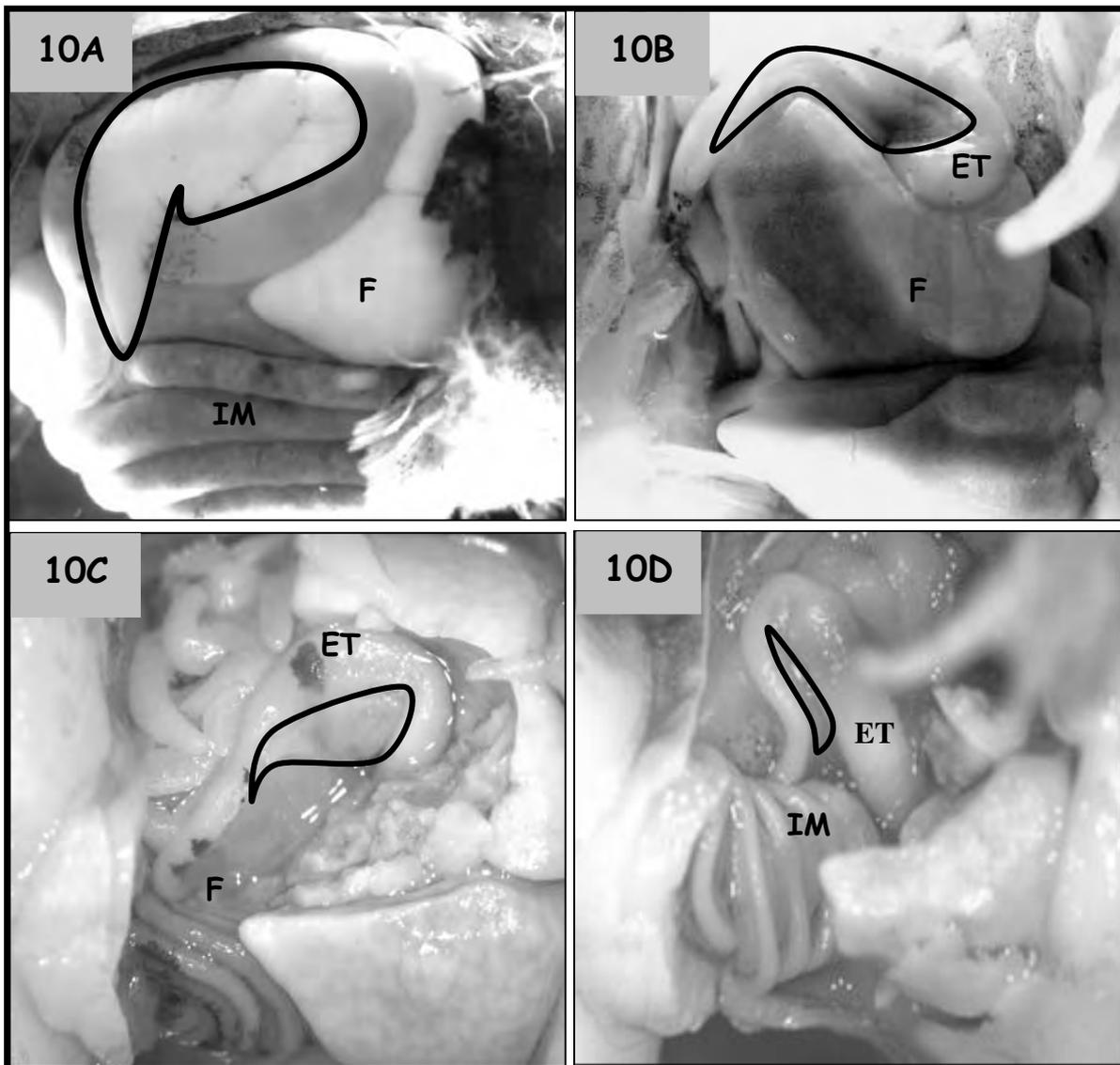
**Figura 10.** Fotomicrografias da cavidade visceral do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 28** - posição látero-ventral direita: pâncreas (destaque); fígado (F); intestino médio (IM). A = 10x.

**B: Estágio 42** - posição látero-ventral direita: pâncreas (destaque); fígado (F); estômago (ET). A = 6,3x.

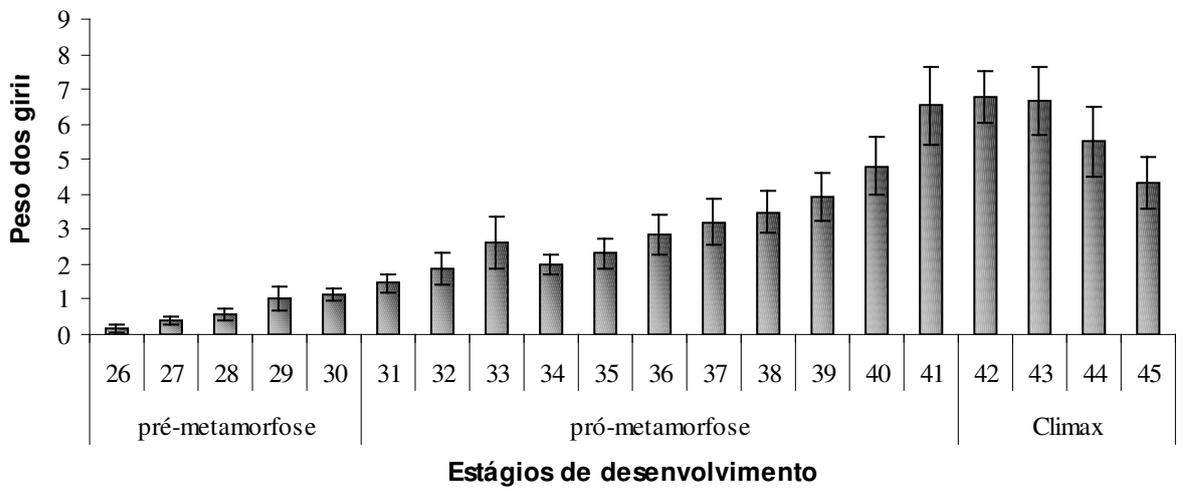
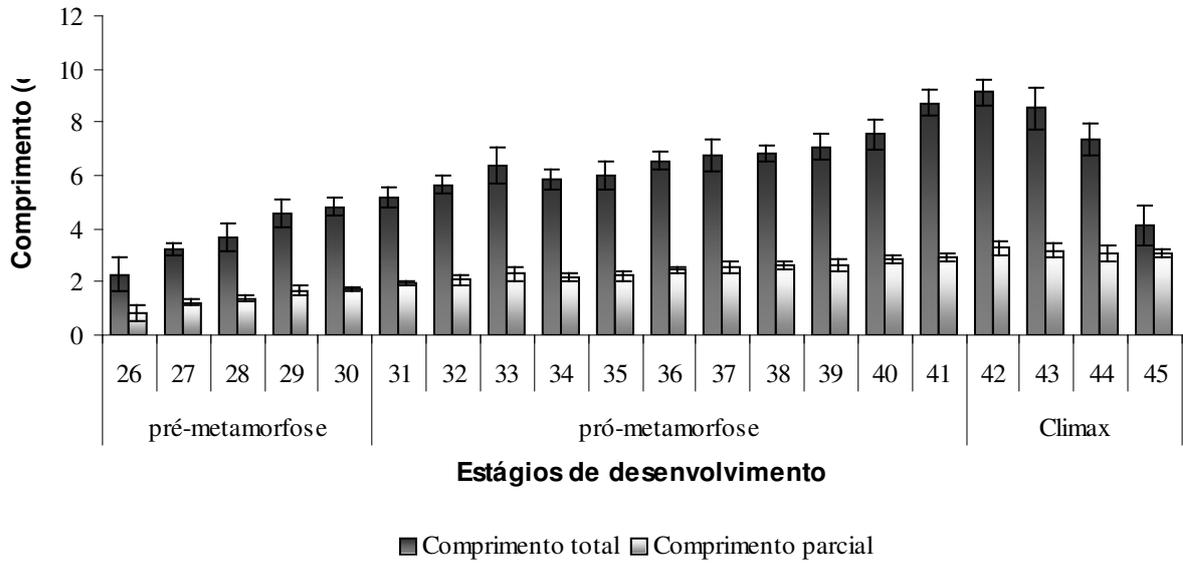
**C: Estágio 43** - posição ventral: a porção mais ventral do fígado foi rebatida para o lado direito para a melhor visualização do pâncreas (destaque); estômago (ET); fígado (F). A= 6,3x.

**D: Estágio 44** - posição ventral: a porção mais ventral do fígado foi retirada e o estômago foi rebatido para o lado direito para revelar o pâncreas (destaque); estômago (ET); intestino médio (IM). A = 6,3x.



**Figura 11.** Médias dos valores dos comprimentos total e parcial dos girinos (cm) ao longo dos estágios de desenvolvimento (GOSNER, 1960). ANOVA,  $F_{19}= 73,19$ ,  $P < 0,001$ .

**Figura 12.** Médias dos valores de peso (g) dos girinos de *R. catesbeiana* ao longo dos estágios de desenvolvimento (GOSNER, 1960). ANOVA,  $F_{19}= 51,44$ ,  $P < 0,001$



**Tabela 1:** Médias do comprimento e do peso do intestino dos girinos de *R. catesbeiana* e razão entre o comprimento do intestino com o comprimento total e parcial dos girinos nos diversos estágios de desenvolvimento.

Estágios de Desenvolvimento (Gosner, 1960)	(n)	Comprimento do intestino <sup>1</sup> (cm)	Peso do intestino <sup>2</sup> (g)	Comp. intestino / Comp. total	Comp. intestino / Comp. parcial
26	10	4,30 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,0052 ± 0,001 <sup>i</sup>	2,60	6,385
27	12	12,50 ± 0,52 <sup>ab</sup>	0,0446 ± 0,004 <sup>hi</sup>	3,82	9,930
28	13	12,80 ± 2,43 <sup>ab</sup>	0,0517 ± 0,019 <sup>ghi</sup>	3,80	9,559
29	10	20,40 ± 2,98 <sup>bcjnr</sup>	0,0983 ± 0,031 <sup>fghi</sup>	4,63	12,034
30	15	17,93 ± 2,15 <sup>bcdgjn</sup>	0,0849 ± 0,031 <sup>efghi</sup>	3,66	10,324
31	15	24,17 ± 1,44 <sup>beg</sup>	0,1636 ± 0,027 <sup>defgh</sup>	4,94	12,303
32	7	26,23 ± 3,35 <sup>efgl</sup>	0,1754 ± 0,040 <sup>cdef</sup>	4,84	13,189
33	15	25,90 ± 2,0 <sup>cefgl</sup>	0,1619 ± 0,016 <sup>cde</sup>	4,79	12,980
34	11	28,37 ± 0,92 <sup>eghi</sup>	0,1936 ± 0,038 <sup>cdef</sup>	4,99	13,755
35	14	27,67 ± 5,34 <sup>ehij</sup>	0,2188 ± 0,082 <sup>cd</sup>	5,31	12,936
36	15	38,33 ± 6,63 <sup>hlm</sup>	0,3847 ± 0,125 <sup>c</sup>	5,70	15,114
37	15	28,17 ± 8,22 <sup>elnq</sup>	0,2965 ± 0,123 <sup>c</sup>	4,34	11,830
38	11	41,50 ± 2,88 <sup>mo</sup>	0,3830 ± 0,105 <sup>c</sup>	6,19	15,828
39	15	41,53 ± 11,74 <sup>hno</sup>	0,4829 ± 0,169 <sup>b</sup>	5,87	15,883
40	15	44,88 ± 4,81 <sup>op</sup>	0,4712 ± 0,080 <sup>b</sup>	6,41	16,168
41	15	57,23 ± 2,85 <sup>p</sup>	0,8867 ± 0,272 <sup>a</sup>	6,64	18,621
42	15	22,90 ± 8,77 <sup>bfiq</sup>	0,1723 ± 0,118 <sup>defg</sup>	2,74	8,329
43	10	8,93 ± 1,59 <sup>ar</sup>	0,0571 ± 0,004 <sup>ghi</sup>	1,10	3,117
44	10	9,43 ± 1,35 <sup>ar</sup>	0,0706 ± 0,011 <sup>ghi</sup>	1,17	3,475
45	10	4,73 ± 0,40 <sup>ad</sup>	0,0817 ± 0,012 <sup>efghi</sup>	0,99	1,559

Letras iguais significam diferenças não significativas

1 ANOVA:  $F_{19} = 172,39$ ;  $P < 0,001$

2 ANOVA:  $F_{19} = 158,26$ ;  $P < 0,001$

**Tabela 2:** Médias do peso e coeficiente somático do fígado e pâncreas dos girinos de *R. catesbeiana* nos diversos estágios de desenvolvimento.

Estágios de Desenvolvimento (Gosner, 1960)	(n)	Peso do fígado <sup>1</sup> (mg)	Peso do Pâncreas <sup>2</sup> (mg)	Índice Somático (Fígado)	Índice Somático (Pâncreas)
26	10	7,0 ± 0,006 <sup>i</sup>	1,10 ± 0,70 <sup>i</sup>	0,045	0,63
27	12	16,1 ± 0,004 <sup>hi</sup>	1,50 ± 0,60 <sup>ghi</sup>	0,041	0,57
28	13	24,3 ± 0,008 <sup>hi</sup>	2,30 ± 1,00 <sup>ghi</sup>	0,042	0,39
29	10	42,5 ± 0,012 <sup>ghi</sup>	3,30 ± 1,40 <sup>fghi</sup>	0,044	0,33
30	15	50,4 ± 0,009 <sup>ghi</sup>	3,30 ± 0,70 <sup>fghi</sup>	0,044	0,28
31	15	64,5 ± 0,015 <sup>fghi</sup>	7,40 ± 3,10 <sup>def</sup>	0,043	0,51
32	7	80,2 ± 0,027 <sup>efgh</sup>	6,00 ± 3,20 <sup>efgh</sup>	0,036	0,32
33	15	93,7 ± 0,027 <sup>efg</sup>	7,00 ± 2,70 <sup>efg</sup>	0,045	0,27
34	11	89,5 ± 0,020 <sup>efg</sup>	8,60 ± 2,00 <sup>cde</sup>	0,042	0,43
35	14	98,3 ± 0,024 <sup>efg</sup>	9,10 ± 4,00 <sup>cde</sup>	0,043	0,39
36	15	121,8 ± 0,032 <sup>ef</sup>	13,50 ± 3,90 <sup>bc</sup>	0,045	0,47
37	15	145,3 ± 0,041 <sup>de</sup>	12,60 ± 3,70 <sup>c</sup>	0,040	0,39
38	11	140,5 ± 0,041 <sup>de</sup>	11,40 ± 3,70 <sup>cd</sup>	0,049	0,47
39	15	193,7 ± 0,058 <sup>cd</sup>	18,20 ± 5,10 <sup>b</sup>	0,048	0,46
40	15	232,9 ± 0,090 <sup>c</sup>	18,40 ± 5,70 <sup>b</sup>	0,053	0,38
41	15	342,8 ± 0,082 <sup>a</sup>	25,80 ± 5,00 <sup>a</sup>	0,050	0,40
42	15	341,4 ± 0,062 <sup>a</sup>	9,00 ± 4,60 <sup>cde</sup>	0,046	0,13
43	10	304,4 ± 0,069 <sup>ab</sup>	3,60 ± 2,10 <sup>fghi</sup>	0,047	0,05
44	10	258,8 ± 0,061 <sup>bc</sup>	3,30 ± 1,00 <sup>fghi</sup>	0,045	0,06
45	10	193,0 ± 0,045 <sup>cd</sup>	1,90 ± 0,40 <sup>hi</sup>	0,041	0,04

Letras iguais significam diferenças não significativas

1 ANOVA:  $F_{19} = 73,19$ ;  $P < 0,001$

2 ANOVA:  $F_{19} = 51,44$ ;  $P < 0,001$

**REFERÊNCIAS**

ALBINATI, R. C. B. **Estudos Biométricos e Nutricionais com Girinos de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1808)**. 102 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1995.

