

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) SUBMETIDOS AOS MECANISMOS ESTRESSORES DE CAPTURA, HIPÓXIA E TRANSPORTE

Guilherme Casoni da Rocha

Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo

Outubro - 2007

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) SUBMETIDOS AOS MECANISMOS ESTRESSORES DE CAPTURA, HIPÓXIA E TRANSPORTE

Guilherme Casoni da Rocha

Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo

Outubro - 2007

*Dedico aos meus pais, **Ivete e José** por tudo o que fizeram por mim até hoje e por serem responsáveis pela minha formação, aos meus irmãos **Gustavo e Mariana**, à minha avó **Maria**, ao meu avô **Elvino** (in memoriun), aos meus avós **João e Ana Auta**, à minha namorada **Adriana**, ao meu “amigão” **Ozzy** e ao meu primo **Gabriel Kimbão**.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério, pela oportunidade, orientação, paciência e dedicação.

À Dra. Adriana Sacioto Marcantonio pelo auxílio na condução do experimento no Ranário Experimental do Setor de Aqüicultura do Pólo Regional do Vale do Paraíba.

À Dra. Marta Verardino de Stéfani, da Unesp, Jaboticabal-SP, pelo fornecimento dos girinos utilizados no experimento.

Aos amigos Patrícia, Antonio, Fernanda, Danielle e Sílvia.

À Flávia e à Tathiane, estagiárias do Pólo Regional do Vale do Paraíba, pelo auxílio nas análises.

Ao Djanil, do Ranário Experimental de Pindamonhangaba, pela dedicação e colaboração.

Ao Márcio do Ranário da Unesp Jaboticabal-SP, pelo auxílio.

Aos motoristas do Instituto de Pesca, especialmente ao João batista, pela grande colaboração.

À Margareth e à Sônia da Gênese, pelo empréstimo dos equipamentos e apoio técnico.

Ao Dr. Antenor da Unasp pela colaboração nas análises laboratoriais.

Ao Marcelo, estatístico, que auxiliou na interpretação dos resultados.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesca, Pólo Regional do Vale do Paraíba, Caunesp e Unasp pelo auxílio e colaboração.

À FAPESP pela bolsa e financiamento do projeto.

SUMÁRIO

Índice de Tabelas e Figuras.....	iii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1 - Introdução.....	1
1.1 - Revisão Bibliográfica.....	3
1.1.1 - Sangue de anfíbios.....	3
1.1.2 - Estresse.....	5
1.1.3 - Estresse em anfíbios.....	10
1.1.4 - Hipóxia.....	12
1.1.5 - Transporte.....	13
1.2 - Justificativa e Objetivos.....	15
2 - Material e Métodos.....	17
2.1 - Experimento 1 - Captura e Hipóxia.....	18
2.1.1 - Amostragem Biológica e Local de Experimentação.....	18
2.1.2 - Alimentação e Manejo.....	19
2.1.3 - Tratamentos	19
2.1.4 - Coleta de Sangue.....	22
2.1.5 - Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos (cortisol e glicose).....	23
2.1.6 - Avaliação dos Parâmetros Hematológicos.....	25
2.2 - Experimento 2 - Transporte.....	28
2.2.1 - Procedimentos Experimentais	28

2.2.2 - Coleta de Sangue.....	28
2.3 - Análise dos Resultados.....	29
3 - Resultados e Discussão.....	30
3.1 - Experimento 1 - Captura e Hipóxia.....	31
3.1.1 - Dados Biológicos e Variações Ambientais.....	31
3.1.2 - Análise de Cortisol.....	32
3.1.3 - Análise de Glicemia.....	38
3.1.4 - Parâmetros Hematológicos.....	42
3.2 - Experimento 2 - Transporte.....	48
3.3 - Considerações Finais.....	50
4 - Conclusões.....	54
5 - Referências Bibliográficas.....	56
6 - Anexos	69

Índice de Figuras e Tabelas

- FIGURA 1** - Girino de rã-touro (*Rana catesbeiana*) utilizado na experimentação18
- FIGURA 2** -Tanques de polipropileno (500 litros) adaptados com sistema hidráulico para entrada e escoamento da água em fluxo contínuo (A). Estufa agrícola coberta com polietileno e tela sombrite 50% (B).....19
- FIGURA 3** - Esquema do delineamento amostral dos tanques contendo girinos de *R. catesbeiana*, submetidos aos mecanismos estressores de captura e hipóxia.....21
- FIGURA 4** - Bandejas plásticas utilizadas para exposição aérea dos animais22
- FIGURA 5** - Material e Equipamentos utilizados para leitura de placas de Elisa e glicemia, kit de cortisol e agitador (A), lavadora (B) e leitora placas de Elisa (C); kit de glicemia (D), banho Maria (E) e espectrofotômetro para leitura de glicemia (F).....25
- FIGURA 6** - Câmara de Neubauer (A), esquema do retículo (B) para a contagem de glóbulos vermelhos (R) e leucócitos (W); detalhe do retículo central (C); microhematócrito e leitor (D), centrífuga de hematócrito (E); cianometahemoglobina (F), centrífuga de tubos (G) e espectrofotômetro para leitura da hemoglobina (H); confecção das extensões sangüíneas (I), esquema do procedimento da Contagem

Diferencial e Total de Leucócitos e Total de Trombócitos (J).....	27
---	----

FIGURA 7 - Valores de cortisol plasmático (ng/mL) nos distintos tratamentos e coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente34

FIGURA 8 - Valores de cortisol plasmático (ng/mL) obtidos a partir de animais que foram privados (H) ou não (N) de oxigênio nas coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente..... 35

FIGURA 9 - Valores de glicose plasmática (mg/dL) nos distintos tratamentos e coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente.....39

FIGURA 10 - Valores de glicose plasmática (mg/dL) obtidos a partir de animais que foram privados (H) ou não (N) de oxigênio nas coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente.....40

FIGURA 11 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia. T1 – captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento. (N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar; Lf% - porcentagem de linfócitos; Nt% - porcentagem de neutrófilos; Lf abs - número absoluto de linfócitos e Nt abs - número absoluto de neutrófilos.....44

FIGURA 12 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia. T1 – captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento. (N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar; Bs% - porcentagem de basófilos; Es% - porcentagem de eosinófilos; Bs abs - número absoluto de basófilos e Es abs - número absoluto de eosinófilos..... 45

FIGURA 13 - Valores médios (X) e desvio padrão da média (EPM) da quantificação de cortisol plasmático (ng/mL) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos ao efeito estressor de transporte. AN - antes do transporte; 0T - momento zero após transporte; 15T - 15 minutos após transporte; 30T - 30 minutos após transporte; 45T - 45 minutos após transporte; 60T - 60 minutos após transporte; 90T - 90 minutos após transporte; 24T - 24 horas após transporte.....49

TABELA 1 - Valores médios e desvio padrão da temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica, obtidos nos tanques durante realização do experimento.....	31
TABELA 2 - Valores médios (x) de cortisol plasmático (ng/mL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos mecanismos estressores de captura e hipóxia, nos diferentes tratamentos e períodos de coleta.....	33
TABELA 3 - Análise de Variância (ANOVA) realizada com resultados da quantificação de cortisol plasmático em girinos de rã-touro.....	33
TABELA 4 - Valores médios (X) de glicose plasmática (mg/dL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia, nos diferentes tempos de coleta.....	38
TABELA 5 - Valores de F e P dos resultados estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) nos distintos tratamentos, coletas e animais que foram ou não privados de oxigênio.....	38
TABELA 6 - Valores médios (X) de glicose plasmática de anuros do gênero <i>Rana</i>	41
TABELA 7 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos (Ht, Hb e Er) de girinos de rã-touro, <i>R. catesbeiana</i> , submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia.....	42

TABELA 8 - Valores médios (\bar{X}) e erro padrão da média (EPM) dos os índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia..... 43

TABELA 9 - Valores médios (\bar{X}) e erro padrão (EPM) de parâmetros hematológicos de rã-touro, *R. catesbeiana*..... 47

TABELA 10 - Valores médios (\bar{X}) de cortisol plasmático (ng/mL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos ao mecanismo estressor de transporte, nos diferentes tempos de coleta 48