BARBIERI, G. P.; J. R. VERANI. Notas sobre a adaptação do trato digestivo ao regime alimentar em espécies de peixes da região de São Carlos (SP). I. Coeficiente Intestinal. **Brasilian Journal of Biology**, São Carlos, v.54, p.63-69, 1994.

BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.) **Traité de zoologie**. Paris: Masson, v.13, p.1249-1301, 1958.

BONNEVILLE, M. A. Fine structural changes in the intestinal epithelium of the bullfrog during metamorphosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.18, p.579-597, 1963.

BROWN Jr., G. W.; BROWN, W. R.; COHEN, P. P. Comparative biochemistry of Urea Linythesis. II. Levels of Urea Cycle enzymes in metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.234 (7), p.1775-1780, 1959.

BURGGREN, W. W.; JUST, J. J. Developmental changes in physiological systems. In M. E. Feder and W. W. Burggren, eds **Enviromental physiology of the Amphibians**. University of Chicago Press, Chicago, p.467-530, 1992.

BURRY, R. B.; WHELAN, J. A. **Ecology and management of the bullfrog**. Washington D. C.U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1985, 23p.

CARVER, V. H.; FRIEDEN, E. Gut Regression during Spontaneous and Triiodothyronine Induced Metamorphosis in *Rana catesbeiana* Tadpoles. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.31, p.202-207, 1977.

CHALMERS, A.; SLACK, J. Development of the Gut in *Xenopus laevis*. The Developmental Biology Programme, Department of Biology and Biochemistry of Bath, Bath, United Kindom. **Developmental Dynamics**, New York, v.212, p.509-521, 1998.

DAUÇA, M.; HOURDRY, J. In: **Metamorphosis** (eds. M. Balls and M. Bownes), Clarendon Press, Oxford, p.36-58, 1985.

DELARIVA, R. L. AGOSTINHO, A. A. Relationship between morphology and dietas of six neotropical loricaiids. **Journal of Fish Biology**, London, v.58, p.832-847, 2001.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill. New York, p.508-509, 1986.

ETKIN, W. In: **Metamorphosis. A problem in development biology**. Ed. By W. Etkin and L. T. Gilbert. Appleton – Century – Crofts, New York, p.313-348, 1968.

FÄNGE, R.; GROVE, D. Digestion. In: **Fish physiology**. Ed. Hoar, W. S. ; Randall, D. J. ; Brett, J. R. New York, Academic Press, v.3, p.162-260, 1979.

FARRAR, E. S.; HULSEBUS, J. Insulin-like immunoreactivity in serum and pancreas of metamorphosing tadpoles. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.58(1), p.114-119, 1985.

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

HOUDRY, J.; L'HERMITE, A., FERRAND, R. Changes in the Digestive Tract and Feeding Behavior of Anuran Amphibians during Metamorphosis. **Physiological Zoology**, Chicago, v.69 (2), p.219-251, 1996.

JANES, R. G.; Studies on the amphibian digestive system. I. Histological changes in the alimentary tract of anuran larvae during involution. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v.67, p.73-91, 1934.

KAUNG, H. C., Changes of pancreatic beta cell population during larval development of *Rana pipiens*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.49, p.50-56, 1983.

KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationship to diet – the long and short of a convoluted tissue. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v.42, p.129-141, 1995.

LEONE, F.; LAMBERT-GARDINI, S.; SARTORI, C.; SCARPIN, S. Ultrastructural analysis of some functional aspects of *Xenopus laevis* pancreas during development and metamorphosis. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, London, v.36 (3), p.711-724, 1976.

MARSHALL, J. A.; DIXON, K. E. Cell specialization in the epithelium of the small intestine of feeding *Xenopus laevis* tadpoles. **Journal of Anatomy**, London, v.126 (1), p.133-144, 1978.

MILANO, E. G.; CHIMENTI, C. Morphogenesis of the Pancreas of Bufo during Metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.97, p.239-249, 1995.

NAKAGHI, L. S. O.; BUTLLER, L.; OLIVEIRA-BAHIA, V. L.; STÉFANI, M. V. Estudo anatômico e histológico do pâncreas dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante desenvolvimento e metamorfose. *In: AquaCiência 2006*, Bento Gonçalves. **AquaCiência 2006 - Abstracts.**, 2006.

NAKAGHI, L. S. O.; BUTLLER, L.; OLIVEIRA-BAHIA, V. L. Ultraestrutura das células pancreáticas dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante desenvolvimento e metamorfose. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, 2007, In: XXI CSBMM, Búzios, Rio de Janeiro, 2007.

NOBLE, G. K. The digestive system. In: **The Biology the Amphibian**. Ed. G. K. Noble. New York. Dover Publication Inc. Chapter IX. p.201-211, 577p. 1954.

ORTIZ DE ZARETE, A.; VILLARO, A. C.; ETAYO, J. C.; DIAZ DE RADA, O.; MONTUENGA, L. M., SESMA, P.; VÁZQUEZ, J. J. Developmental of the endocrine pancreas during larval phases of *Rana temporaria*: An immunocytochemical and ultrastructural study. **Cell and Tissue Research**, New York, v.264, p.139-150, 1991.

PAIK, W. K.; METZENBERG, R. L.; COHEN, P. P. Biochemical studies on amphibian metamorphosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.236 (2), p.536-541. 1961.

PRETTY, R.; NAITOH, T.; WASSERSUG, R. J. Metamorphic shortening of the alimentary tract in anuran larvae (*Rana catesbeiana*). **The Anatomical Record**, New York, v.242, p.417-423, 1995.

RIBEIRO-FILHO, O. P. Anatomia-fisiologia de aparelho digestório de girino. **IX ENAR & TECNOFROG 97**, Santos, SP, p.85-93, 1997.

ROVIRA, J.; VILLARO, A. C.; BODEGAS, M. E., VALVERDE, E.; SESMA, P. Metamorphic changes in the stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles. **Tissue and Cell**, Essex, v.27 (1), p.13-22, 1995.

SHERIDAN, M. A.; KAO, Y. Regulation of Metamorphosis-Associated Changes in the Lipid Metabolism of Selected Vertebrates, **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.38(2), p.350-368; 1998.

THEIL, E. C. Amphibian red blood cell ferritin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.248(2), p.622-628, 1973a.

THEIL, E. C. Red cell ferritin content during the hemoglobin transition of amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, San Diego, v.34, p.282-288, 1973b.

VEIGA, N. Importância da alimentação e nutrição em ranicultura. In: **Minisimpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**. Botucatu, p.45-49, 1989.

VERIGINA, I. A.; Basic adaptation of the digestive system in bony fishes as a function of diet. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v.30, p.897-907, 1990.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: Viscera and Endocrines. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago Press. Chicago, p.92-148, 1999.

VILLARO, A. C.; ROVIRA, J.; BODEGAS, M. E.; BURREL, M. A.; SESMA, P. Relationship between epithelial and connective tissues in the stomach of the frog *Rana temporaria* during metamorphosis: an ultrastructural study. **Tissue & Cell**, Essex, v.30 (4), p.427-445, 1998.

## *CAPÍTULO IV*

---

---

**Histologia do intestino anterior, médio e posterior dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose**

**RESUMO**

Mudanças histolíticas e histogênicas ocorrem no intestino dos girinos durante a metamorfose devido à mudança do hábito alimentar onívoro para carnívoro. O presente trabalho teve como objetivo descrever o desenvolvimento do tubo gastroentérico dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose. Os experimentos foram conduzidos no Setor de Ranicultura do CAUNESP-UNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-UNESP. Os girinos foram separados em estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner, e fragmentos da porção anterior e posterior do manicoto glandular e dos intestinos médio e posterior foram coletados, fixados em solução de Bouin e Karnovsky e incluídos em parafina e historresina. Durante a metamorfose, ocorreu uma reestruturação de todo o tubo gastroentérico. As porções anterior e posterior do manicoto glandular foram constituídas, originalmente, pelas camadas mucosa (epitélio simples colunar ciliado e glândulas simples tubulosas), muscular e serosa. Após a metamorfose, a porção que iria formar o esôfago passou a ser constituída pela mucosa (epitélio simples colunar ciliado), submucosa, muscular (transverso e longitudinal) e serosa. O estômago possuiu as mesmas camadas do esôfago, sendo a mucosa bastante desenvolvida e formada por epitélio simples colunar, glândulas simples tubulosas e muscular da mucosa. O intestino dos girinos foi composto pela mucosa (epitélio simples colunar em borda de escova, células caliciformes e linfócitos intraepiteliais), fina camada de tecido conjuntivo, muscular e serosa. Depois da metamorfose, o intestino apresentou-se formado pela mucosa, submucosa, muscular e serosa. Esses resultados são consistentes com as mudanças encontradas no sistema digestório das espécies *Xenopus laevis* e *Rana temporaria*.

## **INTRODUÇÃO**

A passagem da fase aquática para a terrestre dos anfíbios é acompanhada por várias mudanças morfológicas e fisiológicas, as quais são denominadas de metamorfose. Nos anfíbios, esta pode ser sintetizada por três grandes alterações: (1) regressão de estruturas e funções utilizadas apenas nos girinos (cauda), (2) transformações de estruturas larvais em estruturas úteis nos adultos (tubo gastroentérico e pele) e (3) desenvolvimento de estruturas e funções que são essenciais apenas nos adultos (membros) (DUELLMAN; TRUEB, 1986; KAWAI et al., 1994; TATA, 1999).

Durante a metamorfose, o tubo gastroentérico sofre uma drástica redução do tamanho com alteração da configuração e topografia na cavidade visceral (CARVER; FRIEDEN, 1977; PRETTY, NAITOH; WASSERSUG, 1995). O estômago, que no girino está situado no lado direito, após a metamorfose passa a se localizar no lado esquerdo, enquanto que o intestino perde a conformação de dupla espiral e reduz o tamanho (PRETTY, NAITOH; WASSERSUG, 1995; RIBEIRO-FILHO, 1997).

Mudanças histolíticas e histogênicas importantes ocorrem no tubo gastroentérico. A mucosa é completamente substituída por um novo epitélio, ocorre a formação da submucosa e a camada muscular passa a ser constituída por duas camadas, uma mais interna circular e outra externa longitudinal (BONNEVILLE, 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; MARSHALL; DIXON, 1978; KALTENBACH; WANG; LIPSON, 1981; ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1987a; HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996). Tais mudanças são ocasionadas por dois importantes processos celulares: primeiramente observa-se apoptose das células do epitélio intestinal do girino, e em seguida, o desenvolvimento do epitélio do intestino do imago através da proliferação e subsequente diferenciação celular (HOURDRY; DAUÇA, 1977; MARSHALL; DIXON, 1978; ISHIZUYA-OKA; UEDA, 1996).

A remodelação do epitélio intestinal é controlada pelos hormônios tireoideanos. Experimentos com imersão do tubo digestório, em solução de tiroxina induziu a formação do estômago, a degeneração do epitélio intestinal do girino, assim como a neoformação do epitélio intestinal do imago (DODD; DODD, 1977; BURGGREN; JUST, 1992). Em *Xenopus laevis*, estudos *in vivo* e *in vitro* têm comprovado a importância destes hormônios na remodelação intestinal (ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1992; SCHREIBER; CAI; BROWN, 2005; ISHIZUYA-OKA; SHI, 2005).

Os estudos da morfogênese do tubo digestório concentram-se nos gêneros *Xenopus* e *Rana* e analisam sempre a mesma região do intestino, próxima à entrada do ducto colédoco. Contudo, as outras regiões do tubo gastroentérico também sofrem remodelações durante a metamorfose e pouca atenção tem sido dada às mesmas (ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1987b; ROVIRA et al., 1995; VILLARO et al., 1998; VILLARO et al., 2001).

Rovira et al. (1995) e Villaro et al. (2001) analisando as mudanças metamórficas que ocorrem no estômago de girinos de *Rana temporaria*, observaram mudanças no tipo celular, nas quais as células oxínticas, produtoras de ácido clorídrico, foram substituídas pelas células oxintopépticas produtoras de ácido clorídrico e pepsina. Observaram também alteração na quantidade de células endócrinas, sendo um número maior nos imagos que nos girinos.

Trabalhos que mostrem a morfogênese do tubo gastroentérico, detalhando as alterações que ocorrem nos diversos segmentos, fornecerá um maior conhecimento das transformações e adaptações pelas quais os anfíbios passam quando mudam do ambiente aquático para terrestre e de uma dieta herbívora para carnívora (DODD; DODD, 1977; DUELLMAN; TRUEB, 1986; BURGGREN; JUST, 1992). Tais conhecimentos permitirão uma maior compreensão da biologia dos girinos e, conseqüentemente, de seu desempenho em cativeiro.

O conhecimento das características anatômicas e histológicas torna-se imprescindível para uma melhor compreensão dos mecanismos de digestão e absorção de nutrientes, e conseqüentemente, para formular rações compatíveis com as necessidades dos girinos, proporcionando um maior aproveitamento dos alimentos a serem oferecidos (SILVA et al., 1994; GALLEGO; RUS, 1987 apud SEIXAS-FILHO et al., 2001). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo descrever histologicamente o desenvolvimento do esôfago, estômago, intestino médio e posterior dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*), durante o desenvolvimento e metamorfose.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *- Classificação dos girinos*

Os girinos foram classificados segundo a tabela de GOSNER (1960), que classifica o desenvolvimento em 46 estágios, e baseia-se nas alterações morfológicas externas que ocorrem nos períodos que compreendem desde a fecundação, eclosão, desenvolvimento dos girinos e metamorfose (Anexo 1).

### *- Animais experimentais*

Os girinos foram cedidos pelo Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP-CAUNESP. Semanalmente realizaram-se coletas dos animais a partir do estágio 25 até 46 (final da metamorfose) e submetidos a um jejum de 24 horas para a limpeza do tubo digestório. Após este período, os girinos foram sacrificados por decapitação e retirados fragmentos do intestino anterior, médio e posterior.

### - Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP).

As amostras foram incluídas em parafina e historresina. Para a inclusão em parafina, as amostras foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas, lavadas em solução alcoólica de etanol a 70% e desidratadas em bateria de etanol em concentrações crescentes (80%, 90% e 100%). Em seguida, foram diafanizadas em Xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes finos com 5µm de espessura em micrótomo, sendo os mesmos posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Shiff (PAS).

Para a inclusão em historresina, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, mantidas em tampão Cacodilato de Sódio (pH 7,4) e incluídas em historresina utilizando-se o "Leica Historesin Embedding Kit", segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Os histomoldes foram mantidos em estufa a 60°C durante 24 horas para a polimerização da historresina. Foram obtidos cortes de 3 a 5 µm de espessura em micrótomo com lâmina de vidro. Os cortes em parafina de esôfago, estômago e intestino foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), e os cortes em historresina com Hematoxilona e Eosina de Lysson (HE-Lysson) ou Giemsa.

## RESULTADOS

Histologicamente, o manicoto glandular dos girinos de *R. catesbeiana* dos estágios 25 ao 41 caracterizou-se por apresentar três camadas: mucosa bastante desenvolvida, fina camada muscular e, mais externamente, serosa. A mucosa constituiu-se por um epitélio simples colunar ciliado (Figuras 1A e 2A-B). Observou-se a lâmina própria com glândulas

tubulares simples constituídas por células cuboidais. Estas glândulas são responsáveis pela produção de muco, que no estômago vai proteger o epitélio da ação do ácido clorídrico. A mucosa, quando corada pela técnica do Ácido Periódico de Schiff (PAS), mostrou nitidamente a produção de muco pelas glândulas tubulares e sua presença na superfície de todo o epitélio (Figuras 2B-C).

No manicoto glandular do girino, abaixo da lâmina própria, percebeu-se uma camada de tecido muscular liso, que na região próxima ao intestino médio (porção posterior) apresentou-se em disposição longitudinal (Figura 2D). Enquanto no estágio 41, a região próxima à faringe (porção anterior) a muscular apresentou-se em duas disposições, uma circular e outra no sentido longitudinal (Figura 2D). Em seguida, visualizou-se a serosa constituída por tecido conjuntivo e células epiteliais pavimentosas (Figura 2D).

Dos estágios 25 ao 41 não ocorreram mudanças histológicas neste órgão. A partir do estágio 42 iniciaram-se as seguintes alterações: perda do limite entre o epitélio e a lâmina própria, assim como da configuração das estruturas glandulares, além de um aumento progressivo da camada muscular (Figura 3A). Nos estágios 43 e 44, a mucosa foi visualizada como uma massa celular indistinta. A submucosa surgiu entre as camadas mucosa e muscular, sendo formada por fibras colágenas e células do tecido conjuntivo. A camada muscular apresentou-se bastante desenvolvida, organizada em duas direções: uma interna circular e uma externa longitudinal (Figuras 3B-C).

No estágio 45 iniciou-se a reestruturação do epitélio do manicoto e a diferenciação em esôfago e estômago. O esôfago, na região observada, passou a ser formado pela camada mucosa constituída pelas células colunares ciliadas, pela submucosa, pela muscular apresentando duas camadas, uma circular interna e outra longitudinal externa, e pela serosa formada por células pavimentosas e tecido conjuntivo (Figura 1B).

O estômago passou a ser constituído por uma mucosa bastante desenvolvida, formada por epitélio colunar simples com glândulas tubulares envoltas de tecido

conjuntivo. Logo abaixo da mucosa, notou-se um feixe de fibras musculares caracterizando a muscular da mucosa e, em seguida, observou-se a submucosa, a muscular longitudinal e circular e a serosa (Figura 3D). No estágio 46, o estômago, apresentou o mesmo padrão descrito anteriormente, porém, a mucosa apresentou-se mais espessa que no estágio anterior (45). Visualizaram-se também as pregas estomacais (Figuras 4A-C). Destacaram-se as seguintes diferenças entre o esôfago e estômago após a metamorfose, a ausência das glândulas tubulares no esôfago e a presença das pregas no estômago.

Os intestinos médio e posterior apresentaram as mesmas características histológicas, sendo compostos pela mucosa, uma fina camada de tecido conjuntivo, pela camada muscular e pela serosa (Figuras 5 e 6A-B). A mucosa apresentou-se composta por epitélio simples colunar ou cilíndrico formando a borda em escova, na sua superfície apical devido às microvilosidades, células glandulares (células caliciformes) e células sanguíneas migratórias (Figuras 6A-B). O tecido conjuntivo mostrou-se bem nítido e formado por fibras colágenas e diversos vasos sanguíneos (Figuras 6A-B). A camada muscular apresentou-se constituída por músculo liso em disposição circular, enquanto a serosa formada por células epiteliais pavimentosas e tecido conjuntivo pouco evidente (Figuras 6A-B).

Assim como no manicoto, as alterações histológicas dos intestinos ocorreram a partir do estágio 42. Neste estágio, visualizou-se a perda da configuração das células colunares e o aumento do número de células intraepiteliais na mucosa. A camada muscular aumentou de espessura passando a possuir duas orientações, uma circular e outra longitudinal (Figuras 7A- B).

No estágio 43, a mucosa apresentou intensa renovação do epitélio que forneceu ao mesmo um falso aspecto de epitélio estratificado. Neste estágio, visualizou-se a presença de inúmeros macrófagos na região epitelial, além do aumento do tecido conjuntivo e muscular (Figuras 8A-B). Nos estágios 44 e 45 houve o estabelecimento do epitélio

simples colunar e o início da formação das vilosidades intestinais (Figuras 9A-B). No estágio 46 o intestino estava completamente formado diferenciado em camadas (mucosa, submucosa, muscular e serosa), com as vilosidades intestinais e células caliciformes evidentes (Figuras 10A-B).

## **DISCUSSÃO**

Os girinos possuem órgãos específicos e adaptados ao ambiente em que vivem e ao hábito alimentar. O manicoto glandular do girino apresenta-se anatômica e histologicamente diferente do estômago do adulto. A mucosa apresenta células colunares ciliadas, cuja principal função é a de auxiliar a passagem do alimento pelo órgão. Como o manicoto do girino possui uma camada muscular muito fina, esta passagem é feita pelos cílios (ROVIRA et al., 1995). A região glandular é representada principalmente pelas células mucosas, as oxínticas (responsáveis pela produção de ácido clorídrico) e as endócrinas (ROVIRA et al., 1995; VILLARO et al., 2001).

No animal pós-metamorfoseado, a mucosa apresentou-se repleta de pregas e criptas. As células ciliadas aparecem apenas na porção anterior do estômago. Nesta fase, o estômago apresentou musculatura bastante desenvolvida e potente, além de glândulas que apresentam as células oxintopépticas, produtoras de ácido clorídrico e pepsinogênio, como encontrado nas aves e peixes. Contudo, estas mesmas células estão ausentes nos girinos (ROVIRA et al., 1995; VILLARO et al., 2001).

Comparando os intestinos dos girinos com os de adultos, as alterações metamórficas são bastante diferentes. Enquanto nos girinos a parede do intestino é delgada, apresentando uma camada de células colunares repletas de microvilos e uma pequena porção de tecidos conjuntivo e muscular, no animal pós-metamorfoseado as camadas mucosa, submucosa e muscular são bastante desenvolvidas. As células colunares vão se

elevando e formando dobras longitudinais providas de microvilos, mais curtos do que os encontrados nos girinos, além de uma muscular mais desenvolvida (BONNEVILLE 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970).

As mudanças histológicas encontradas no epitélio do tubo digestório durante a metamorfose dos girinos de *R. catesbeiana*, no presente estudo, são basicamente consistentes com as mudanças encontradas no estômago de *Rana temporaria* (ROVIRA et al., 1995; VILLARO et al. 2001) e intestino de *Xenopus laevis* (BONNEVILLE, 1963; BONNEVILLE; WEINSTOCK, 1970; MARSHALL; DIXON, 1978; ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1987a; 1987b). Entretanto, os estágios em que elas ocorrem diferem entre si. Em *X. laevis* e *R. temporaria*, as mudanças histológicas no sistema digestório ocorrem no estágio 40 (GOSNER 1960), enquanto que no presente trabalho, tais alterações ocorreram a partir do estágio 42 (GOSNER 1960) com o clímax metamórfico.

O clímax metamórfico é caracterizado por um aumento na produção de hormônios tireoideanos (Triiodotironina -  $T_3$  e Tiroxina -  $T_4$ ) (ETKIN, 1968). Os hormônios tireoideanos são de extrema importância no processo de metamorfose, pois os mesmos são os promotores da maioria das alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas do intestino (DODD; DODD, 1977; BURGGREN; JUST, 1992; TATA, 1999).

A concentração de hormônios tireoideanos durante o desenvolvimento e metamorfose varia entre as espécies. *R. pipiens*, *R. clamitans* e *X. laevis* apresentam concentrações séricas a partir do estágio 30 (GOSNER 1960), enquanto em *R. catesbeiana* a partir do estágio 40 (GOSNER, 1960).

Como citado anteriormente, as diferenças no tempo em que ocorrem as mudanças metamórficas do tubo digestório entre *X. laevis*, *R. temporaria* e *R. catesbeiana* podem estar relacionadas com a presença dos hormônios tireoideanos nos estágios iniciais do desenvolvimento. Tais hormônios podem estar acelerando a metamorfose do tubo digestório das espécies *X. laevis* e *R. temporaria*. O mesmo não ocorre com *R. catesbeiana*

em que a presença dos hormônios tireoideanos só será detectável próximo ao período da metamorfose.

Morfológica e fisiologicamente as necessidades de herbívoros e carnívoros são bastante diferentes, animais herbívoros e onívoros possuem uma dieta rica em matéria vegetal e carboidratos, enquanto os carnívoros consomem muita proteína de origem animal (NOBLE, 1954; BÉRTIN, 1958). As mudanças ocorridas no tubo digestório dos girinos de *R. catesbeiana*, no presente trabalho, refletem as mudanças no hábito alimentar de girino onívoro para adulto carnívoro.

Girinos onívoros possuem um estômago pouco desenvolvido e um longo intestino para digerir e absorver os nutrientes de origem vegetal, enquanto adultos carnívoros necessitam de um estômago elástico bem desenvolvido capaz de produzir enzimas, e um intestino curto repleto de vilosidade para a digestão e absorção dos nutrientes de sua dieta (NOBLE, 1954; BURGGREN; JUST, 1992; VIERTTEL; RICHTER, 1999).

## CONCLUSÃO

Girinos e adultos de *R. catesbeiana* possuem o tubo digestório morfológicamente diferentes, durante a metamorfose. Basicamente, as mudanças histológicas observadas compreendem uma reestruturação da mucosa com processos degenerativos e regenerativos e, ao mesmo tempo, um crescimento dos tecidos conjuntivo e muscular por diferenciação celular, levando à formação de um estômago repleto de pregas e criptas e à formação das vilosidades intestinais. Além disso, tais alterações estão correspondendo às modificações anatômicas ocorridas e observadas durante o desenvolvimento.

**Figura 1.** Fotomicrografias da região próxima a faringe do manicoto glandular do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 41** - mucosa com células colunares ciliadas (CC), glândulas tubulares (GT) e camada muscular (Mu). HE - Lysson

**B: Estágio 46** - formação das camadas do esôfago: mucosa com células epiteliais colunares (CC), submucosa (SM), muscular (Mu) e serosa (seta); corte longitudinal. HE - Lysson.

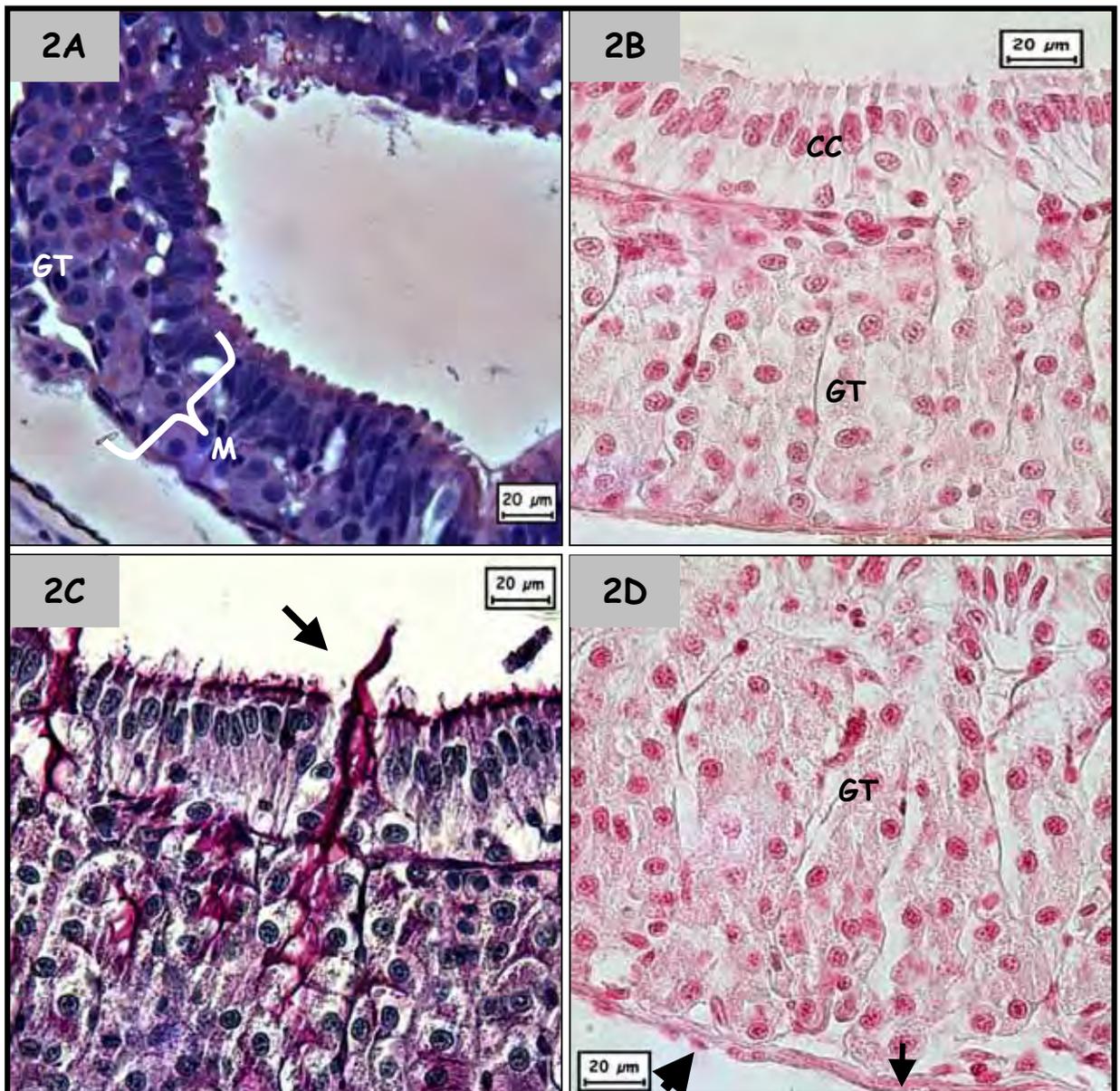
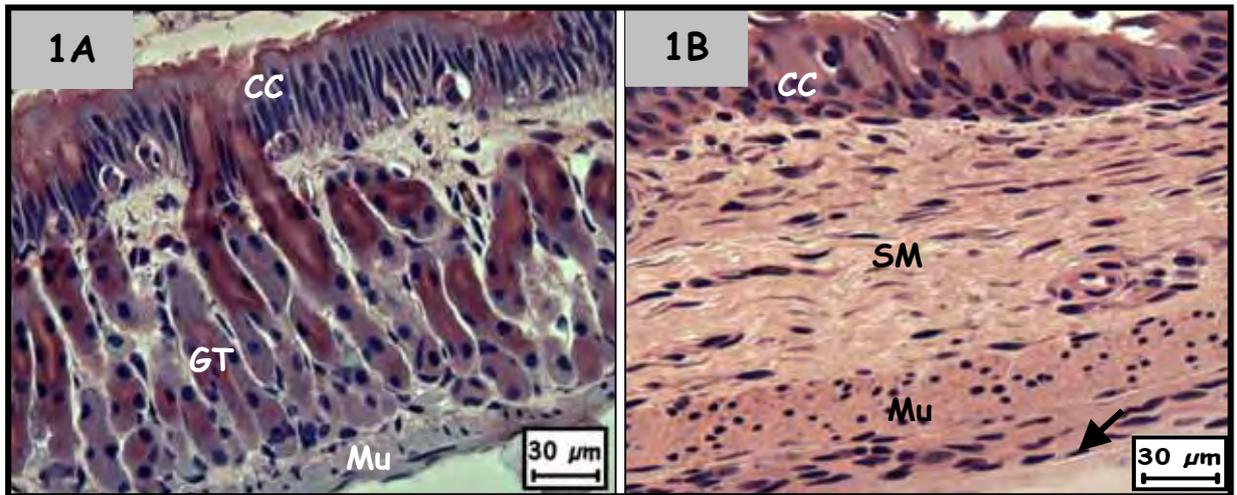
**Figura 2.** Fotomicrografias da região próxima ao intestino médio do manicoto glandular do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - mucosa (M); glândulas tubulosas (GT). HE - Lysson.