Resumo

A avaliação dos parâmetros fisiológicos de anfíbios anuros permite que, através de seus resultados, sejam diagnosticados problemas de manejo que podem ser oriundos de efeitos estressores de diversas origens. Este trabalho teve como objetivo utilizar os marcadores biológicos de cortisol, glicemia e dados hematológicos (número de eritrócitos (Er), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), contagem total e diferencial dos leucócitos e os índices hematimétricos absolutos: VCM, HCM e CHCM), para avaliar a resposta de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), no estágio de pró-metamorfose, aos mecanismos estressores de captura, hipóxia e transporte. No 1º experimento os animais foram submetidos a três tratamentos: estresse por captura individual com puçá; estresse por captura em massa com puçá e estresse por captura por escoamento, que são os manejos tradicionalmente empregados na criação de rãs (ranicultura). Cada tratamento foi conduzido com três réplicas simultâneas, dispostas de maneira aleatória, e de cada réplica foram analisados 4 organismos (2 normóxia – coleta imediata de sangue, e 2 hipóxia – coleta de sangue após exposição aérea por 15 minutos). Foram realizadas duas coletas com intervalo de 5 dias. Para avaliar o estresse causado por transporte colocaram-se os girinos em sacos plásticos com água que foram transportados por um período de 4 horas. Após a chegada, os animais foram aclimatados e divididos em aquários (1girino/L) de acordo com os diferentes tempos a serem testados. Os tempos definidos para as coletas de sangue (grupos) foram: M0 (coleta de sangue antes do transporte), 0T, 15, 30, 45, 60, 90 minutos e 24 horas após a chegada dos animais. Nos experimentos de captura, hipoxia e transporte a análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas entre os parâmetros avaliados quando comparou-se os tratamentos e a exposição ou não ao ar (hipóxia e normóxia). Os dados médios variaram de 2,1 a 5,0 ng/mL de cortisol plasmático; 49,3 a 104,3 mg/dL de glicose plasmática; Er: $49,66 \pm 5,01 \cdot 10^4/\text{mm}^3$; Ht: $30,22 \pm 3,41 \%$; Hb: $5,79 \pm 0,36 \text{ g}/100 \text{ mL}$; VCM: $732,10 \pm 238,69 \text{ fL}$; HCM: $147,87 \pm 47,52 \text{ pg/cel}$; CHCM: $18,88 \pm 1,47 \%$; Lf: $91,85 \pm 1,40 \%$; Nt: $1,36 \pm 0,94 \%$; Bs: $5,18 \pm 1,17 \%$; Es: $1,65 \pm 0,50 \%$ e Mn: não detectados. Atraves destes resultados pode-se concluir que os marcadores biológicos de estresse utilizados (cortisol e glicose) não foram alterados pelos manejos de captura testados, pela exposição aérea e pelo procedimento de transporte. Recomenda-se que outros marcadores sejam testados para quantificar o estresse causado por estas situações.

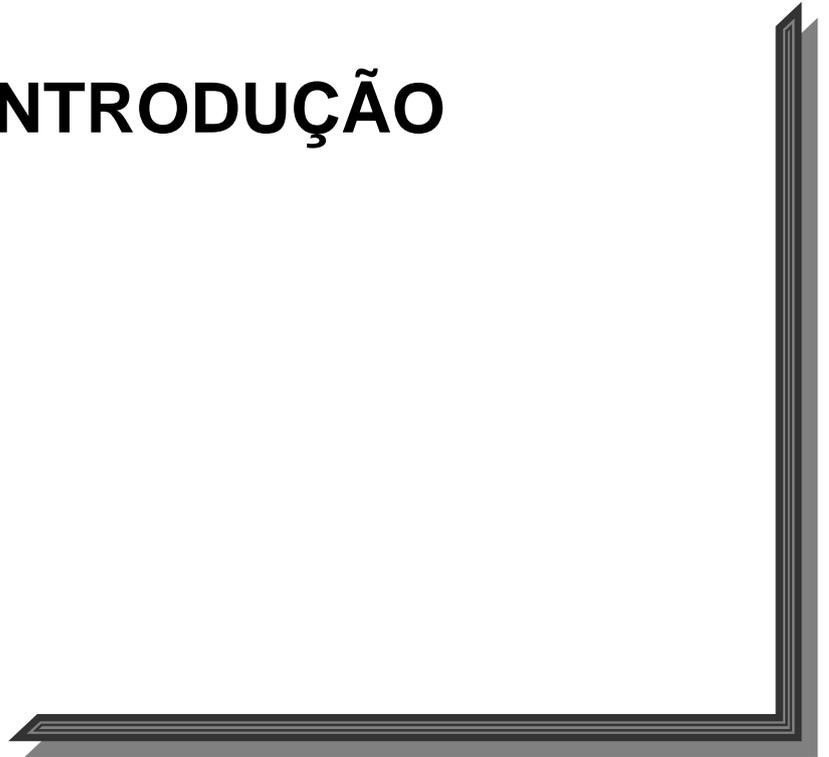
Palavras-chave: rã, estresse, cortisol, glicose, hipóxia, transporte

Abstract

The evaluation of physiological parameters of anuran amphibians allows the diagnosis of problems in their culture that can be due to stressor effects of diverse origin. The aim of this work was to utilize the biological markers plasma cortisol and glucose levels and hematological parameters (erythrocyte number (Er), hematocrit (Ht), hemoglobin level (Hb), total and differential leukocyte count and the RBC indices: MCV, MCH and MCHC), to evaluate the response of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*), in the stage of pro-metamorphosis, to stressor conditions of capture, hypoxia and transport. On the first part to evaluate capture and hypoxia's stressor, the animals were submitted the three treatments: stress due to individual capture with a hand net; stress due to batch capture with a hand net; and stress due to capture by emptying, traditional handling methods used in raising bullfrogs (frog farming). Each treatment was carried out in triplicate in a random manner, and 4 organisms were analyzed for each replicate (2 animals were sampled on normoxia – blood collected immediately, and 2 animals were sampled on hypoxia – blood collected after 15 min exposure to air). Two samplings were performed with an interval of 5 days. On the second part to evaluate transport's stressor tadpoles were placed into the plastic bags with water and carried out for 4 hours. After the arrival, the animals had been acclimatized and distributed in aquariums (1 tadpole L⁻¹) in accordance with the different blood collection times to be tested: M0 (collection of blood before the transport), 0T (immediately collection after arrived), 15, 30, 45, 60, 90 minutes and 24 hours after arrived. In the capture, hypoxia and transport experiment the statistic analysis demonstrated that there were no differences. The means for the physiological parameters varied of 2,1 a 5,0 ng mL⁻¹ for plasma cortisol and 49,3 a 104,3 mg dL⁻¹ for plasma glucose, while the hematological parameters were as follows: RBC, 49.66 ± 5.01 10⁴/mm³; Ht, 30.22 ± 3.41 %; Hb, 5.79 ± 0.36 g 100 mL⁻¹; MCV, 732.10 ± 238.69 fL; MCH, 147.87 ± 47.52 pg/cell; MCHC, 18.88 ± 1.47 %; Lf: 91.85 ± 1.40 % ; Nt, 1.36 ± 0.94 % ; Bs, 5.18 ± 1.17 %; Es, 1.65 ± 0.50 %; and Mn, not detected. Through of these results can be concluded that the biological markers of stress used (cortisol and glucose) had not been modified by the tested handling of capture, for air exposition until 15 minutes and for the transport procedure. One sends regards that other markers are tested to quantify stress for these situations.

Key words: frog, stress, cortisol, glucose, hypoxia, transport

1 - INTRODUÇÃO



A maior parte da carne de rã consumida no mundo é ainda proveniente de caça, com conseqüente diminuição dos estoques naturais. Devido à consciência ecológica atual e pressão de ambientalistas foram desenvolvidas leis para proteger as espécies ameaçadas (TEIXEIRA *et al.*, 2001). O controle sobre a caça incentivou o consumo de carne provinda de animais criados em cativeiro, e um dos favorecidos com esse consumo e pioneiro na tecnologia de criação de rãs em cativeiro é o Brasil (FONTANELLO, 1994).

Segundo FERREIRA *et al.* (2002) a ranicultura no Brasil tem como principal espécie de criação a rã-touro (*Rana catesbeiana*). Outras espécies, nativas de nosso país, como a rã-pimenta, a rã-manteiga e a paulistinha, também podem ser criadas, mas em comparação à rã-touro apresentam um menor desempenho produtivo (baixa prolificidade), maiores dificuldades técnicas (poucos estudos) e burocráticas (grande número de autorizações).

Praticamente toda a produção brasileira (400 ton/ano) é consumida pelo mercado interno, apenas uma pequena parcela é exportada, tendo como principal mercado os EUA (TEIXEIRA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003).