**B: Estágio 28** - detalhe da mucosa: células colunares ciliadas (CC) e glândulas tubulares (GT). HE.

**C: Estágio 28** - detalhe da mucosa: secreção das glândulas tubulares entre as células colunares (seta). PAS.

**D: Estágio 35** - detalhe da camada muscular formada por fibras musculares em disposição longitudinal (seta fina). Camada serosa formada por tecido conjuntivo e células pavimentosas (seta grossa); glândulas tubulares (GT). HE.



**Figura 3.** Fotomicrografias do estômago do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 42** - perda do limite entre o epitélio e lâmina própria; desconfiguração das glândulas tubulares (GT), células colunares (CC), camada muscular (Mu). PAS.

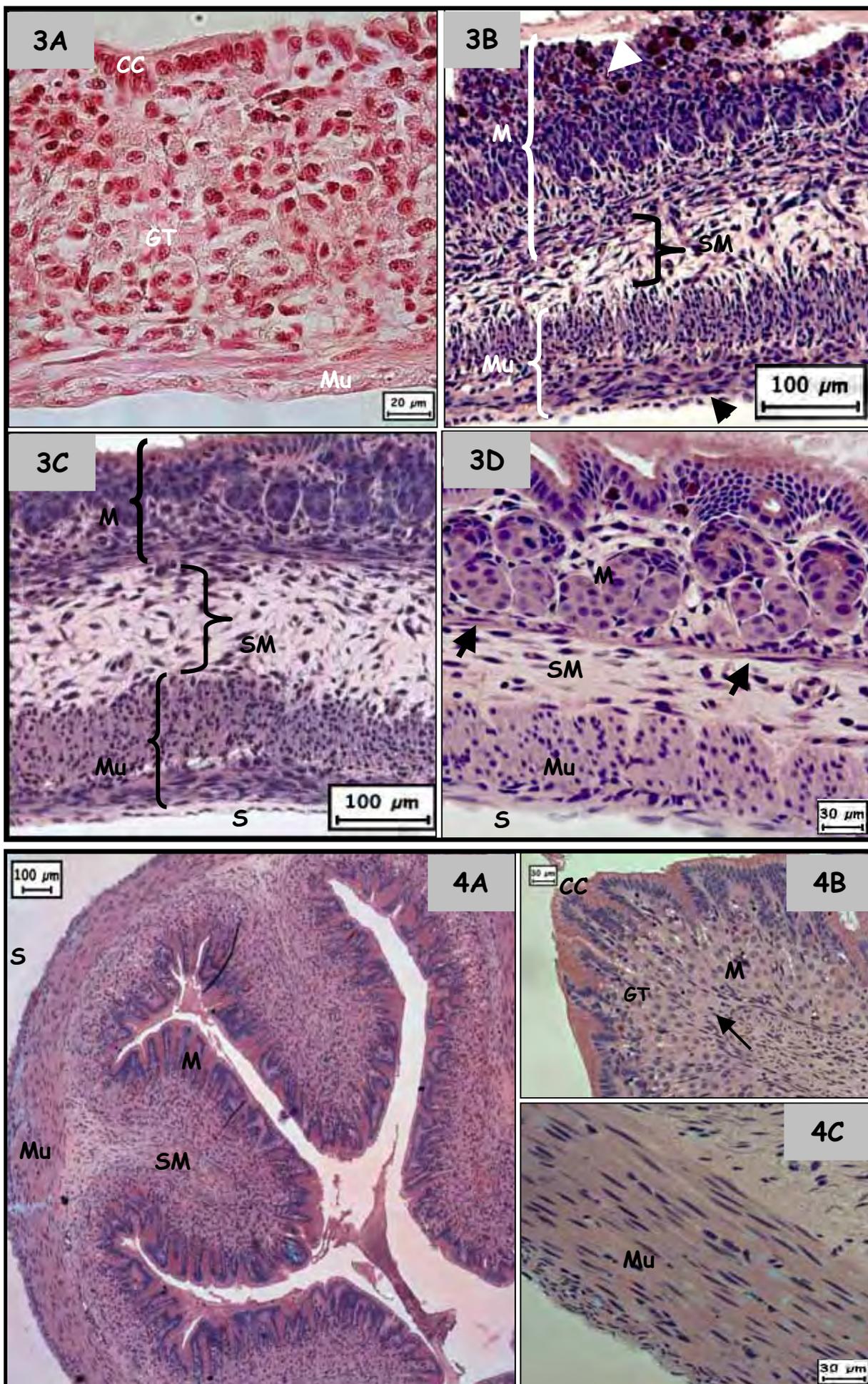
**B: Estágio 43** - mucosa (M) com desarranjo das células de revestimento e glandulares; presença de diversas células migratórias na superfície do epitélio (ponta de seta); desenvolvimento da camada muscular (Mu); formação da submucosa (SM); serosa (seta). PAS.

**C: Estágio 44** - em formação as quatro camadas do estômago: mucosa (M), submucosa (SM), muscular (Mu) e serosa (S). HE - Lysson.

**D: Estágio 45** - quatro camadas distintas do estômago: mucosa (M) com a muscular da mucosa (seta), submucosa (SM), muscular (Mu) e serosa (S). HE - Lysson.

**Figura 4.** Fotomicrografias do estômago do imago de *R. catesbeiana*.

**Estágio 46 - A:** as quatro camadas formadoras do estômago: mucosa (M) bastante desenvolvida com as células epiteliais colunares (CC), glândulas tubulosas (GT) e muscular da mucosa (seta); submucosa (SM); muscular (Mu) e serosa (S). HE - Lysson. **B:** detalhe da camada mucosa. (HE). **C:** detalhe da muscular; corte transversal. (HE).



**Figura 5.** Fotomicrografia dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

**Estágio 25.** HE - Lysson.

**Figura 6.** Fotomicrografias dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

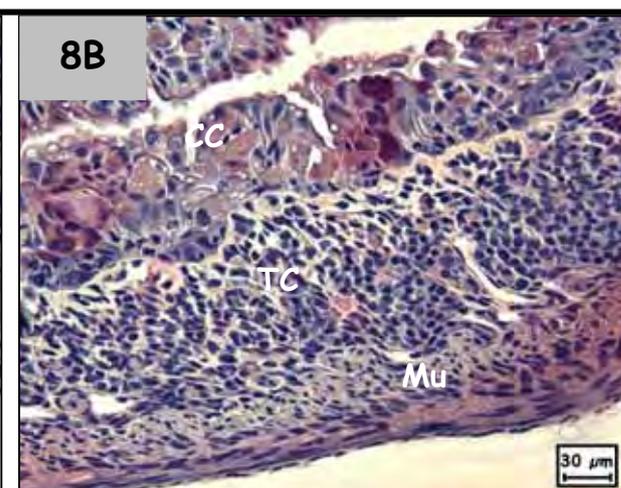
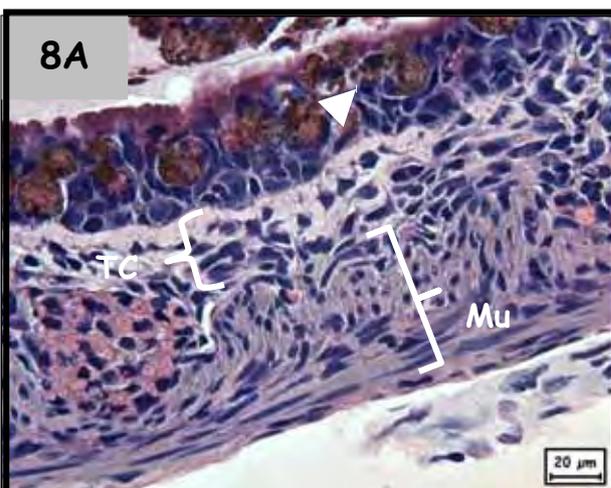
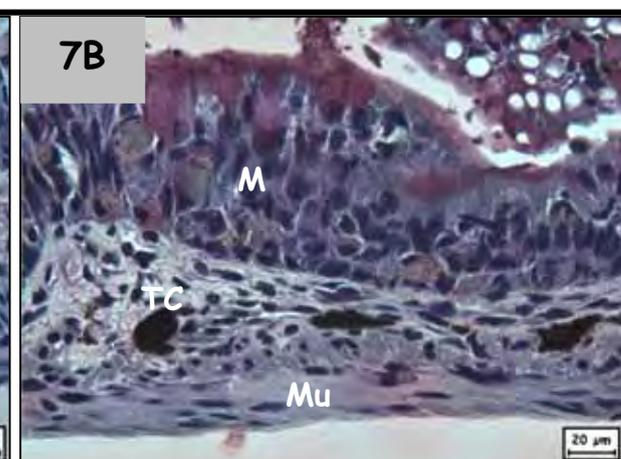
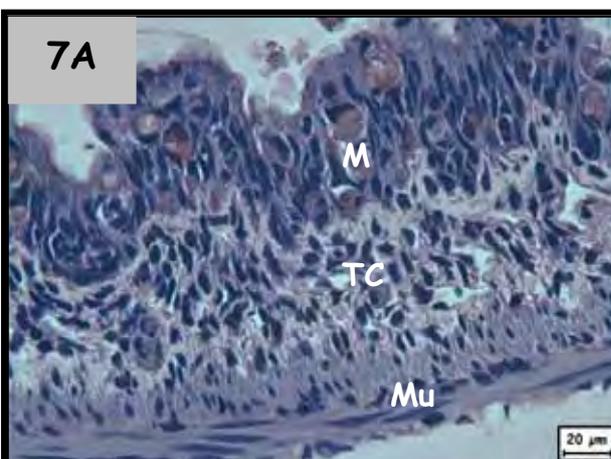
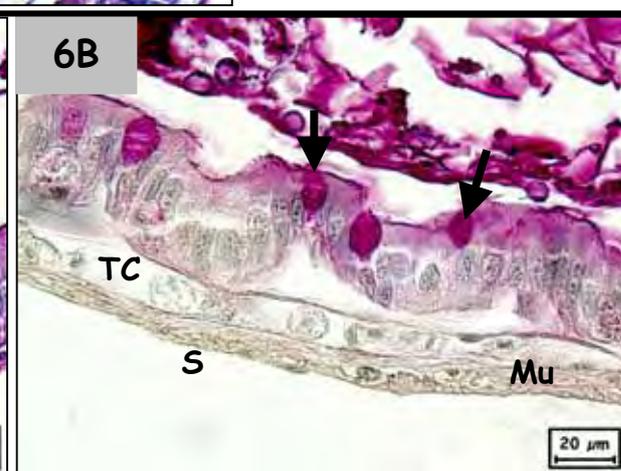
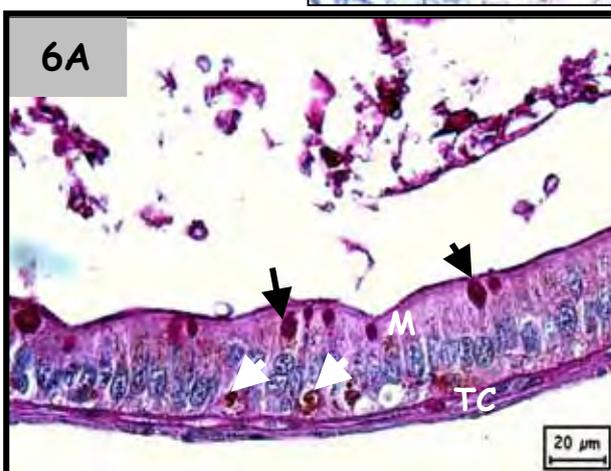
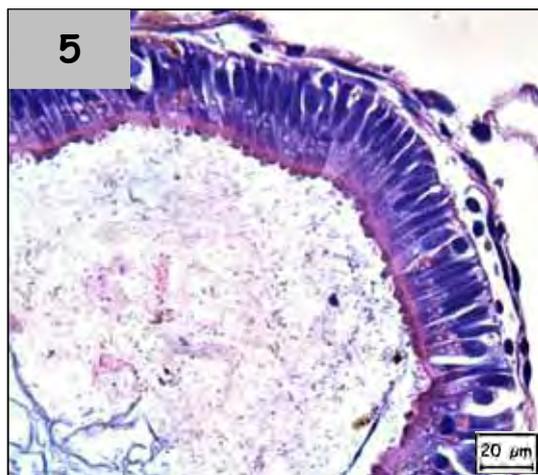
**A: Estágio 30** - intestino médio e **B: Estágio 37** - intestino posterior. Mucosa (M) com células epiteliais colunares com borda em escova, células caliciformes (seta preta) e células sanguíneas migratórias (seta branca); submucosa constituída de tecido conjuntivo com a presença de diversos vasos sanguíneos (TC); camada muscular (Mu) e serosa (S). PAS.

**Figura 7.** Fotomicrografias dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

**Estágio 42** - **A:** intestino médio. **B:** intestino posterior. Mucosa (M) com perda da configuração das células colunares, aumento discreto do tecido conjuntivo (TC) e muscular (Mu). HE - Lysson.

**Figura 8.** Fotomicrografias dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

**Estágio 44** - **A:** intestino médio. **B:** intestino posterior. Perda completa da configuração das células colunares (CC); presença de macrofágos (seta); aumento dos tecidos conjuntivo (TC) e muscular (M). HE - Lysson.