Popularmente conhecida como rã-touro, a espécie *R. catesbeiana*, natural do Canadá, após excelente adaptação ao clima predominante existente no Brasil e aos diferentes manejos físicos e alimentares, foi adotada nacionalmente pela ranicultura comercial. Os fatores predominantes desta escolha foram suas características zootécnicas, tais como: rusticidade (facilidade de manejo), precocidade (crescimento rápido) e prolificidade (alto número de ovos por postura) e o fato de raramente serem acometidas por patologias causadoras de morte em caráter epidêmico (FONTANELLO, 1994; FERREIRA *et al.*, 2002).

Ainda de acordo com os autores anteriormente citados, a produção e desenvolvimento dessa espécie no Brasil apresentam-se superior a do seu país de origem (EUA), ou seja, em média não ultrapassam sete meses de

duração para as fases de girino e engorda. Em algumas regiões da América do Norte, este mesmo desempenho chega a durar cerca de quatro anos.

Com base nessas informações entendemos que estudos relacionados à fisiologia de *R. catesbeiana* são necessários para dar subsídios às pesquisas que produzam informações importantes e úteis, tanto para o meio acadêmico, quanto para profissionais que trabalham com o cultivo comercial dessa espécie.

1.1 - Revisão Bibliográfica

1.1.1 - Sangue dos Anfíbios

O sangue dos anfíbios é composto por plasma e elementos figurados conhecidos como eritrócitos, leucócitos e trombócitos (DUELLMAN e TRUEB, 1986). Nos anfíbios anuros a volemia é de aproximadamente 9% do seu peso corporal (WILSON, 1989), e existe uma diferenciação hematológica conforme o sexo, espécie, fases da metamorfose, estado nutricional, estação sazonal e temperatura (HARRIS, 1972). Em anfíbios, na fase larval, o eritrócito mede aproximadamente 14 por 23 μm com 400.000 ou mais por mm^3 de sangue. São células elípticas, achatadas e nucleadas (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

Especificamente em rãs-touro os eritrócitos de girinos apresentam uma vida mais curta do que a dos adultos; e durante a metamorfose, são capturados por macrófagos do fígado e baço para serem destruídos (HASEBE *et al.*, 1999). Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986) existem diferenças morfológicas entre os glóbulos vermelhos de formas adultas e larvais de anuros. Singularmente, os eritrócitos dos girinos são maiores que os de rãs metamorfoseadas. Um dos fatores que contribui para esse processo é o fato dessas células em girinos possuírem maior quantidade de retículo endoplasmático. A seqüência de amadurecimento destes eritrócitos ocorre da seguinte forma: eritróide precursor ou rubrócito → eritroblasto → eritroblasto

policromático → reticulócito → eritrócito normocromático (TURNER, 1988). Segundo FORMAN e JUST (1976), o tempo de vida dos eritrócitos de girinos de *R. catesbeiana* é de aproximadamente 100 dias. A hemoglobina (pigmento respiratório) contida nos glóbulos vermelhos desta espécie semi-aquática tem menor afinidade pelo oxigênio que em outras espécies (aquáticas) como *Necturus* sp (HILL, 1980). O clima (mudanças estacionais), por sua vez, provoca respostas de acomodação cardio-respiratória nos anfíbios (BICEGO e BRANCO, 1999). A concentração de hemoglobina diminui durante a letargia invernal e a hipóxia resultante induz hipotermia, provavelmente como mecanismo de defesa (HILL, 1980).

DUELLMAN e TRUEB (1986) e TURNER (1988) citam que são encontrados cerca de 7.000 leucócitos por mm³, divididos nas seguintes categorias:

Linfócitos - com núcleo redondo, cromatina densa e citoplasma basofílico; mais numerosos no sangue periférico de girinos do que de rãs adultas.

Neutrófilos – são as células de defesa primária e possuem núcleo quase sempre segmentado.

Basófilos - também comumente encontrado no sangue periférico de anuros larvais, inclusive em *R. catesbeiana*, mostram núcleo sem segmentação e citoplasma com exuberantes grânulos basofílicos.

Eosinófilos - apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma.

Monócitos - raramente encontrados, possuem um núcleo que ocupa quase que totalmente a célula, possuindo um citoplasma levemente vacuolado e fracamente basofílico.

Os anuros possuem ainda trombócitos nucleados, com função semelhante às plaquetas dos mamíferos.

É observando quali e quantitativamente estes elementos que se pode ter idéia do estado de saúde dos animais, refletindo através de seu aumento ou diminuição, problemas nutricionais (carências por alimentação inadequada em quantidade e/ou qualidade), má absorção intestinal, parasitoses, infecções, inflamações, estresse, distúrbios metabólicos, intoxicações, desidratações, hipóxia e outras anomalias (RANZANI-PAIVA e SILVA SOUZA, 2004; COPPO *et al.*, 2005).

As variáveis da série vermelha, eritrograma, são de grande valia na identificação de processos anemiantes (MAHONEY e McNULTY, 1992), enquanto o leucograma pode ser empregado como auxílio no diagnóstico dos processos infecciosos (RANZANI-PAIVA e EIRAS, 1992) e outros estados de desequilíbrio homeostático.

Assim, o sangue constitui-se em uma excelente ferramenta biológica dentro da patologia, e o estudo de sua morfologia e bioquímica pode fornecer subsídios essenciais para elucidação do comportamento de diversos hormônios, entre eles, aqueles ligados ao estresse (TEIXEIRA, 2007).

1.1.2 - Estresse

O estresse pode ser definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo do animal (homeostase) é quebrado, como resultado de ações de um estímulo intrínseco e/ou extrínseco, chamado estressor (PICKERING, 1981). Animais submetidos a condições estressantes sofrem adaptações à quebra da homeostase (ADAMS, 1990). Mudanças fisiológicas compensatórias e/ou adaptativas foram observadas por BONGA (1997) quando os animais têm sua homeostase ameaçada.

Segundo relato de VAL *et al.* (2004) os estressores podem ser de origem química, física, biológica ou mesmo do manejo dos animais. Diversos fatores podem levar a uma resposta fisiológica de estresse, como por exemplo, temperatura e qualidade da água, idade, condições fisiológicas, fatores sociais, características herdáveis ou adquiridas, linhagem e espécies diferentes, mudanças abruptas ou extremas no ambiente físico, interações sociais (predação, parasitismo, competição intensiva por alimento, espaço ou parceiros sexuais) e interferência humana (incluindo o manejo) (BONGA, 1997). Esses fatores individualmente ou em conjunto podem oferecer estresse ao sistema fisiológico dos animais (ADAMS, 1990).

A resposta ao estresse em organismos aquáticos tem a participação do sistema nervoso (nervos simpáticos e células cromafins) e do sistema endócrino (eixo hipotálamo-hipófise-células inter-renais) e, segundo SUMPTER (1993) e BONGA (1997) podem ser divididos em três etapas. Na 1ª etapa ocorre a ativação dos centros cerebrais, o que culmina em uma intensa liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticóides (principalmente cortisol). Na 2ª etapa há ações imediatas e efeitos destes hormônios que foram liberados no sangue e nos tecidos como, por exemplo, aumento dos batimentos cardíacos, consumo de oxigênio, alterações na glicemia, no hematócrito e no número de leucócitos. A 3ª etapa é caracterizada por ser um estágio de exaustão, que causa a queda de desempenho e a diminuição da resistência a doenças e conseqüente contaminação dos animais por bactérias e fungos oportunistas podendo levá-los à morte (IRWIN *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003).

Corroborando os autores citados acima, MOBERG (2000) propõe um modelo de resposta do animal ao estresse. Esse modelo sugere que a resposta biológica ao estresse se dá a partir de três estágios gerais: 1º reconhecimento de um estímulo estressante; 2º a defesa biológica contra o estímulo estressante e 3º, as conseqüências das respostas ao estresse.

A principal função do eixo que forma a resposta ao estresse em mamíferos (eixo hipotálamo – glândulas pituitárias – supra-renais (adrenais)), e em particular a resposta adrenocortical ao estresse agudo, é reduzir o impacto causado pelo agente estressor ao animal e esta redução é feita através de respostas comportamentais ou fisiológicas (BALM, 1999).

3

Nos vertebrados, uma resposta clássica ao estresse agudo é a liberação de uma classe de hormônios, os glicocorticóides (principalmente cortisol). Estes hormônios promovem mudanças fisiológicas e comportamentais tais como uma rápida produção de glicose e a cessação provisória da reprodução (SAPOLSKY *et al.*, 2000).

De acordo com GOMES *et al.* (2003) e SUMPTER (1993) o cortisol plasmático e a glicose são os marcadores biológicos mais utilizados e apresentam uma boa resposta na avaliação de estresse.

O cortisol ou hidrocortisona é um glicocorticóide que está relacionado ao metabolismo alimentar, as inflamações e ao estresse. Seu efeito mais importante é estimular a conversão das proteínas em glicose e seu armazenamento sob forma de glicogênio. Sua liberação ocorre quando há o estímulo estressor e este estímulo leva à ativação da tríade CRH – ACTH – Cortisol. O CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina) é produzido e liberado pelo hipotálamo, após sua liberação, atua sobre a glândula pituitária anterior, estimulando a produção e liberação de ACTH (Corticotropina), o efeito que o ACTH vai gerar sobre o córtex adrenal é a liberação de cortisol. O controle da liberação de cortisol é realizado principalmente através de feedback negativo (podendo ser um feedback de alça curta ou de alça longa), mas também possui outras formas de regulação tais como: ciclo circadiano (diários), ultracircadianos (dentro de um mesmo dia), estágios do sono, variação sazonal, etapas de desenvolvimento (fetal, neonatal, puberal, etc.) e estresse (VOET *et al.*, 2000; GUYTON e HALL, 2002; HICKMAN *et al.*, 2003).

As mudanças nas funções biológicas durante o estresse culminam em uma troca de recursos biológicos, como por exemplo, a energia que seria utilizada no crescimento do animal jovem vai ser utilizada no combate ao estresse. Essa mudança na função biológica durante o estresse é definida por MOBERG (1996) como “custo biológico de estresse”. Quando o estresse é muito intenso, o custo biológico é significativo, e diante de um custo significativo o animal pode apresentar os estágios pré-patológicos e patológicos.

O cortisol exerce efeito em diversas funções do organismo, dentre elas estão os efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e processos inflamatórios. Segundo SUMPTER (1993) existem muitas conseqüências de uma elevada taxa do mesmo, e apenas uma parte delas é conhecida, portanto, representam uma luz para guiar as pesquisas. Algumas dessas conseqüências em vertebrados (CELIS, 1998) são:

Músculos – níveis basais de cortisol são necessários para manter a contratilidade e o trabalho máximo do músculo esquelético e do cardíaco. O excesso provoca atrofia e fraqueza por causa do consumo protéico.

Ossos – o principal efeito do cortisol é diminuir a formação óssea, em casos de excesso, há uma grande redução da massa óssea e redução do crescimento.

Tecidos Conjuntivos - torna a pele e a parede capilar mais delgada e em conseqüência pode haver o rompimento facilmente.

Sistema Vascular – o cortisol é necessário para a manutenção da pressão sanguínea normal e conseqüentemente alterações nos níveis deste hormônio prejudicam a manutenção deste processo.

Rins – o cortisol aumenta a filtração glomerular. Também é essencial para a rápida excreção de uma carga de água.

Sistema Nervoso Central - ele modula de algum modo às funções de percepção e de emoção. Sua falta ou excesso prejudica esses processos. O excesso de cortisol interfere no sono normal.

A glicose é um composto orgânico, e tem como principal função biológica servir de substrato energético para as células. A glicose também participa da composição das glicoproteínas, dos glicopeptídeos e glicolípídios que desempenham funções estruturais e funcionais. Alguns destes compostos são: colágeno da membrana basal, mucopolissacarídeos, mielina das células nervosas, hormônios e receptores hormonais (BERG *et al.*, 2004).

Na forma de glicogênio, a glicose é armazenada no fígado e músculos após a ocorrência da glicogênese (conversão de glicose em glicogênio). Em situações que os níveis de cortisol estão altos, ocorre a gliconeogênese, ou seja, as células hepáticas convertem proteínas e glicerol em glicose (FEDER e BURGGREN, 1992; SCHMIDT-NIELSEN, 2002). O aumento (causado pelas catecolaminas) e a manutenção do aumento (causado pelo cortisol) da glicemia são importantes para proporcionar energia para a fuga ou enfrentamento de uma situação adversa (BONGA, 1997) e segundo MOMMSEN *et al.* (1999) para a resposta secundária ao estresse.

A glicose tem sido utilizada também para determinar o estresse por hipóxia já que estudos demonstram que há um rápido aumento da glicose quando o animal é submetido a hipóxia, como no caso de peixes (BARTON e IWAMA, 1991; MCDONALD e MILLIGAN, 1992; RANDALL e PERRY, 1992; ARENDS *et al.*, 1999).

Em relação à manutenção dos níveis glicêmicos o cortisol é um antagonista da insulina. O cortisol inibe a captação de glicose estimulada pela insulina nos tecidos musculares e adiposos e bloqueia o efeito supressor da

insulina sobre a produção hepática de glicose. Os dois hormônios (cortisol e insulina) favorecem o armazenamento hepático de glicogênio. O antagonismo ocorre em relação à expressão dos genes para enzima gliconeogênica (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e para a enzima de liberação da glicose (glicose-6-fosfatase) e em consequência desses fatores, o cortisol favorece a secreção de glicose pelo fígado enquanto a insulina a inibe. O resultado final da exposição prolongada a excesso do cortisol consiste em elevação da concentração plasmática e um aumento compensador dos níveis plasmáticos de insulina. (HILL e WYSE, 1989; GUYTON e HALL, 2002).

1.1.3 - Estresse em Anfíbios

Em qualquer sistema de criação é inevitável o estresse aos animais e do mesmo modo ocorre na aquicultura. Geralmente as consequências são a reduções do crescimento e ganho de peso, do desempenho reprodutivo e da resistência a patógenos (IWAMA, 1993).

No que se refere ao estresse em anfíbios como a *R. catesbeiana*, não existem muitos relatos científicos a este respeito, mas variações fisiológicas como estas provavelmente também ocorrem com esta classe de animais.

Nos trabalhos experimentais de observação comportamental, realizados por DUELLMAN e TRUEB (1986) relatou-se que rãs são animais que facilmente se estressam.

Segundo FERREIRA *et al.* (2001) o estresse pode ser a causa de um dos principais problemas da ranicultura, as patologias. Os agentes estressores neste caso podem ser resultantes de sistemas de criação não apropriados, manejos inadequados (físico, profilático, sanitário e alimentar), alterações ambientais como temperatura e luminosidade, problemas na qualidade física e química da água, bem como presença de outros animais, pessoas, dentre outros.

Nas diversas fases de desenvolvimento das rãs, são observadas características em consequência da exposição a fatores estressantes. Em girinos destaca-se a falta de apetite, apatia e nado desorientado, entre outras características. Na fase de pré-engorda e engorda os animais se empilham nos cantos das baías, saltam de forma irregular, nas áreas úmidas são observados excesso de pele, por vezes foi observado muco na forma de espuma. No período reprodutivo, fêmeas estressadas abortam e produzem gritos característicos enquanto os machos deixam de coaxar. Neste período os animais tendem a ficarem escondidos tanto embaixo da água, quanto nos abrigos (LIMA e AGOSTINHO, 1992; FERREIRA *et al.*, 2001).

Os corticóides ou corticosteróides regulam processos metabólicos nos anfíbios e se elevam em resposta à estresses agudos como manipulação e/ou confinamento (LICHT *et al.*, 1983; ZERANI *et al.*, 1991).

O efeito do cortisol em relação aos hormônios tireoidianos é dependente do estágio de desenvolvimento do girino e também muda durante a metamorfose. Na pré-metamorfose há uma inibição da tireóide e na pró-metamorfose há um estímulo. No clímax o efeito estimulador do cortisol sob a tireóide diminui e o cortisol contribui para o declínio de tiroxina (T4) no plasma dos girinos (WRIGHT *et al.*, 1999).

Alguns dos momentos em que esses hormônios atuam são: na regulação hormonal da metamorfose, antagonizando com as mudanças induzidas pelos hormônios tireoidianos durante alguns estágios do desenvolvimento, e mais tarde junto com os níveis elevados desses hormônios aceleram a metamorfose (HAYES *et al.*, 1993; KIKUYAMA *et al.*, 1993; WRIGHT *et al.*, 1994); o crescimento dos membros em girinos de *R. catesbeiana* é inibido pelo cortisol, assim como por outros corticóides, e estimulado mais tarde na metamorfose quando os corticóides sinergizam com níveis do clímax ou próximo aos níveis do clímax de T4 (WRIGHT *et al.*, 1994). O cortisol em sinergia com hormônios tireoidianos induz a queratinização da pele das larvas (MILLER, 1996). Os glicocorticóides induzem apoptoses em

linfócitos larvais para efetuar uma reorganização do sistema imune dos girinos na metamorfose (ROLLINS-SMITH *et al.*, 1997).