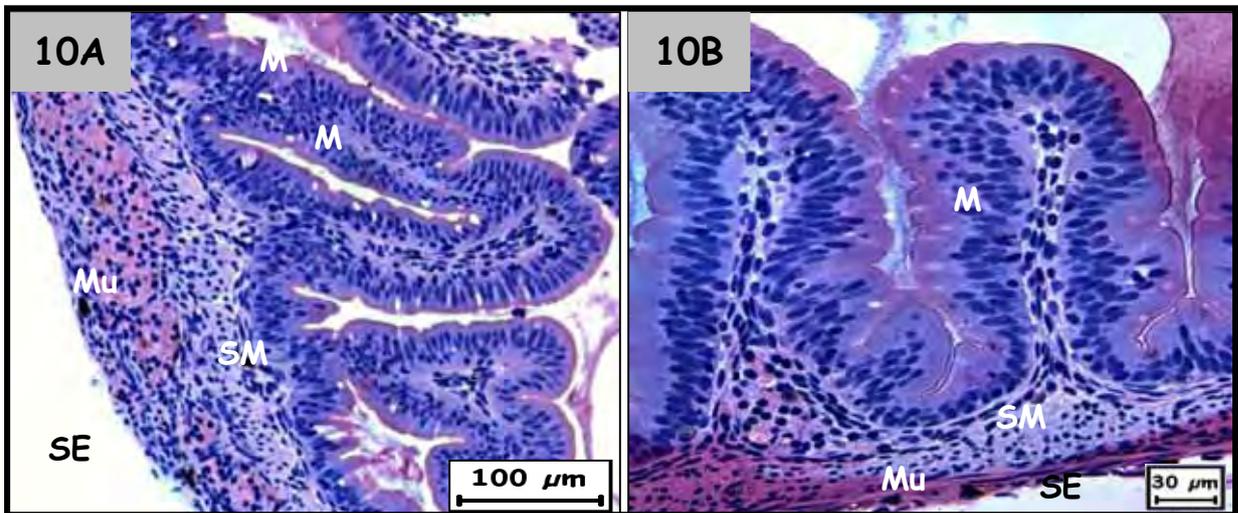
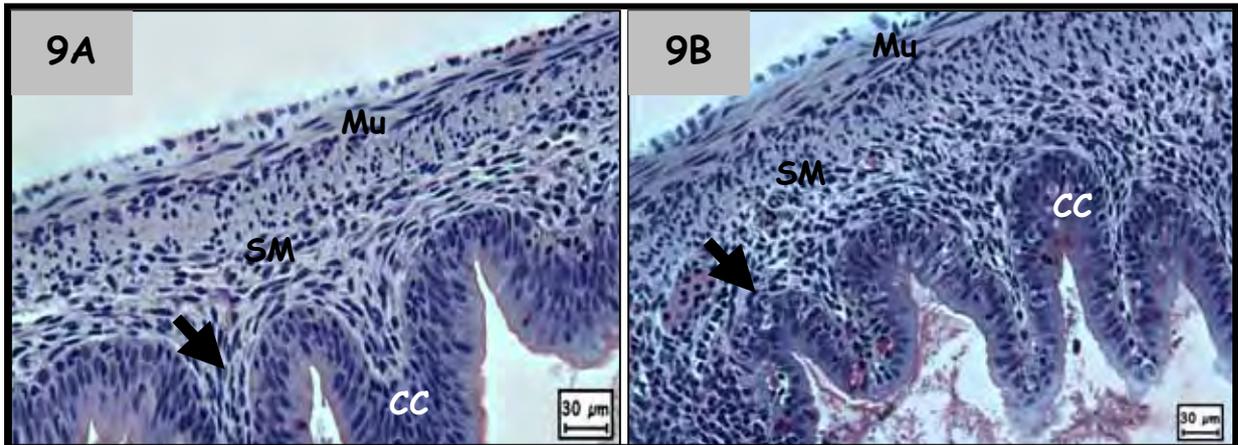


**Figura 9.** Fotomicrografias dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

**Estágio 45 - A:** intestino médio. **B:** intestino posterior. Início da formação do epitélio colunar. Formação das vilosidades intestinais (seta); células colunares (CC); submucosa (SM); muscular (Mu). HE - Lysson.

**Figura 10.** Fotomicrografias dos intestinos do girino de *R. catesbeiana*.

**Estágio 46 - A:** intestino médio. **B:** intestino posterior. Vilosidades intestinais; camadas: mucosa (M), submucosa (SM), muscular (Mu) e serosa (S). HE - Lysson.



**REFERÊNCIAS**

BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.) **Traité de zoologie**. Paris: Masson, v.13, p.1249-1301, 1958.

BONNEVILLE, M. A. Fine structural changes in the intestinal epithelium of the bullfrog during metamorphosis. Boston. **The Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v.18, p. 579-597, 1963.

BONNEVILLE, M.A.; WEINSTOCK, M. Brush border development in the intestinal absorptive cells of *Xenopus* during metamorphosis. **The Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v.44, p. 151-171, 1970.

BURGGREN, W. W.; JUST, J. J. Developmental changes in physiological systems. In M. E. Feder and W. W. Burggren, eds **Environmental physiology of the Amphibians**. University of Chicago Press, Chicago, p.467-530, 1992.

CARVER, V. H.; FRIEDEN, E. Gut regression during spontaneous and triiodothyronine induced metamorphosis in *Rana catesbeiana* tadpoles. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.31 (2), p.202-207, 1977.

DODD, M. H. I.; DODD, J. M. The biology of metamorphosis. In: **Physiology of Amphibia**. v.3 (ed. B. Lofts), p.467-599. Academic Press, New York, 1977.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, NY, New York, 1986. 670 p.

ETKIN, W. In: **Metamorphosis. A problem in development biology**. Ed. By W. Etkin and L. T. Gilbert. Appleton – Century – Crofts, New York, p.313-348, 1968.

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

HOURDRY, J.; L'HERMITE, A.; FERRAND, R. Changes in the Digestive Tract and Feeding Behavior of Anuran Amphibians during Metamorphosis. **Physiological Zoology**, Chicago, v.69 (2), p.219-251, 1996.

HOURDRY, J.; DAUÇA, M. Cytological and cytochemical changes in the intestinal epithelium during anuran metamorphosis. **International review of cytology**, New York, v.5 (suppl.), p.337-385, 1977.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHI, Y. Molecular mechanisms for thyroid hormone induced remodeling in the amphibian digestive tract: A model for studying organ regeneration. **Development Growth Differentiation**, Nagoya, v.47, p.601-607, 2005.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHIMOZAWA, A. Development of the Connective Tissue in the Digestive Tract of the Larval and Metamorphosing *Xenopus laevis*. **Anatomischer Anzeiger**, Jena, v.164, p.81-93, 1987a.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHIMOZAWA, A. Ultrastructural changes in the intestinal tissue of *Xenopus laevis* during metamorphosis. **Journal of Morphology**, New York, v.193, p.13-22, 1987b.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHIMOZAWA, A. Connective tissue is involved in adult epithelial development of the small intestine during anuran metamorphosis *in vitro*. **Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, v.201, p.322-329, 1992.

ISHIZUYA-OKA, A.; UEDA, S. Apoptosis and cell proliferation in the *Xenopus* small intestine during metamorphosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 286, p. 467-476, 1996.

KALTENBACH, J.C.; WANG, C.H.K.; LIPSON, M. J., Histochemical Study of the Amphibian Digestive Tract during Normal and Thyroxine Induced Metamorphosis 2 Acid-Phosphatase. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v.216(2), p.247-259, 1981.

KAWAI, A.; IKEYA, J.; KINOSHITA, T.; YOSHIZATO, K. A Three- Step Mechanism of Action of Thyroid Hormone and Mesenchyme in Metamorphic changes in Anuran Larval Skin. **Developmental Biology**, San Diego, v.166, p.477-488, 1994.

MARSHALL, J.A.; DIXON, K. E. Cell specialization in the epithelium of the small intestine of feeding *Xenopus laevis* tadpoles. **Journal of Anatomy**, London, v. 126 (1), p. 133-144, 1978.

NOBLE, G. K. The digestive system. In: **The Biology the Amphibian**. Ed. G. K. Noble. New York. Dover Publication Inc. Chapter IX. p.201-211, 577p. 1954.

PRETTY, R.; NAITOH, T.; WASSERSUG, R. J. Metamorphic shortening of the alimentary-tract in anuran larvae (*Rana catesbeiana*), **Anatomical Record**, New York, v.242(3), p.417-423, 1995.

RIBEIRO-FILHO, O. P. Anatomia-fisiologia do aparelho digestório de girino. **IX ENAR & TECNOFROG 97**. Santos, São Paulo, p.85-93. 1997.

ROVIRA, J.; VILLARO, A. C.; BODEGAS, M. E.; VALVERDE, E.; SESMA, P. Metamorphic changes in the stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles. **Tissue & Cell**, Essex, v.27(1), p.13-22, 1995.

SCHEREIBER, A. M.; CAI, L; BROWN, D. D. Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.72, p.3720-3725, 2005.

SEIXAS-FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia Funcional e Morfometria do Intestino no Teleostei (Pisces) de Água Doce Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz, 1829), **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30(6), p.1670-1680, 2001.

SILVA, J. M. F.; SEIXAS-FILHO, J. C. C.; BRAGA, L. G. T.; STÉFANI, M. V.; VEIGA, N.; BARBALHO, O. J. M.; ALBINATTI, R. C. B.; MELLO, S. C. R. P. Grupo III. Nutrição In: **Diagnóstico da Ranicultura: Problemas, Propostas de Soluções e Pesquisas Prioritárias**. Ed. Samuel L. Lima, Mário R.C. Figueredo e Onofre M. de Moura. Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura (ABETRA). Viçosa, p.31-39, 1994.

TATA, Jr. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. **Biochimie**, Paris, v.81(4), p.359-366, 1999.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: Viscera and Endocrines. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago Press. Chicago, p.92-148, 1999.

VILLARO, A. C.; ROVIRA, J.; BODEGAS, M. E.; BURREL, M. A.; GARCÍA-ROS, D.; SESMA, P. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of endocrine cells in the larval stomach of the frog *Rana temporaria* tadpoles: a comparison with adult specimens. **Tissue & Cell**, Essex, v.33 (5), p. 462-477, 2001.

VILLARO, A. C.; ROVIRA, J.; BODEGAS, M. E.; BURREL, M. A.; SESMA, P. Relationship between epithelial and connective tissues in the stomach of the frog *Rana temporaria* during metamorphosis: an ultrastructural study. **Tissue & Cell**, Essex, v.30 (4), p.427-445. 1998.

## *CAPÍTULO V*

---

**Morfologia e enzimologia do pâncreas e fígado dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose**

**RESUMO**

O fígado e o pâncreas são glândulas anexas ao sistema digestório. Durante o processo de metamorfose, tais órgãos sofrem alterações citológicas, histológicas e bioquímicas decorrentes da mudança do hábito alimentar do girino onívoro para o adulto carnívoro. Este trabalho teve como objetivo descrever histologicamente o desenvolvimento do fígado e pâncreas e o perfil da atividade da amilase e tripsina pancreática do girino da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o seu desenvolvimento e metamorfose. As análises foram conduzidas no setor de Ranicultura do CAUNESP-UNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP. Os girinos foram separados em estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner. Fragmentos do fígado e pâncreas foram coletados e fixados em solução de Bouin e Karnovsky, sendo que o processamento e a inclusão das amostras em parafina e historresina foram realizados de acordo com a metodologia do Laboratório de Histologia. Para as análises enzimológicas, os pâncreas foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em “freezer” a -70°C. Os pâncreas foram homogeneizados, separadamente, em tampão Tris – HCl (pH 7,4) e aliqüotados para posterior análise da atividade enzimática de acordo com o protocolo do Laboratório de Enzimologia Aplicada. Durante a metamorfose, o fígado não apresentou grandes mudanças em seu parênquima. Observou-se uma aparente diminuição de vacúolos de lipídios no interior dos hepatócitos. Tal fato pode estar associado com as alterações no metabolismo hepático ocorridas durante a metamorfose. O pâncreas, ao contrário do fígado, apresentou intensas mudanças em seu parênquima durante a metamorfose. As células exócrinas mostraram um processo de morte celular, levando a uma degeneração do tecido acinar. A atividade tanto da amilase como da

tripsina apresentou um aumento a partir do estágio 35, ocorrendo um declínio da mesma no período da metamorfose. As mudanças morfológicas e enzimáticas podem estar relacionadas com a mudança de hábito alimentar de onívoro para carnívoro.

## INTRODUÇÃO

A passagem da fase aquática para a terrestre nos anfíbios é acompanhada por várias mudanças morfológicas e fisiológicas que, em conjunto, são denominadas de metamorfose. Durante a metamorfose, o sistema digestório e glândulas anexas dos girinos sofrem uma intensa transformação (VIERTEL; RICHTER, 1999). Nos girinos de *Rana catesbeiana* observa-se uma redução no comprimento relativo ao tubo digestório e no peso das glândulas (NAKAGHI et al., 2006). Estas transformações indicam a mudança de hábito alimentar de herbívoro para carnívoro e são acompanhadas por mudanças morfológicas e funcionais que ocorrem no tubo digestório, pâncreas e fígado. (HOURDRY; L'HERMITE; FERRAND, 1996; VIERTEL; RICHTER, 1999).

O pâncreas é uma glândula mista de funções exócrinas e endócrinas. O tecido exócrino é composto pelas células acinares ricas em grânulos de zimogênios, responsáveis pela produção das enzimas pancreáticas. Tais enzimas degradam proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos durante o processo de digestão luminal. As enzimas proteolíticas são secretadas na forma inativa. Esse mecanismo impede a autodigestão do pâncreas (GARTNER; HIATT, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido endócrino do pâncreas consiste de células isoladas e de ilhotas arredondadas de vários tamanhos, espalhadas através do tecido exócrino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Nos girinos, pelo menos três tipos de células endócrinas podem ser distinguidas, as células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\Delta$ , diferenciando-se pela forma, tamanho e eletrodensidade de seus grânulos

secretores, e por sua imunorreatividade a diferentes anticorpos e por colorações especiais (ACCORDI; BRACCI; VENTOLA, 1998).

Resultados obtidos por imunofluorescência e imunohistoquímica sugerem que as células  $\alpha$  sintetizam e acumulam um hormônio hiperglicemiante, o glucagon; as células  $\beta$ , um hormônio hipoglicemiante, a insulina e a células  $\Delta$  produzem a somatostatina, um hormônio que possui uma ampla variedade de efeitos sobre a função gastrointestinal além de possuir uma ação inibidora sobre a secreção de insulina e glucagon (ACCORDI; BRACCI; VENTOLA, 1998; YOUNG; HEATH, 2001)

O pâncreas sofre acentuada mudança morfológica durante a metamorfose. Ocorre diminuição do volume em torno de 80 a 85 % devido aos processos degenerativos que afetam principalmente o tecido acinar. A histólise do tecido pancreático ocorre principalmente por autólise e apoptose sendo que as células degeneradas são eliminadas pelos ductos pancreáticos ou fagocitadas por macrófagos (LEONE et al., 1976; MILANO; CHIMENTI, 1995). Regulando as alterações metamórficas, pode-se citar a tiroxina como o fator apoptótico responsável pela degeneração pancreática, a inanição no clímax metamórfico ou a presença de enzimas degradativas (KAUNG, 1983; MILANO; CHIMENTI, 1995; ACCORDI; CHIMENTI, 2001). Logo após a metamorfose, os tecidos acinar e endócrino iniciam um processo de reorganização no pâncreas através da histogênese do tecido acinar e da proliferação do tecido endócrino (LEONE et al., 1976; MILANO; CHIMENTI, 1995).

As transformações morfológicas do pâncreas também estão associadas às mudanças no perfil das enzimas digestivas durante o desenvolvimento e metamorfose. Estudos com *Xenopus laevis* mostrou que a atividade da amilase decresce gradualmente durante o desenvolvimento até a metamorfose, enquanto que o mesmo não ocorre com a lipase. Esta possui uma atividade crescente durante o desenvolvimento, enquanto que na metamorfose ocorre uma queda abrupta de sua síntese (LEONE et al., 1976). A diminuição da atividade

tanto da amilase como da lipase no período da metamorfose está relacionada diretamente com a remodelação tecidual que o pâncreas sofre durante este período (LEONE et al., 1976). Não há estudos que relacionem quantitativamente a atividade da tripsina com o desenvolvimento e metamorfose.

O fígado é a maior glândula do sistema digestório, ocupando uma grande parte da cavidade visceral. Histologicamente é composto pelos hepatócitos, células de Kupffer e sinusóides, e possui múltipla função: excreta produtos de degradação, secreta bile, armazena lipídios e glicogênio, sintetiza globulinas e albumina, esterifica ácidos graxos livres para triglicerídios, participa da hemocitopoese e do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras (NOBLE, 1954; DELLMANN; BROWN, 1982).