O desenvolvimento, comportamento, e a morfologia de girinos podem ser alterados em função de respostas às circunstâncias ambientais. Por exemplo, o retardo do desenvolvimento de girinos na presença de concorrentes (espaço e alimento) e a alteração do comportamento e da morfologia da cauda na presença de predadores (BERVEN e CHADRA, 1988; SCOTT, 1990; SMITH e VAN BUSKIRK, 1995; MCCOLLUM e VAN BUSKIRK, 1996).

Exemplos de alterações fisiológicas em função de circunstâncias ambientais puderam ser observados por DENVER (1998) quando as taxas de corticosteronas aumentaram em girinos de *Scaphiopus hammondii* quando o nível da água em que os animais eram mantidos diminuiu. Da mesma forma GLENNEMEIER e DENVER (2002) observaram estas alterações em *Rana pipiens* quando os girinos foram expostos á concorrentes de intra-espécie. Esses estudos demonstram a corticosterona como sendo um potencial mediador fisiológico de respostas de girinos a variações em seus ambientes.

1.1.4 - Hipóxia

A hipóxia pode ser definida como a diminuição da pressão de oxigênio (PO_2) disponível, diferente do termo anóxia que significa “sem oxigênio” (SWENSON e REECE, 1993).

Quatro tipos de hipóxia são descritos pelos autores citados acima:

- Hipóxia ambiental: o sangue arterial é insuficientemente saturado com oxigênio por causa de uma PO_2 baixa no ambiente onde se respira.
- Hipóxia anêmica: há um decréscimo no volume de oxigênio do sangue por causa da diminuição do funcionamento da hemoglobina.

- Hipóxia estagnante ou hipóxia isquêmica: o fluxo de sangue está diminuído, seja no corpo todo ou somente em um tecido.
- Hipóxia histotóxica: as células são incapazes de utilizar o oxigênio que é fornecido.

Observou-se que os peixes sofrem ajustes hematológicos a hipóxia tais como: aumento do hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e células vermelhas no sangue (VAL *et al.*, 1990; VAL e ALMEIDA VAL, 1995; VAL, 2000). Estes valores resultam no aumento da capacidade de captar O₂ nas brânquias e maior conteúdo de O₂ no sangue em peixes expostos a hipóxia (WEBER *et al.*, 1975; JENSEN *et al.*, 1993). A utilização de variáveis hematológicas com Hb e Ht pode indicar respostas dos peixes frente a situações de estresse como, por exemplo, a hipóxia ambiental (DETHLOFF e BAIMAIER, 2001).

1.1.5 - Transporte

O transporte gera um conjunto de agentes estressores aos organismos aquáticos que podem causar injúrias aos animais, tais como: manipulação direta, vigorosa atividade muscular (o que pode diminuir o oxigênio das células), exposição à baixa qualidade de água durante o transporte e a movimentação constante das embalagens (MCDONALD e MILLIGAN, 1997; BARTON *et al.*, 1998).

O transporte é de extrema severidade aos animais como foi constatado em matrinxãs (*Brycon cephalus*) em estudo realizado por INOUE (2003) que observou uma excessiva perda de muco e escamas e agressões entre os peixes durante o transporte.

Durante o transporte, o principal precursor do estresse é a abrasão mecânica causada pelo inevitável contato entre os animais quando a densidade é elevada (ROSS e ROSS, 1999).

GOMES (2002) cita que embora o transporte seja uma das operações mais importantes da aquicultura, pouca atenção tem sido dada ao assunto no Brasil. O transporte como prática de manejo em piscicultura intensiva pode ter duração variada dependendo da finalidade. Os peixes vivos são transportados para diversos destinos, incluindo a indústria e os estabelecimentos voltados à pesca esportiva, no caso de peixes adultos, e estabelecimentos de criação de engorda, no caso de larvas e juvenis. Em todos os casos, os animais devem chegar apresentando boas condições fisiológicas para satisfazer os critérios exigidos pelo comprador (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

KUBITZA (1997) descreve como sendo comum a mortalidade de peixes devido à manipulação e ao transporte. Estes procedimentos rotineiros na aquicultura podem ser uma fonte importante de estresse à muitas espécies (WEIRICH e TOMASSO, 1993; CARNEIRO e URBINATI, 2001). A resposta dos peixes é parecida com a dos vertebrados terrestres, tendo como principal característica a liberação de adrenalina e cortisol em um primeiro instante, seguida por um quadro de hiperglicemia, diminuição de íons no sangue e aumento dos níveis de água nos tecidos, assim como aumento da taxa metabólica em peixes de água doce (MAZEAUD *et al.*, 1977; EDDY, 1981). Esse aumento da taxa metabólica é induzido por duas necessidades dos animais, a primeira é uma requisição por uma demanda maior de energia para lidar com o distúrbio, e a segunda é para corrigir o desequilíbrio iônico que acompanha essa maior liberação de energia (BARTON e IWAMA, 1991).

Os efeitos deste tipo de estresse agudo prejudicam o desempenho dos animais trazendo alterações no sistema imune, na osmoregulação, no metabolismo e na reprodução (PICKERING, 1981; BONGA, 1997; IWAMA *et al.*, 1997).

1.2 - Justificativa e Objetivos

Diante do fato de que o Brasil é um produtor potencial de carne de rã em cativeiro, existe a necessidade de se adequar ao máximo o confinamento às necessidades dos animais.

RIBEIRO FILHO (1998) afirma que problemas de manejo, deficiência alimentar, instalações inadequadas, má qualidade da água e doenças provocadas por fungos causa a morte de girinos. Este acontecimento nesta fase interfere negativamente na criação e pode ser decisivo no insucesso de um empreendimento comercial (CASTRO e PINTO, 2000).

Com base nestas e outras bibliografias consultadas, que se referem à produtividade dos ranários comerciais, entende-se que seria de grande importância o estudo da resposta de girinos de rã touro (*R. catesbeiana*), submetidos a tipos comuns de estresse que acontecem neste segmento da aquicultura (hipóxia, captura e transporte).

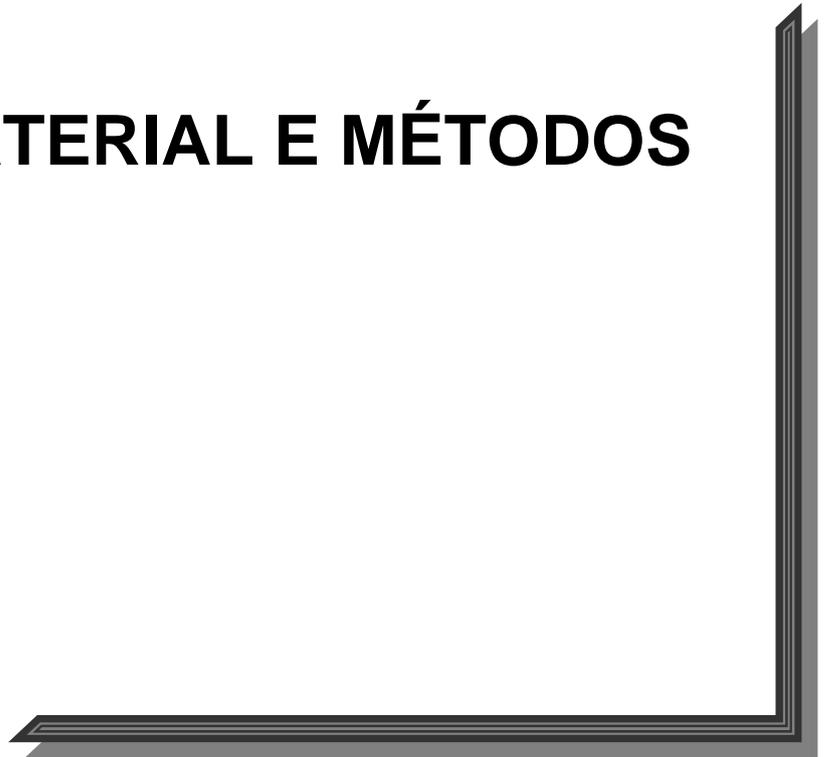
Uma das maneiras de alcançar esse objetivo e conseqüentemente maior produção é conhecer os mecanismos de combate ao estresse e suas respostas biológicas, que são importantes para a manutenção da saúde e bem-estar dos animais.

Para tanto, analisou-se os seguintes marcadores biológicos:

- ✓ Cortisol
- ✓ Glicemia
- ✓ Respostas hematológicas (Er, Ht, Hb, contagem total e diferencial dos leucócitos, total de trombócitos e os índices hematimétricos absolutos: VCM, HCM e CHCM)

Através da mensuração destes marcadores biológicos pretendeu-se avaliar o nível de estresse desenvolvido pelos animais diante de estressores como hipóxia, diferentes métodos de captura e transporte.