Nos girinos, nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, os hepatócitos apresentam-se arranjados em forma de cordões, ricos em vitelo e lipídios e, com o passar do tempo, observa-se um aumento dos hepatócitos e desaparecimento do vitelo (VIERTEL; RICHTER, 1999). Durante a metamorfose, não se observa mudança histológica no parênquima hepático. Contudo, ocorrem mudanças citológicas nos hepatócitos neste período. Tata (1971) observou alterações na forma do retículo endoplasmático rugoso (RER) e das mitocôndrias. Dauça et al. (1983) verificaram alteração na eletrondensidade dos peroxissomas e microperoxissomas.

Durante a metamorfose as modificações que ocorrem no fígado estão associadas principalmente às alterações bioquímicas. Destas podem-se incluir aumento na produção de albumina e ceruloplasmina (TATA, 1999), alteração da hemoglobina (THEIL, 1973), das enzimas do ciclo da uréia (BROWN; BROWN; COHEN, 1959), aumento da síntese de DNA e RNA (PAIK; METZENBERG; COHEN, 1961).

Tanto o pâncreas como o fígado são órgãos de vital importância nos mecanismos de nutrição dos girinos, pois atuam diretamente na produção de enzimas digestivas e no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Neste contexto, este trabalho teve como

objetivo descrever histologicamente o desenvolvimento do pâncreas e fígado dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) e correlacionar com o perfil das enzimas tripsina e amilase durante o desenvolvimento e metamorfose, visando fornecer subsídios para sua nutrição.

## MATERIAL E MÉTODOS

### - *Animais experimentais*

Os girinos foram cedidos pelo Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP e provenientes de desova induzida. Os animais foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros e a densidade de um girino por litro de água (1:1). A temperatura máxima da água foi de  $28,6 \pm 1,6$ , enquanto a mínima foi de  $26,0 \pm 0,8$ . Duas vezes na semana realizaram-se as coletas dos girinos, que foram separados em estágios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner (1960) (Anexo 1). Após a coleta, os mesmos foram submetidos a um jejum de 24 horas em aquários especiais com a capacidade de 15 litros, que impedia a coprofagia.

### - *Análise histológica*

As análises foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP).

Utilizou-se girinos dos estágios 25 ao 46, os quais foram anestesiados em água com gelo a 4°C, pesados, sacrificados sendo, em seguida, retirados fragmentos do fígado e pâncreas que foram incluídos em parafina e historresina.

As amostras incluídas em parafina foram fixadas em solução de Boiun por 24 horas, lavadas em solução de etanol a 70% e desidratadas em bateria de etanol em concentrações crescentes (80%, 90% e 100%). Em seguida, as mesmas foram diafanizadas em Xilol,

infiltradas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes finos com 5 µm de espessura em micrótomo, e os mesmos posteriormente foram montados em lâminas e estas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Shiff (PAS).

Para a inclusão em historresina, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, mantidas em tampão Cacodilato de Sódio (pH 7,4) e incluídas nos histomoldes com historresina utilizando-se o "Leica Historesin Embedding Kit", segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

Os histomoldes foram mantidos em estufa a 60°C durante 24 horas para a polimerização da historresina. Foram obtidos cortes de 3 a 5 µm de espessura em micrótomo com lâmina de vidro. Os cortes em parafina de fígado foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e os cortes em historresina com Hematoxilina e Eosina de Lysson (HE-Lysson). Os cortes incluídos em historresina do pâncreas foram corados com Giemsa, para uma melhor diferenciação das células endócrinas (DÍAZ DE RADA et al., 1986).

#### *Análises enzimáticas*

As análises foram conduzidas no Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP).

#### *- Obtenção dos extratos enzimáticos*

Para a obtenção dos extratos de pâncreas foram utilizados 100 animais de cada estágio de desenvolvimento. Os animais foram anestesiados em água com gelo a 4°C, sacrificados e, em seguida, o pâncreas foi retirado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C.

Após o descongelamento, os tecidos pancreáticos foram homogeneizados no

homogeneizador OMNI GLH – 2511, em tampão Tris-HCl pH 7,5 contendo  $\text{CaCl}_2$  50 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi aliqotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C. Posteriormente, o mesmo foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas e da quantidade de proteína presente no extrato.

– *Determinação da atividade da amilase pancreática*

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada a 37°C, através da dosagem de maltose liberada a partir da hidrólise do amido (substrato) pela enzima presente no extrato pancreático.

As condições-padrão dos ensaios foram: tampão fosfato (20 mM, pH 6,9) contendo NaCl 7 mM, amido solúvel a 1%, em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição do substrato ao meio da reação e interrompida pela adição de 1mL da solução contendo 1% de ácido 3,5-dinitrosalisílico, 8% de NaOH e 30 % de tartarato duplo de sódio e potássio. Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas em banho-maria em ebulição por cinco minutos, resfriadas e diluídas em 10mL de água destilada. A absorvância foi determinada a 530 nm.

A reta padrão para determinação da maltose incluiu os padrões 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0 mg de maltose/mL de solução. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) da  $\alpha$  – amilase pancreática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de maltose/minuto nas condições padrões do teste.

– *Determinação da atividade da tripsina pancreática*

Primeiramente, foi efetuada a ativação do zimogênio em tampão Tris-HCl 0,5 M contendo  $\text{CaCl}_2$  (50mM, pH 8,0). Cada dosagem de 0,4 mL do extrato pancreático foi incubada com 0,08 unidades de enteroquinase (SIGMA®) à 37°C por 20 minutos. O meio

de reação obtido foi utilizado para determinação da atividade da tripsina.

A atividade da tripsina foi determinada a 37°C, através da quantificação da p-nitroanilida liberada. A reação foi sempre iniciada pela adição de 1 mL do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA®) ao extrato ativado, contendo tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0) e CaCl<sub>2</sub> 50mM. Em tempos pré-estabelecidos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v). Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410 nm.

Uma unidade (U/mg) de enzima foi definida como sendo 1nmol de p-nitroanilida liberada por minuto nas condições do teste.

#### *- Dosagem de proteína*

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Hartree (1972), usando soroalbumina bovina fração V como padrão.

#### *- Análise estatística*

Para avaliar as diferenças nos perfis da atividade da amilase e tripsina entre os estágios de desenvolvimento, foram realizados os testes de homogeneidade de variância (Levene) e de normalidade dos erros (Cramer-von Mises). Para os dados cuja a premissa da homogeneidade das variâncias não foi verificada, foram realizadas transformações apropriadas nos dados e, em seguida, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Utilizou-se o programa “SAS system” versão 9.0.

## RESULTADOS

### *Histologia do fígado e pâncreas*

O fígado dos girinos constituiu-se de parênquima formado por hepatócitos, que são células poligonais de núcleo arredondado, com disposição quase sempre excêntrica, formando cordões de células em arranjos concêntricos. Este órgão possui cápsula de tecido conjuntivo sem lobulações distintas e sem espaço-porta típico. Além disso, apresentou-se bastante vascularizado, com capilares contendo hemácias (Figuras 1A-D).

No estágio 25 os hepatócitos apresentaram arranjos em fileiras com citoplasma repleto de vacúolos de lipídios. Visualizou-se o parênquima hepático com vários espaços ocupados por sinusóides repletos de hemácias e células de Kupffer (melanomacrófago) (Figura 1A).

No estágio 40, notou-se o parênquima hepático com aparência mais compacta e os hepatócitos formando um arranjo de cordões concêntricos com grande quantidade de capilares entre os cordões (Figura 1B). A partir do estágio 42 até o 45, notou-se uma aparente diminuição dos vacúolos de lipídios nos hepatócitos, e a presença freqüente de melanomacrófagos (Figuras 1C-D).

A vesícula biliar não sofreu nenhum processo de reestruturação tecidual, permanecendo com as mesmas características durante todo o desenvolvimento. Este órgão apresentou-se revestido por epitélio simples colunar, com microvilos em sua camada mucosa, seguido por camada de tecido fibromuscular e serosa (Figuras 2A-B).

O pâncreas é a segunda glândula anexa ao sistema digestório e é formado pelos tecidos exócrinos, composto pelas células acinares, e endócrino, formado pelas ilhotas de Langerhans encontradas próximas a vasos sanguíneos (células  $\beta$ ) e pelas células  $\alpha$  e células  $\Delta$  distribuídas pelo tecido exócrino.

Dos estágios 25 ao 41 não foram observadas alterações na estrutura pancreática. O

tecido exócrino teve afinidade intensa pelo corante básico Giemsa, mostrando-se formado por células piramidais com núcleos esféricos localizados próximos à base das células. A região apical das células continha grânulos de zimogênio (Figuras 3A-B). No tecido endócrino, as células  $\alpha$  mostraram-se arredondadas, com citoplasma de cor rosa-azulado e núcleo central, enquanto que as células  $\beta$ , por terem baixa afinidade pelo corante, tinham cor azul pálido e forma colunar. As células  $\Delta$  foram identificadas pela coloração púrpura do seu citoplasma (Figuras 3A-B).

A partir do estágio 42, mudanças significativas foram observadas por toda estrutura pancreática. Primeiramente, observou-se um aumento dos espaços intercelulares no parênquima exócrino (Figura 4A). Dos estágios 43 ao 45, células com características apoptóticas foram observadas apresentando núcleos hipercorados, devido à condensação nuclear e isolamento das células por causa da retração citoplasmática e conseqüente aumento dos espaços intercelulares (Figuras 4B-C). No estágio 46, iniciou-se o período de reorganização do pâncreas com a presença de muitas células endócrinas, células em mitose e poucas células com características apoptóticas (Figura 4D).

#### *Perfil das enzimas digestivas*

Observou-se a presença tanto da tripsina como da amilase desde os primeiros estágios de desenvolvimento até a metamorfose (Tabela 1). A atividade da tripsina apresentou uma tendência de aumento até o estágio 35, ocorrendo um aumento significativo nos estágios 36 ao 40 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Figura 5). A partir do estágio 41 até o 44, houve uma diminuição da atividade atingindo o menor valor no estágio 44. No estágio 45 observou-se novamente um aumento da atividade da tripsina, sendo o valor similar àqueles observados no estágio 35 (Tabela 1 e Figura 5).

O perfil da atividade da amilase apresentou-se de forma similar ao perfil da atividade da tripsina. Entre os estágios 26 e 35 observou-se uma tendência de crescimento

e a partir do estágio 36 ao 40, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,001$ ), sendo o estágio 38 o que apresentou a maior atividade (Tabela 1 e Figura 6). A partir do estágio 41, ocorreu uma diminuição acentuada e contínua dos valores da amilase (Tabela 1 e Figura 6).

## DISCUSSÃO

As alterações metamórficas que ocorrem no fígado dos girinos durante a metamorfose, são de ordem funcional, observando-se aumento na produção de albumina e ceruloplasmina (DUELLMAN; TRUEB, 1986), alteração na produção da hemoglobina (THEIL, 1973), das enzimas do ciclo da uréia (BROWN, BROWN; COHEN, 1959) e aumento da síntese de DNA e RNA (PAIK; METZENBERG; COHEN, 1960). As mudanças morfológicas são principalmente alterações que ocorrem na ultraestrutura das células. Tata (1971) observou mudanças na forma do retículo endoplasmático rugoso (RER) e das mitocôndrias. Dauça et al. (1983) observaram diferenças na eletrondensidade dos peroxissomas.

No presente estudo, a diminuição dos vacúolos de lipídios observada nos hepatócitos, dos girinos de *Rana catesbeiana*, durante a metamorfose, pode estar relacionada com a utilização dos lipídios armazenados no fígado, como fonte energética para a manutenção do metabolismo (SHERIDAN; KAO, 1998). Durante a metamorfose os girinos não se alimentam e regulam seu metabolismo através da utilização dos estoques de glicogênio e lipídio armazenados no fígado e corpos gordurosos (SHERIDAN; KAO, 1998).

O pâncreas sofre reestruturação tecidual durante a metamorfose. As células exócrinas entram em processo de morte celular, levando a uma degeneração do tecido acinar que será completamente renovado (MILANO; CHIMENTI, 1995; ORTIZ DE ZARETE et al., 1991). Entretanto, há controvérsia sobre o que ocorre com o tecido endócrino entre as

espécies de anuros. Para *Xenopus laevis* e *Rana temporaria* não foram observadas degenerações do tecido endócrino durante a metamorfose (LEONE et al., 1976; ORTIZ DE ZARETE et al., 1991). Contudo, em *Bufo bufo*, o tecido endócrino sofreu as mesmas alterações que o exócrino (MILANO; CHIMENTI, 1995).

Em estudo ultraestrutural de transmissão realizados em girinos de *R. catesbeiana*, observou-se que tanto o tecido exócrino como o endócrino sofreu degeneração (NAKAGHI; BUTTLER; OLIVEIRA-BAHIA, 2007). Contudo, na análise de microscopia de luz do presente trabalho, visualizou-se nitidamente apenas a reestruturação do tecido exócrino. Técnicas mais apuradas, como a quantificação das células endócrinas e análise em microscopia eletrônica de transmissão, têm possibilitado constatar que o tecido endócrino também sofre processo de reestruturação tecidual (NAKAGHI et al., 2006; NAKAGHI; BUTTLER; OLIVEIRA-BAHIA, 2007).

Estudos enzimáticos mostram que existe uma estreita relação entre as alterações morfológicas do pâncreas e o perfil das enzimas de amilase e lipase. Leone et al. (1976) analisando o perfil da atividade enzimática da amilase e lipase dos girinos de *Xenopus laevis*, observaram que estas enzimas possuíam um pico de atividade entre os estágios 29 e 38, o qual correspondia ao maior nível de organização ultraestrutural das células acinares. Além disso, estes autores verificaram ainda que, durante a metamorfose, com a desestruturação do tecido exócrino, ocorreu a diminuição da atividade destas enzimas.

No presente estudo, os resultados obtidos mostram que a atividade tanto da amilase quanto da tripsina também apresentaram um aumento crescente durante o desenvolvimento dos girinos, ocorrendo um elevado aumento nos estágios de 36 ao 40, e a partir do estágio 41 ocorreu o declínio desta atividade. As características do perfil destas enzimas podem estar associadas com a maturidade das células do tecido exócrino. Segundo Leone et al. (1976) somente a partir do estágio 29 é que ocorre o completo amadurecimento das estruturas responsáveis pela síntese e secreção das enzimas.

Além disso, os estágios 36 ao 40 correspondem à fase da pró-metamorfose, período em que ocorre o maior crescimento corpóreo dos girinos (ETKIN, 1968) levando a um maior consumo de nutrientes e, conseqüentemente, um aporte maior de enzimas se faz necessário.

A atividade das enzimas pancreáticas acompanha os processos de desestruturação e reestruturação que ocorrem no pâncreas. Em *X. laevis*, tanto a lipase como a amilase, apresentaram uma diminuição da atividade durante a metamorfose e um aumento após a mesma (LEONE et al., 1976). Entretanto, a atividade da amilase no adulto é menor que da lipase e da tripsina, e isso se deve à mudança do hábito alimentar. (McGEACHIN; PORTER WELBOURNE, 1971; SCAPIN; LAMBERT-GARDINI, 1979; TEO; CHEN; TAN, 1993). A atividade da amilase e da tripsina dos girinos da *R. catesbeiana*, observada neste estudo, também diminuíram no período da metamorfose, mas apenas a atividade da tripsina aumentou após a metamorfose, fato que pode estar relacionado com a mudança do hábito alimentar onívoro para carnívoro.

As mudanças no hábito alimentar refletem alterações morfológicas e fisiológicas nos órgãos do sistema digestório para adaptação à nova dieta. O conhecimento de tais alterações morfosiológicas é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos inerentes à digestão de nutrientes em cada fase de desenvolvimento dos girinos, e assim, fornecer embasamento à nutrição e manejo destes animais em cativeiro.