2 – MATERIAL E MÉTODOS



2.1 - Experimento 1 – Captura e Hipóxia

2.1.1 - Amostragem Biológica e Local de Experimentação

Foram utilizados 2.700 girinos de rã-touro, *R. catesbeiana* (Figura 1), no estágio 31 a 39 de GOSNER (1960), pró-metamorfose, dos quais 72 foram amostrados para a coleta de sangue. Os animais foram provenientes do Ranário Experimental do Centro de Aqüicultura da UNESP de Jaboticabal (CAUNESP).



FIGURA 1 - Girino de rã-touro (*Rana catesbeiana*) utilizado na experimentação

Os animais foram aclimatados por 7 dias em tanques de polipropileno (500 litros), na densidade de 1 girino/litro no Ranário Experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba, em Pindamonhangaba-SP (PRDTAVP). Tais tanques contendo 300 girinos cada, foram acondicionados sob proteção de uma estufa agrícola, tendo sua superfície coberta com plástico polietileno e suas laterais com sombrite 50% (Figura 2).



FIGURA 2 - Tanques de polipropileno (500 litros) adaptados com sistema hidráulico para entrada e escoamento da água em fluxo contínuo (A). Estufa agrícola coberta com polietileno e tela sombrite 50% (B)

2.1.2 - Alimentação e Manejo

Os animais foram alimentados com ração comercial marca Polinutri[®] (45% de proteína bruta, 6% FB e 9% EE), uma vez ao dia, na quantidade de 1% do peso vivo. A água dos tanques foi trocada, em sua totalidade, várias vezes ao dia (sistema de fluxo contínuo). A temperatura ambiente, a umidade relativa do ar e os parâmetros físicos e químicos da água (temperatura, condutividade elétrica, pH, oxigênio) foram monitorados diariamente. A amônia total e o nitrito foram medidos semanalmente com o uso de kit MERCK[®], e a amônia não ionizada (NH₃) foi estimada através de fórmula (APHA, 1998). Os eventuais animais mortos durante o período de experimentação foram retirados diariamente dos tanques (período da manhã) para que não prejudicassem a qualidade da água.

2.1.3 - Tratamentos

O experimento teve como controle, dados obtidos do sangue de animais (n = 10) que não sofreram nenhum tipo de tratamento. Foram retirados do tanque e imediatamente houve a coleta de sangue, este procedimento ocorreu em Jaboticabal antes mesmo do transporte dos animais à Pindamonhangaba.

Os tratamentos conduzidos foram: estresse por captura individual com puçá (Tratamento 1); estresse por captura em massa com puçá (Tratamento 2) e, estresse por captura por escoamento (Tratamento 3), que são os manejos tradicionalmente empregados na ranicultura. Cada tratamento foi conduzido com três réplicas simultâneas, ordenadas de maneira aleatória¹.

Após o período de aclimação os animais foram sorteados para compor os tratamentos de forma que cada tanque (réplica) abrigou 300 girinos. De cada réplica foram analisados 4 indivíduos (2 normóxia – coleta imediata de sangue, e 2 hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição aérea). Foram realizadas duas coletas com intervalo de 5 dias entre as mesmas (totalizando 72 girinos em todo o experimento). Após serem submetidos aos mecanismos estressores e antes da coleta de sangue os animais voltaram à água por 30 minutos (Figura 3).

O tempo de 15 minutos para hipóxia foi escolhido após realização de testes preliminares. Após este período fora da água os animais não sobreviviam quando retornavam ao meio aquático (Figura 4, Anexo 2).

¹ Puçá utilizado no tratamento 1 = 15 x 12 cm
Puçá utilizado no tratamento 2 = 30 x 24 cm
Cano de escoamento do tratamento 3 = 2 polegadas

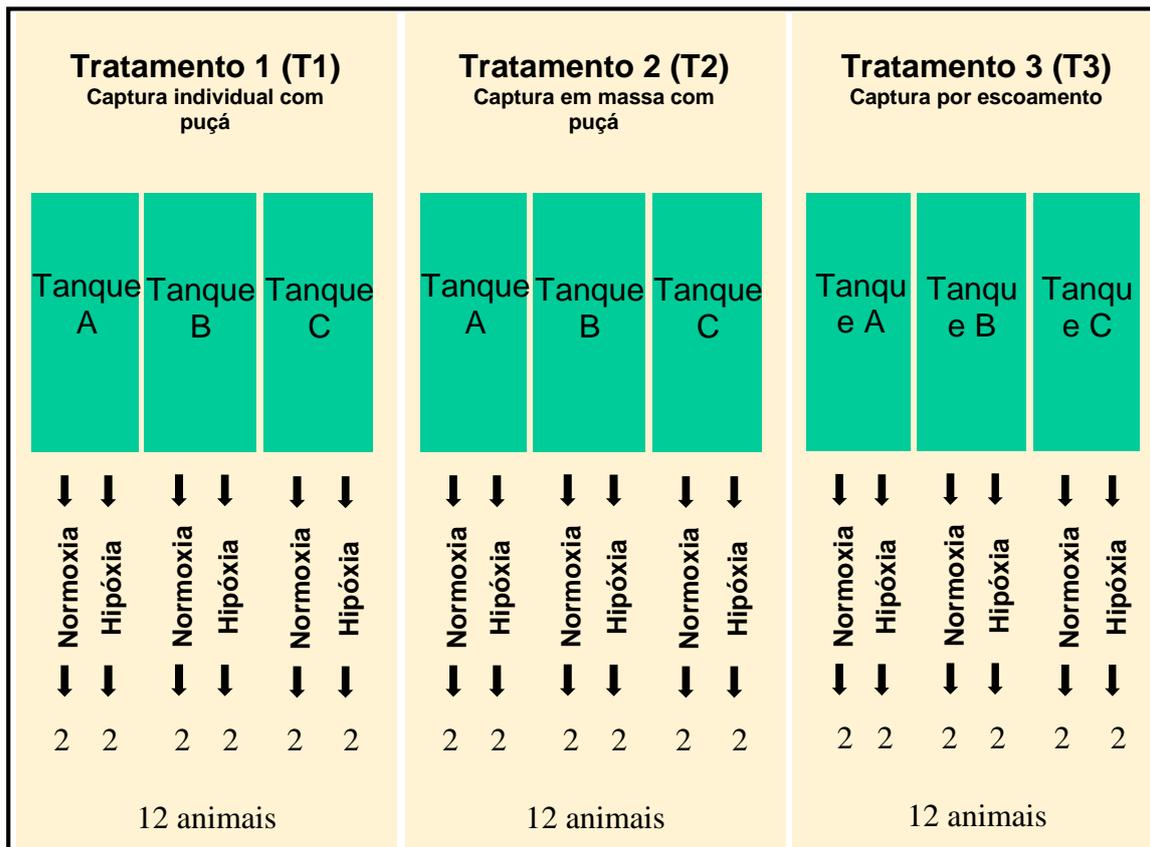


FIGURA 3 - Esquema do delineamento amostral dos tanques contendo girinos de *R. catesbeiana*, submetidos aos mecanismos estressores de captura e hipóxia



FIGURA 4 – Bandejas plásticas utilizadas para exposição aérea dos animais

2.1.4 - Coleta de sangue

Para a coleta de sangue os animais eram retirados dos tanques e submetidos a hipóxia em bandejas plásticas secas por 15 minutos (Figura 4) e, em seguida, retornavam a água por mais 30 minutos. Os animais em normóxia tinham o sangue coletado logo após a captura. Independente do método de captura (individual com puçá, em massa com puçá ou por escoamento) o procedimento após a saída do tanque era o mesmo. Uma alíquota de sangue foi retirada por punção do vaso caudal com auxílio de agulhas descartáveis e micropipetas com ponteiros heparinizados. As coletas foram realizadas sempre no período da manhã, respeitando-se o ritmo circadiano dos animais. O sangue foi utilizado imediatamente após a coleta para a realização da avaliação dos parâmetros hematológicos, o restante foi armazenado em microtubos de polipropileno heparinizados e mantido sob resfriamento até a centrifugação para a obtenção do plasma para a realização dos testes de quantificação de cortisol e glicose.

2.1.5 - Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos

As alíquotas de sangue (cerca de 100 µL/animal) utilizadas para as análises fisiológicas de dosagem dos marcadores biológicos foram centrifugadas a 5.000 rpm, por 5 minutos para a obtenção do plasma que foi congelado (-20 °C) até a realização das análises. Parte do plasma obtido foi destinada aos testes para determinação do cortisol plasmático através do método Elisa (Active – Cortisol EIA DSL10 – Diagnostic System Labs USA) e, a outra parte, foi destinada aos testes de glicemia, determinados com kit LABTEST[®].