## CONCLUSÃO

Foi possível concluir, nas condições desta análise, que em girinos de rã-touro as mudanças morfológicas observadas no fígado são conseqüências das alterações ocorridas no seu metabolismo e as alterações bioquímicas do pâncreas são reflexos do seu desenvolvimento morfológico durante todo o período larval e metamorfose.

**Figura 1.** Fotomicrografias do fígado do girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - hepatócitos em fileiras com citoplasma repleto de vacúolos de gordura e entre os hepatócitos visualizam-se os sinusóides repletos de hemácias. Giemsa.

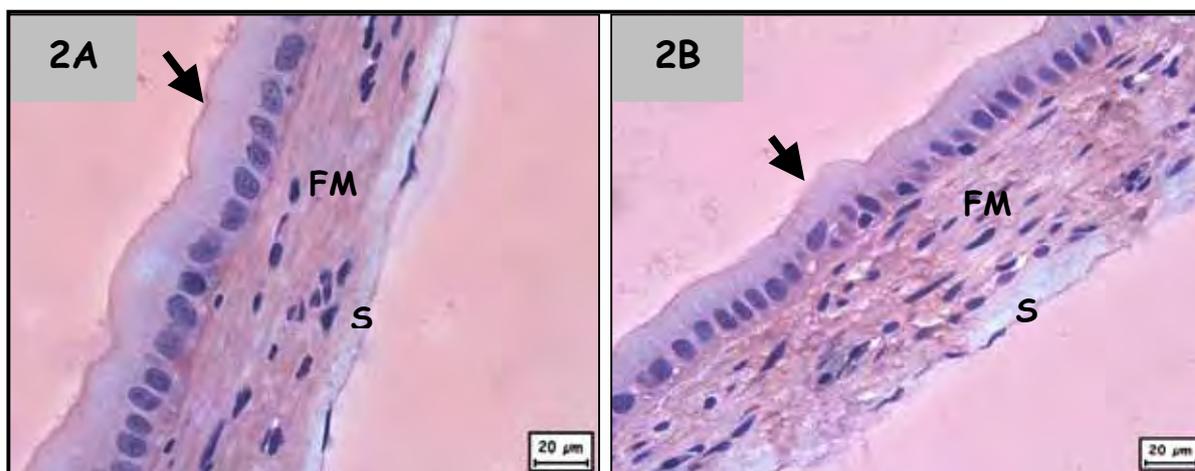
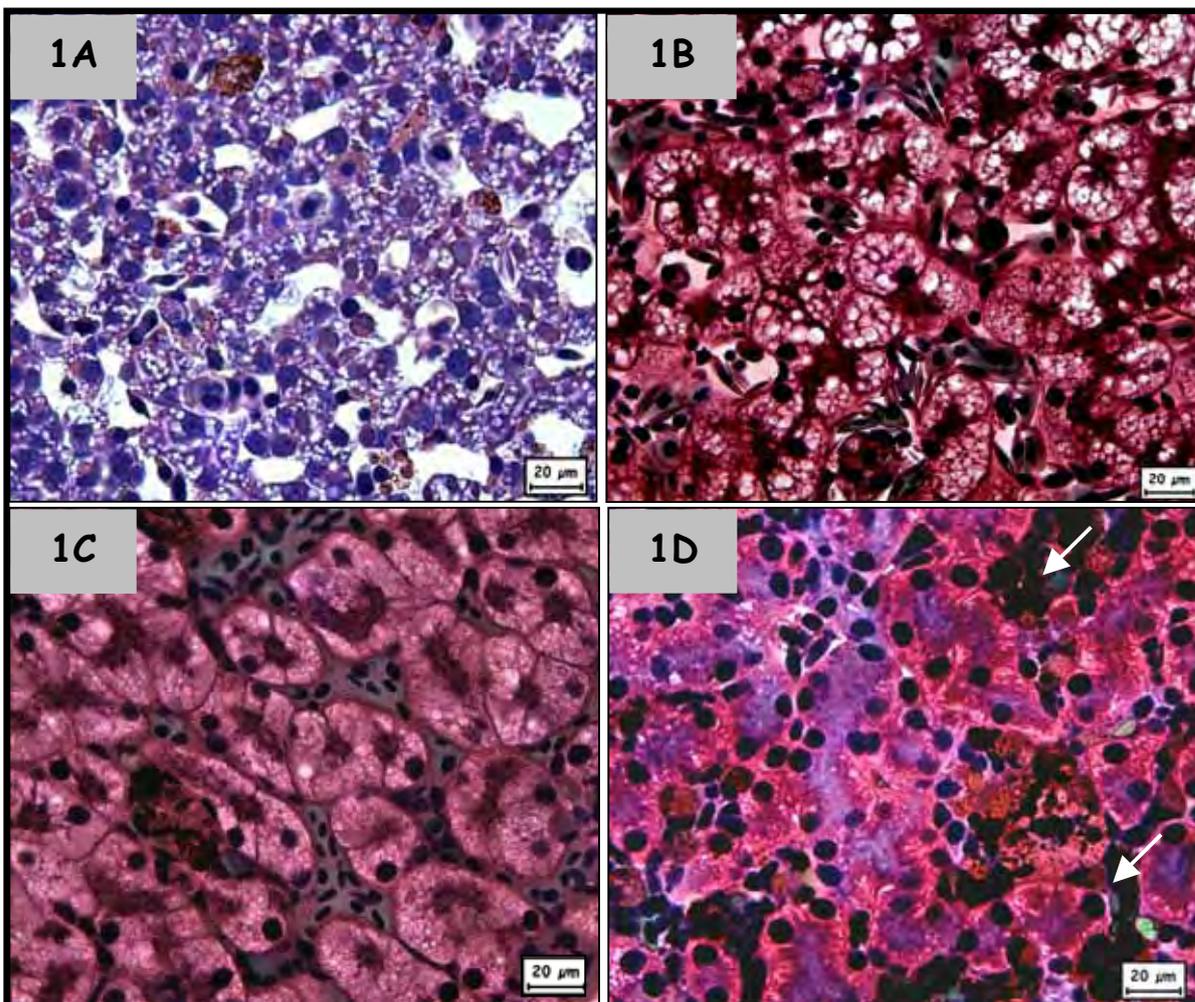
**B: Estágio 40** - hepatócitos dispostos em cordões de células concêntricas. HE - Lysson.

**C: Estágio 42** - hepatócitos com menor quantidade de vacúolos de gordura. HE - Lysson.

**D: Estágio 45** - hepatócitos dispostos em cordões de células concêntricas; melanomacrófagos (seta). HE - Lysson.

**Figura 2.** Fotomicrografias da vesícula biliar do girino de *R. catesbeiana*.

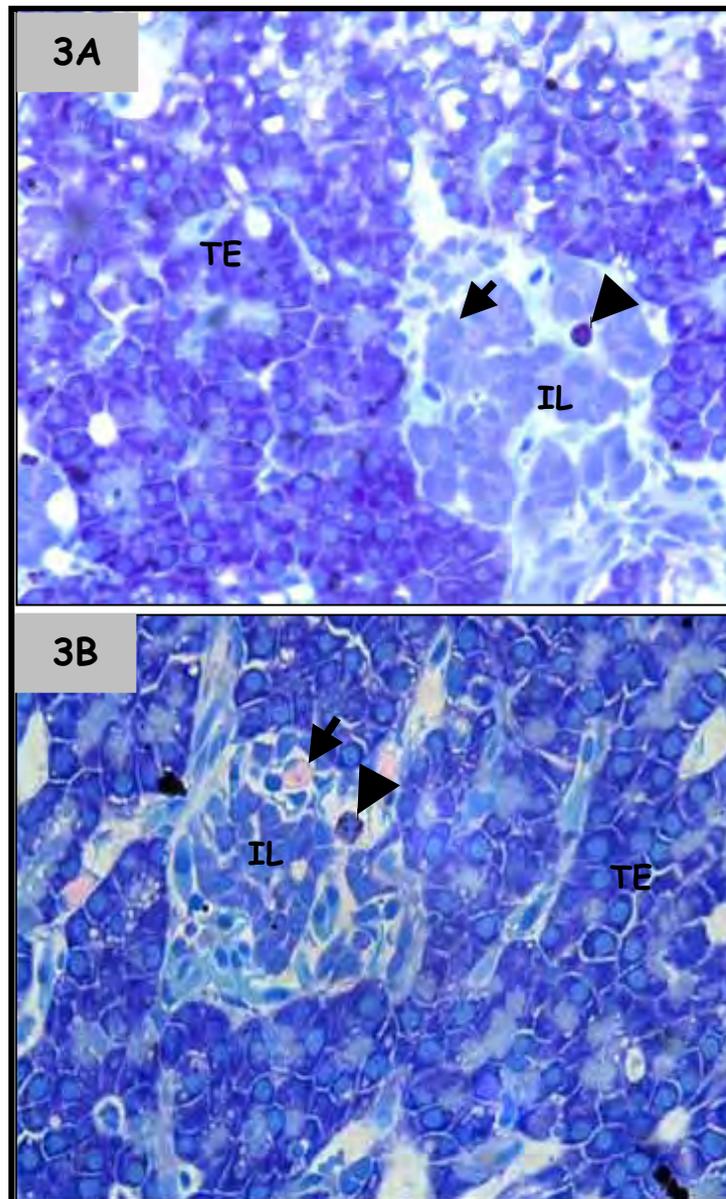
**A: Estágio 42** e **B: Estágio 45** - epitélio simples colunar com microvilos na mucosa (seta), camada fibromuscular (FM) e serosa (S). HE.



**Figura 3.** Fotomicrografias do pâncreas de girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 25** - tecido exócrino (TE) e ilhota de Langerhans (IL); célula  $\beta$  (seta); célula  $\Delta$  (ponta de seta). Giemsa. A = 40x.

**B: Estágio 41** - tecido exócrino (TE) e ilhota de Langerhans (IL); célula  $\Delta$  (ponta de seta); célula  $\alpha$  (seta). Giemsa. A = 40x.



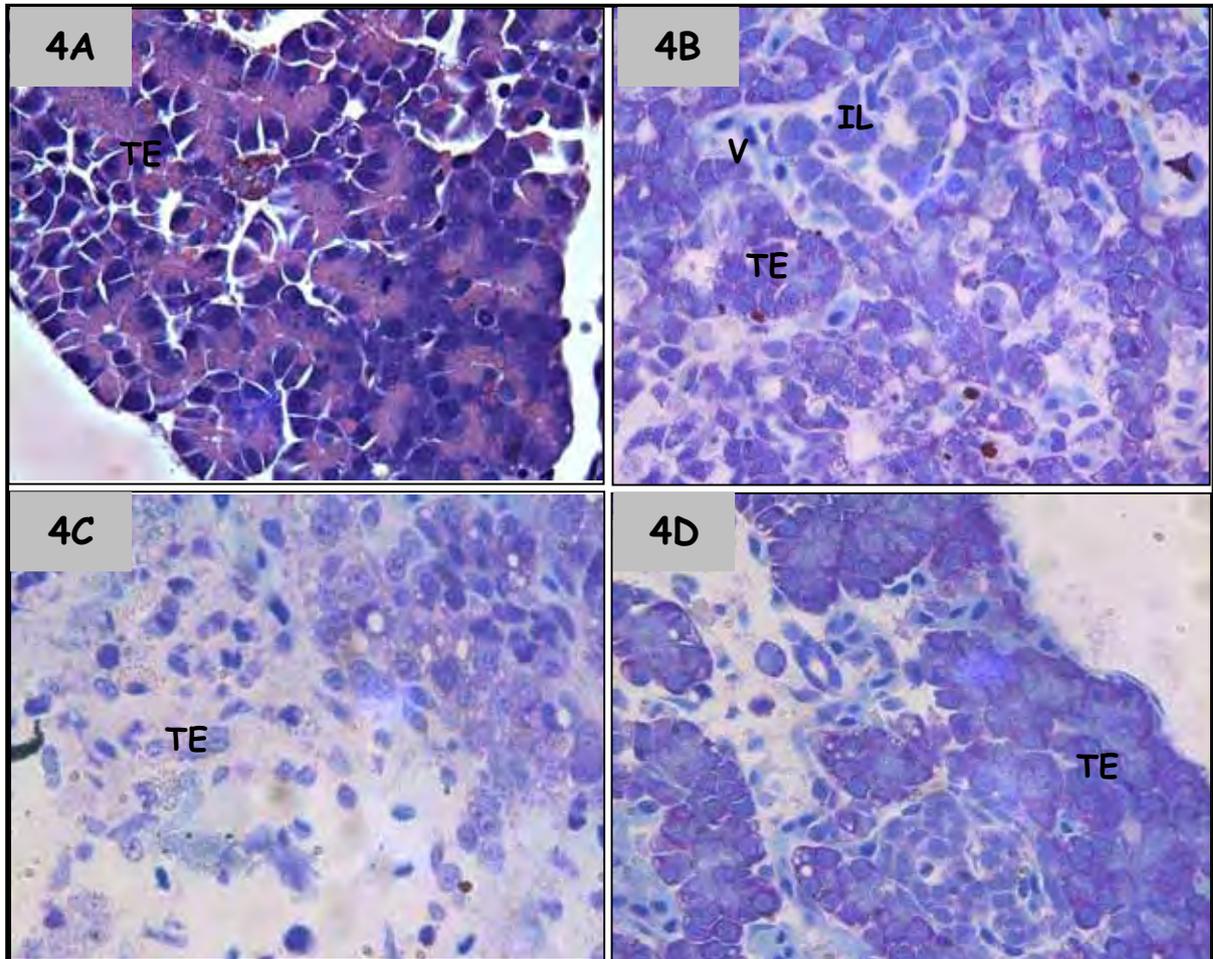
**Figura 4.** Fotomicrografias do pâncreas de girino de *R. catesbeiana*.

**A: Estágio 42** - tecido exócrino (TE); nota-se o aumento do espaço entre as células exócrinas. Giemsa. A = 40x.

**B: Estágio 43** - início do desarranjo do tecido exócrino (TE) e ilhota de Langerhans (IL); hiper-coloração dos núcleos das células acinares; vaso sanguíneo (V). Giemsa. A = 40x.