Cortisol

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

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

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

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

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

Glicose

Da mesma forma aguardou-se até que todos os reagentes e amostras atingissem a temperatura ambiente (aprox. 25°C). Tomou-se então um tubo como “branco”, um como “padrão” e outros como “teste”. No branco foi adicionado 1,0 mL do “Reagente 1”, no “padrão” foi adicionado 1 mL de “Reagente 1” mais 10,0 µL de “Solução Padrão”, e nos tubos testes foram adicionados 1,0 mL de “Reagente 1” mais 10,0 µL de soro.

Misturou-se vigorosamente o conteúdo dos tubos e em seguida estes foram levados para o banho-maria a 37 °C, durante 15 minutos, tomando-se o cuidado de manter o nível da água acima do conteúdo dos tubos. Após o tempo de incubação procedeu-se à leitura em absorbância das amostras em espectrofotômetro a 505 nm acertando o zero com o branco (Figura 5). A

glicose foi estimada pela fórmula: Glicose (mg/dL) = absorvância do teste x 100/absorvância do padrão.



FIGURA 5 - Material e Equipamentos utilizados para leitura de placas de Elisa e glicemia, kit de cortisol e agitador (A), lavadora (B) e leitora placas de Elisa (C); kit de glicemia (D), banho Maria (E) e espectrofotômetro para leitura de glicemia(F)

2.1.6 - Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos avaliados e a metodologia seguiram as recomendações internacionais, a saber: número total de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente; hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944); contagem total e diferencial

dos leucócitos e total de trombócitos, em extensões sangüíneas coradas por método de ROSENFELD (1947). Ainda, com os resultados do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos absolutos: Volume Corpuscular Médio ($VCM = Ht \times 10/Er$ em fentonlitros), Hemoglobina Corpuscular Média ($HCM = Hb \times 100/Er$ em picogramas/célula), e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média ($CHCM = Hb \times 100/Ht$ em gramas/dL), segundo WINTROBE (1934). A metodologia utilizada nestas análises encontra-se descrita no Anexo 1 e o material utilizado pode ser visualizado na Figura 6.

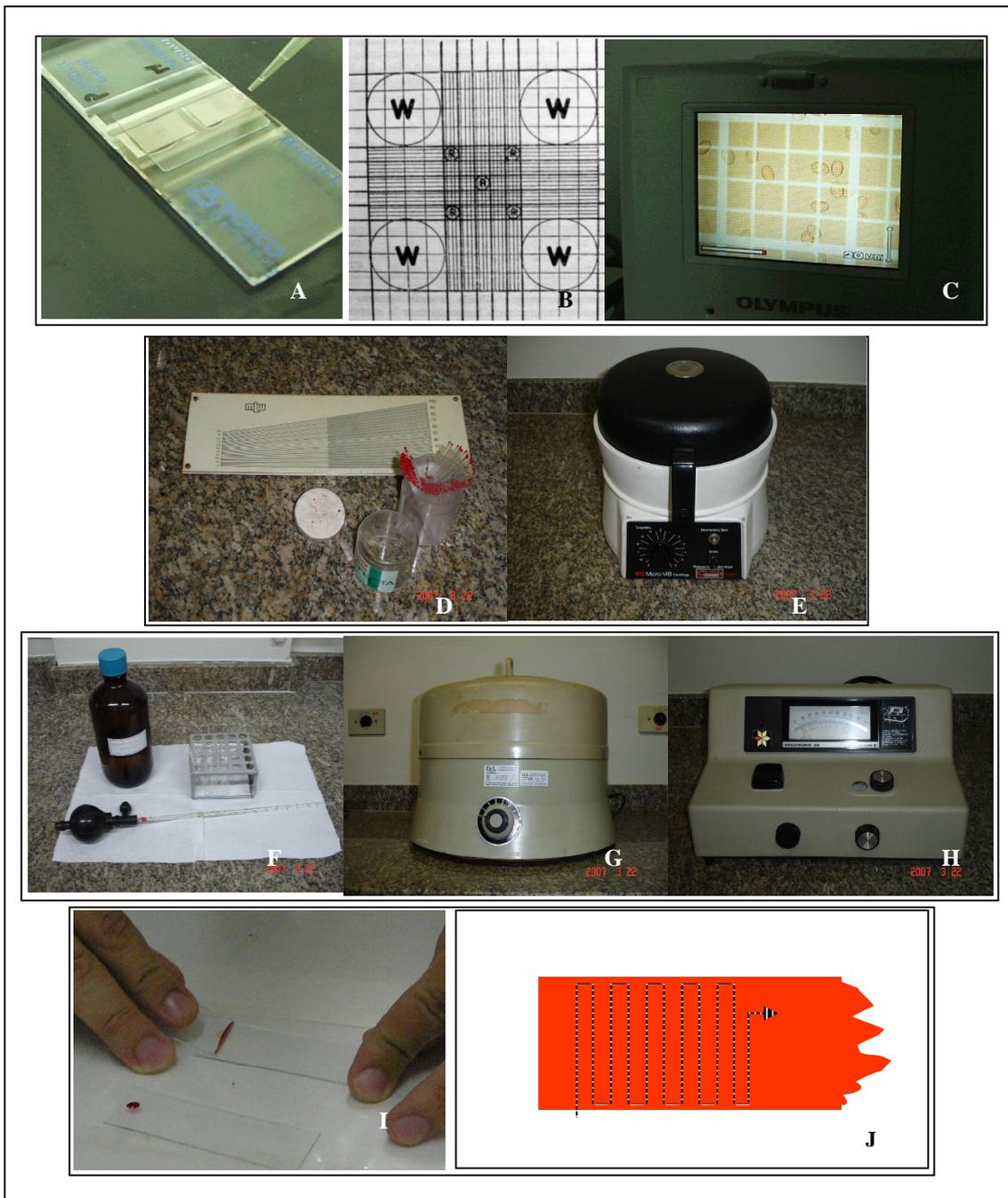


FIGURA 6 - Câmara de Neubauer (A), esquema do retículo (B) para a contagem de glóbulos vermelhos (R) e leucócitos (W); detalhe do retículo central (C); microhematócrito e leitor (D), centrífuga de hematócrito (E); cianometahemoglobina (F), centrífuga de tubos (G) e espectrofotômetro para leitura da hemoglobina (H); confecção das extensões sangüneas (I), esquema do procedimento da Contagem Diferencial e Total de Leucócitos e Total de Trombócitos (J)

2.2 - Experimento 2 - Transporte

2.2.1 - Procedimentos Experimentais

Foram utilizados girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, no estágio de pró-metamorfose, estágio 31 a 39 da tabela de GOSNER (1960), provenientes do Ranário Experimental do Centro de Aquicultura da UNESP de Jaboticabal (CAUNESP).

Inicialmente coletou-se sangue de 9 girinos logo após a retirada dos animais dos tanques (momento zero). Em seguida os animais foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno (1,00 X 0,60 m) na densidade de 3 girinos/litro, preenchidos com 2/3 de água oriunda de caixas d'água de abastecimento do setor de aquicultura e 1/3 de oxigênio. Estes sacos foram transportados de carro de Jaboticabal a São Paulo, em uma viagem com duração de 4 horas. Todo o procedimento (captura, embalagem e transporte) teve a duração de 6 horas (02:00 às 08:00h). Após a chegada, os animais foram aclimatados e divididos em aquários (1girino/L) de acordo com os diferentes tempos a serem testados. Os tempos definidos para as coletas de sangue (grupos) foram: 15, 30, 45, 60, 90 minutos e 24 horas após a chegada dos animais do ponto de partida.