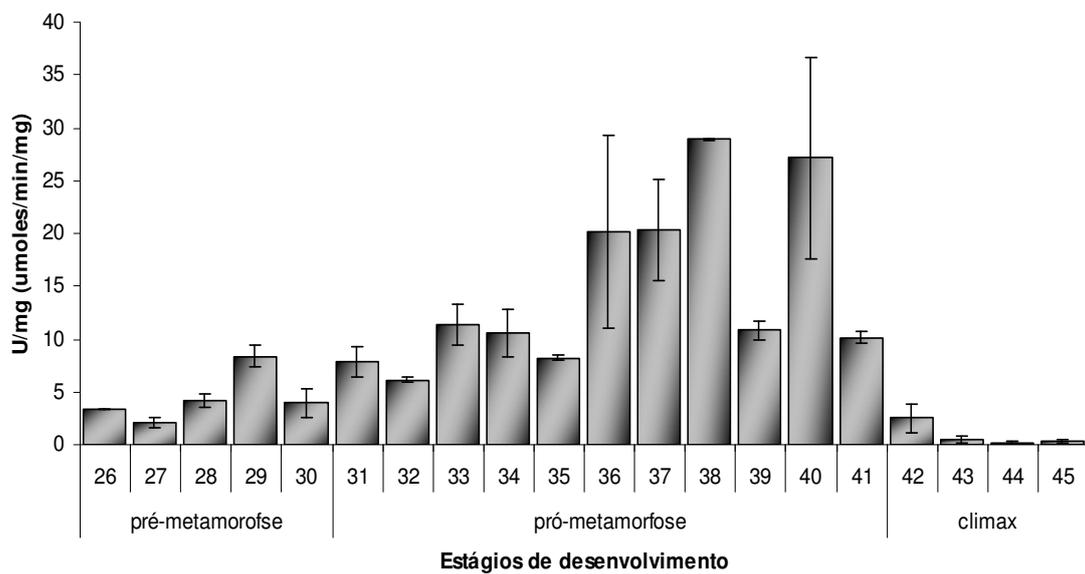
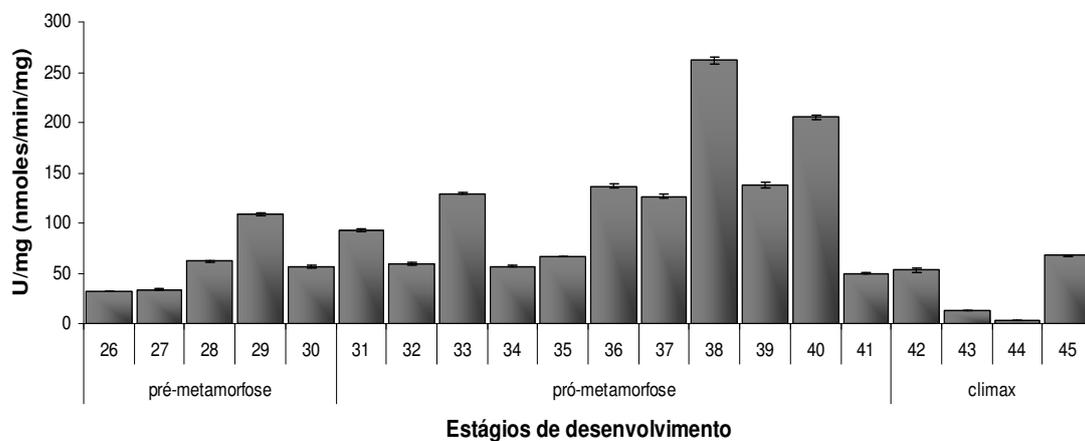
**C: Estágio 44** - desarranjo do tecido exócrino (TE). Giemsa. A = 40x.

**D: Estágio 46** - reestruturação do tecido exócrino (TE). Giemsa. A = 40x.



**Figura 5.** Perfil da atividade específica da tripsina pancreática dos girinos de *Rana catesbeiana* nos estágios de desenvolvimento (GOSNER, 1960). ANOVA:  $F= 4767,02$   $P< 0,0001$ . Letras iguais significam diferenças não significativas.

**Figura 6.** Perfil da atividade específica da amilase pancreática dos girinos de *Rana catesbeiana* nos estágios de desenvolvimento (GOSNER, 1960). ANOVA:  $F= 25,86$   $P< 0,0001$ . Letras iguais significam diferenças não significativas.



**Tabela 1:** Atividade da tripsina e da amilase de extrato de pâncreas de girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*), nos diversos estágios de desenvolvimento. Os resultados representam as médias de três determinações e seus respectivos desvios padrão.

Estágios de Desenvolvimento (Gosner, 1960)	Tripsina U/mg ( $\eta$ moles/min/mg)	Amilase U/mg ( $\mu$ moles/min/mg)
26	31,69 $\pm$ 0,44 <sup>m</sup>	3,17 $\pm$ 0,24 <sup>fg</sup>
27	34,00 $\pm$ 1,08 <sup>m</sup>	1,95 $\pm$ 0,45 <sup>g</sup>
28	61,66 $\pm$ 0,31 <sup>hi</sup>	3,80 $\pm$ 0,79 <sup>efg</sup>
29	109,04 $\pm$ 1,21 <sup>e</sup>	7,9 $\pm$ 1,01 <sup>ecd</sup>
30	56,58 $\pm$ 1,50 <sup>jk</sup>	4,50 $\pm$ 1,36 <sup>efg</sup>
31	92,78 $\pm$ 0,80 <sup>f</sup>	7,59 $\pm$ 1,10 <sup>ecd</sup>
32	58,86 $\pm$ 1,56 <sup>ij</sup>	5,95 $\pm$ 0,34 <sup>efd</sup>
33	129,51 $\pm$ 0,96 <sup>d</sup>	13,08 $\pm$ 3,2 <sup>bc</sup>
34	57,12 $\pm$ 0,96 <sup>ijk</sup>	10,20 $\pm$ 1,64 <sup>cd</sup>
35	66,49 $\pm$ 0,35 <sup>gh</sup>	7,40 $\pm$ 1,41 <sup>cde</sup>
36	136,88 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup>	18,95 $\pm$ 6,79 <sup>ab</sup>
37	126,71 $\pm$ 2,30 <sup>d</sup>	18,56 $\pm$ 4,62 <sup>ab</sup>
38	261,85 $\pm$ 3,89 <sup>a</sup>	28,19 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>
39	137,68 $\pm$ 2,56 <sup>c</sup>	10,68 $\pm$ 0,62 <sup>bcd</sup>
40	205,47 $\pm$ 1,94 <sup>b</sup>	24,84 $\pm$ 7,78 <sup>a</sup>
41	49,56 $\pm$ 0,98 <sup>l</sup>	9,97 $\pm$ 0,49 <sup>cd</sup>
42	53,58 $\pm$ 2,15 <sup>lk</sup>	2,79 $\pm$ 1,06 <sup>fg</sup>
43	13,21 $\pm$ 0,41 <sup>n</sup>	0,46 $\pm$ 0,20 <sup>h</sup>
44	2,61 $\pm$ 0,10 <sup>o</sup>	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>h</sup>
45	67,62 $\pm$ 0,66 <sup>g</sup>	0,38 $\pm$ 0,18 <sup>h</sup>

Letras iguais significam diferenças não significativas

1 ANOVA:  $F_{19} = 4817,74$ ;  $P < 0,001$

2 ANOVA:  $F_{19} = 67,44$ ;  $P < 0,001$

---

**REFERÊNCIAS**

ACCORDI, F.; BRACCI, M. A.; VENTOLA, E. Pancreatic endocrine cells in *Bufo bufo*: immunocytochemistry and ultrastructure. **Journal of Anatomy**, London, v. 192, p. 195-202, 1998.

ACCORDI, F.; CHIMENTI, C. Programmed cell death in the pancreas of *Bufo bufo* during metamorphosis. **Journal of Anatomy**, London, v. 199, p. 419-427, 2001.

BROWN JR., G. W.; BROWN, W. R., COHEN, P. P. Comparative biochemistry of urea synthesis. II Levels of urea cycle enzymes in metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 234(7), p.1775-1780, 1959.

DAUÇA, M.; CALVERT, R.; MÉNARD, D.; HUGON, J. S.; HOURDRY, J. Development of peroxisomes in amphibians. III. Study on liver kidney, and intestine during thyroxine-induced metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 227, p. 413-422, 1983.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982, 397p.

DÍAZ DE RADA, O.; SESMA, P.; LÓPEZ, J.; VÁZQUEZ, J. J.; ORTIZ DE ZÁRATE, A. Giemsa stain applied to deplasticized sections to identify pancreatic islet cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 61 (6). p.367-373, 1986.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, NY, 1986. 670p.

ETKIN, W. In: **Metamorphosis. A problem in development biology**. Ed. By W. Etkin and L. T. Gilbert. Appleton – Century – Crofts, New York, p.313-348, 1968.

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

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 436 p.

HOURDRY, J.; L'HERMITE, A.; FERRAND, R. Changes in the Digestive Tract and Feeding Behavior of Anuran Amphibians during Metamorphosis. **Physiological Zoology**, Chicago, v.69 (2), p.219-251, 1996.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, L. **Histologia Básica**, 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KAUNG, H. C. Changes of pancreatic beta cell population during larval development of *Rana pipiens*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.49, p.50-56, 1983.

---

LEONE, F.; LAMBERT-GARDINI, S.; SARTORI, C.; SCAPIN, S. Ultrastructural analysis of some functional aspects of *Xenopus laevis* pancreas during development and metamorphosis. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, London, v.36, p.711-724, 1976.

McGEACHIN, R. L.; PORTER WELBOURNE, W. Amylase in tissues of the bullfrog *Rana catesbeiana* and leopard frog *Rana pipiens*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 38A, p. 457-460, 1971.

MILANO, E. G.; CHIMENTI, C. Morphogenesis of the Pancreas of Bufo during Metamorphosis. Italia, **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v.97, p.239-249, 1995.

NAKAGHI, L. S. O.; BUTLLER, L.; OLIVEIRA-BAHIA, V. L.; STÉFANI, M. V. Estudo anatômico e histológico do pâncreas dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante desenvolvimento e metamorfose. In: AquaCiência 2006, Bento Gonçalves. **AquaCiência 2006 - Abstracts.**, 2006.

NAKAGHI, L. S. O.; BUTLLER, L.; OLIVEIRA-BAHIA, V. L. Ultraestrutura das células pancreáticas dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante desenvolvimento e metamorfose. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, 2007, In: XXI CSBMM, Búzios, Rio de Janeiro, 2007.

NOBLE, G. K. The digestive system. In: **The Biology the Amphibian**. Ed. G. K. Noble. New York. Dover Publication Inc. Chapter IX. p.201-211, 577p. 1954.

ORTIZ DE ZARETE A., VILLARO, A. C.; ETAYO, J. C.; DÍAZ DE RADA, O.; MONTUENGA, L. M.; SESMA, P.; VÁZQUEZ, J. J. Developmental of the endocrine pancreas during larval phases of *Rana temporaria*: An immunocytochemical and ultrastructural study. **Cell and Tissue Research**, New Yor, v.264, p.139-150, 1991.

PAIK, W. K.; METZENBERG, R. L.; COHEN, P. P. Biochemical studies on amphibian metamorphosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.236 (2), p.536-541. 1961.

SCAPIN, A.; LAMBERT-GARDINI, S. Digestive enzymes in the exocrine pancreas of the frog *Rana esculenta*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 62A, p. 691-697, 1979.

SHERIDAN, M. A.; KAO, Y. Regulation of metamorphosis-associated changes in the lipid metabolism of selected vertebrates. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.38, p.350-368, 1998.

TATA, J. R. Protein synthesis during amphibian metamorphosis. **Currents topics in Development Biology**, San Diego, v.6, p.79-110, 1971.

TATA, Jr. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. **Biochimie**, Paris, v.81(4), p.359-366, 1999.

TEO, L. H.; CHEN, T. W.; TAN, L. L. The lipase and amylase of the common Malayan toad *Bufo melanostictus* Schneider. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 105B, (3/4) p. 509-515, 1993.

THEIL, E. Red cell ferritin content during the hemoglobin transition of amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, New York, v.34, p.282-288, 1973.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: Viscera and Endocrines. In: **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Ed. R. W. McDiarmid and R. Altig. Chicago Press. Chicago. p.92-148, 1999.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Histologia Funcional**-Texto e Atlas em Cores, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 415 p., 2001.

## *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

---

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

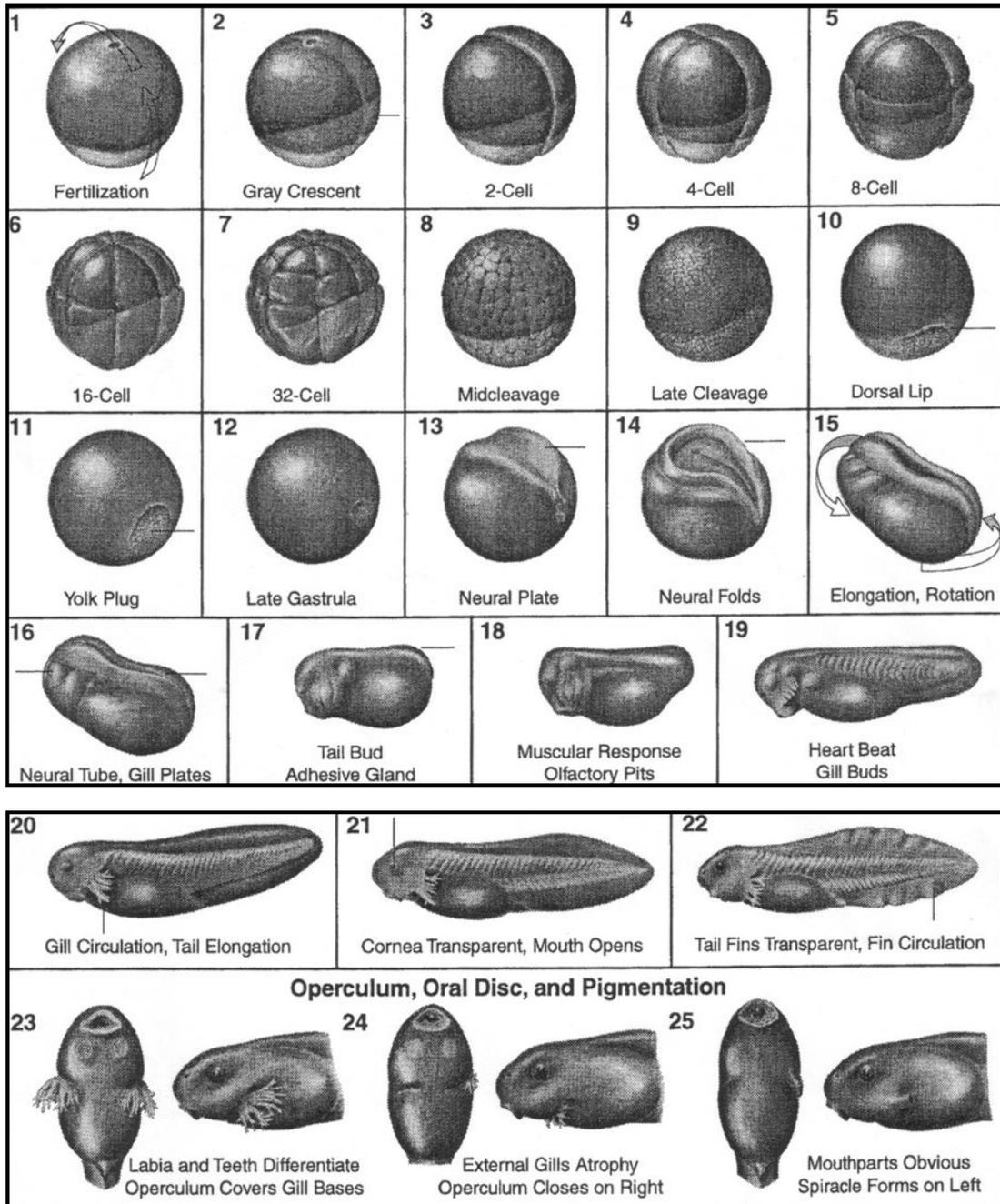
Este trabalho estudou o desenvolvimento ontogenético do sistema digestório dos girinos da rã-touro, por meio de análises morfológicas: anatomia, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Também foram realizadas análises dos perfis das enzimas pancreáticas amilase e tripsina durante o desenvolvimento e metamorfose. Não foram encontrados trabalhos tratando destes temas, o que ressalta a importância deste estudo como pioneiro no assunto, servindo como base para pesquisas futuras conciliando estudos básicos e aplicados, e assim fornecer informações para área de nutrição e manejo alimentar, minimizando problemas da ranicultura atual.

*ANEXO*

---

ANEXO I

Tabela de Gosner (1960), retirada do livro “Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae”, editores Roy W. McDiarmid e Ronald. Altig, Editora “University of Chicago Press”, páginas 10-11, ano 1999.



Continua...

Continuação