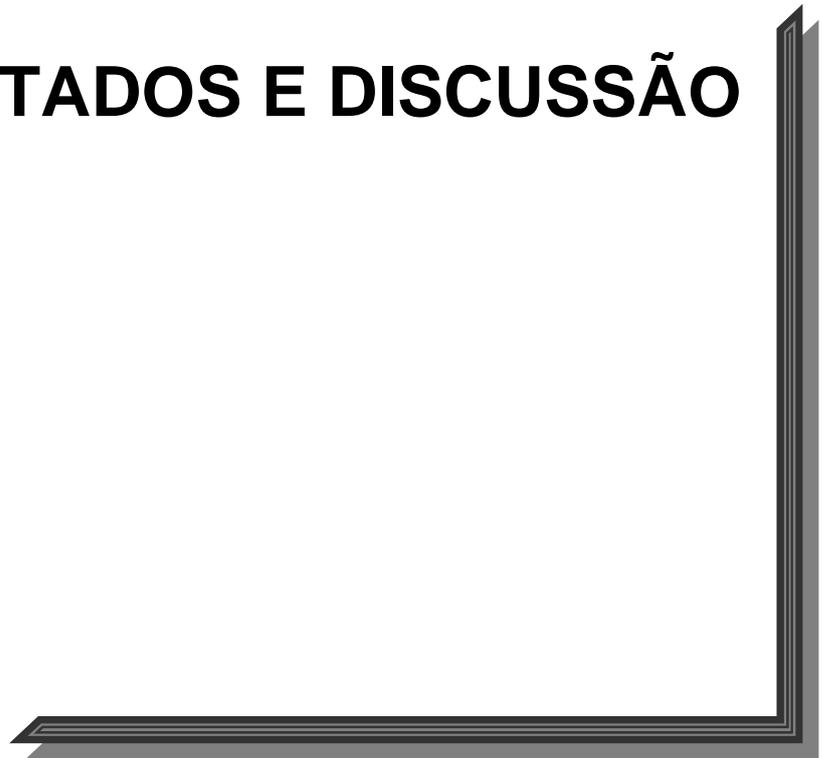
2.2.2 - Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca em São Paulo. Dez animais de cada grupo foram retirados dos aquários, respeitando-se os tempos amostrais. De cada indivíduo extraiu-se uma alíquota que foi armazenada em microtubos de polipropileno heparinizados e mantidos sob resfriamento até a centrifugação para a obtenção do plasma e realização dos testes de quantificação de cortisol, que seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente.

2.3 - Análise dos Resultados

Para verificar as diferenças entre os resultados dos dados das variações ambientais, dos parâmetros fisiológicos e hematológicos e dos diferentes tratamentos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1996).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



3.1 - Experimento 1 - Captura e Hipóxia

3.1.1 - Dados biológicos e variações ambientais

Durante toda a experimentação a mortalidade foi mínima representando 1,57% dos animais (41 dos 2.700 girinos). Os organismos utilizados nas coletas apresentaram peso médio de $9,5 \pm 1,05$ g e comprimento médio de $11,96 \pm 1,31$ cm.

Em relação à temperatura ambiente, podemos observar, com termômetros de máxima e mínima, uma variação de 17,0 a 35,9 °C e a umidade relativa do ar, apresentou média de 75%.

Os resultados referentes ao monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tanques dos diversos tratamentos, que pudessem interferir na experimentação. Esses resultados estão dispostos na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores médios e desvio padrão da temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica, obtidos nos tanques durante realização do experimento

	T	O. D.	pH	C. E.
T1	$24,03 \pm 0,70$	$3,18 \pm 0,89$	$6,85 \pm 0,12$	$54,97 \pm 4,48$
T2	$23,98 \pm 0,78$	$3,09 \pm 0,83$	$6,89 \pm 0,17$	$55,03 \pm 4,07$
T3	$24,07 \pm 0,79$	$3,31 \pm 0,81$	$6,86 \pm 0,10$	$53,71 \pm 3,55$

T1 - tratamento 1 (captura individual com puçá)

T2 - tratamento 2 (captura em massa com puçá)

T3 - tratamento 3 (captura por escoamento)

T - temperatura (°C); O.D. - oxigênio dissolvido (mg/L); pH – potencial hidrogeniônico e C.E. - condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

Os parâmetros medidos semanalmente apresentaram resultados semelhantes (sem diferença estatisticamente significante), em todos os tanques independentemente do tratamento aplicado aos animais. A análise da

amônia total teve como resultado médio 0,05 mg/L, enquanto nitrito não foi detectado em nenhum dos tanques. Com os resultados de amônia total, temperatura e pH estimou-se a amônia não ionozável (NH₃) que apresentou resultado médio de 0,19 µg/L.

A presença de altas quantidades de amônia seria extremamente maléfica aos animais do experimento, tendo em vista que, ela se transforma em nitrito e em nitrato por ação de bactérias nitrificantes. Esse processo de transformação: amônia (NH₃ - tóxica) - nitrito (NO₂ - tóxico) - nitrato (NO₃ - tóxico somente em altas quantidades) é uma das causas mais comuns de mortalidade em tanques de girinos (FERREIRA, 2003).

Os parâmetros físicos e químicos da água apresentados durante o presente experimento satisfazem os padrões mínimos exigidos para criação de organismos aquáticos, exceto o baixo nível de oxigênio dissolvido, que segundo SAMPLE (1994) não deveria ser (para piscicultura) inferior a 5 mg/L, fato que, aparentemente, não causou mortalidade nos tanques experimentais.

3.1.2 - Análise de Cortisol

Os valores médios de cortisol plasmático do grupo controle e dos diferentes tratamentos durante a 1^a e 2^a coleta encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 - Valores médios (X) de cortisol plasmático (ng/mL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos mecanismos estressores de captura e hipóxia, nos diferentes tratamentos e períodos de coleta (n = 82)

Coleta		T1		T2		T3	
		N	H	N	H	N	H
1 ^a	Controle						
		2,20 ± 0,50	3,00 ± 2,70	3,20 ± 1,90	3,80 ± 2,20	3,30 ± 1,30	2,50 ± 1,10
2 ^a	3,71 ± 1,46	2,35 ± 1,20	3,60 ± 1,20	5,00 ± 2,30	2,50 ± 2,20	3,10 ± 1,60	2,14 ± 1,32

T1 – captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento

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

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os distintos tratamentos testados, na 1^a e 2^a coleta (Tabela 3). Quando os dados foram ordenados (estabelecimento de postos) estas diferenças significativas não foram evidenciadas (Figuras 7 e 8).

TABELA 3 – Análise de Variância (ANOVA) realizada com resultados da quantificação de cortisol plasmático em girinos de rã-touro.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio
Tratamentos	5	19,964	3,327
Residuais	50	140,64	2,813
Total	56	160,61	

F = 1,183

p = 0,330

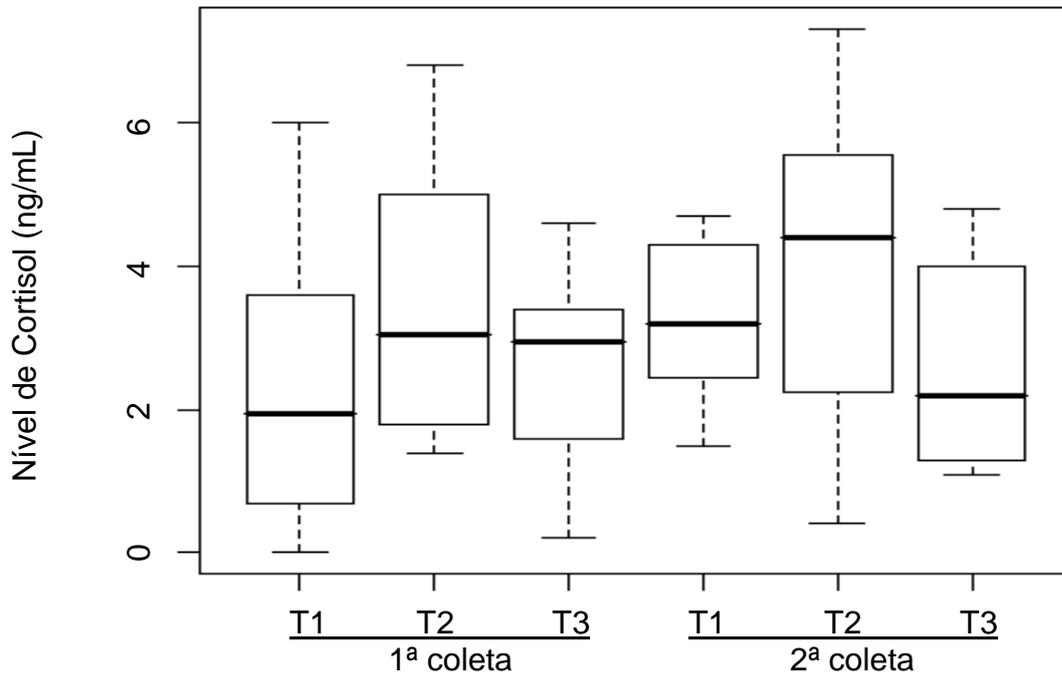


FIGURA 7 - Valores de cortisol plasmático (ng/mL) nos distintos tratamentos e coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente

T1 - tratamento 1 (captura individual com puçá)

T2 - tratamento 2 (captura em massa com puçá)

T3 - tratamento 3 (captura por escoamento)

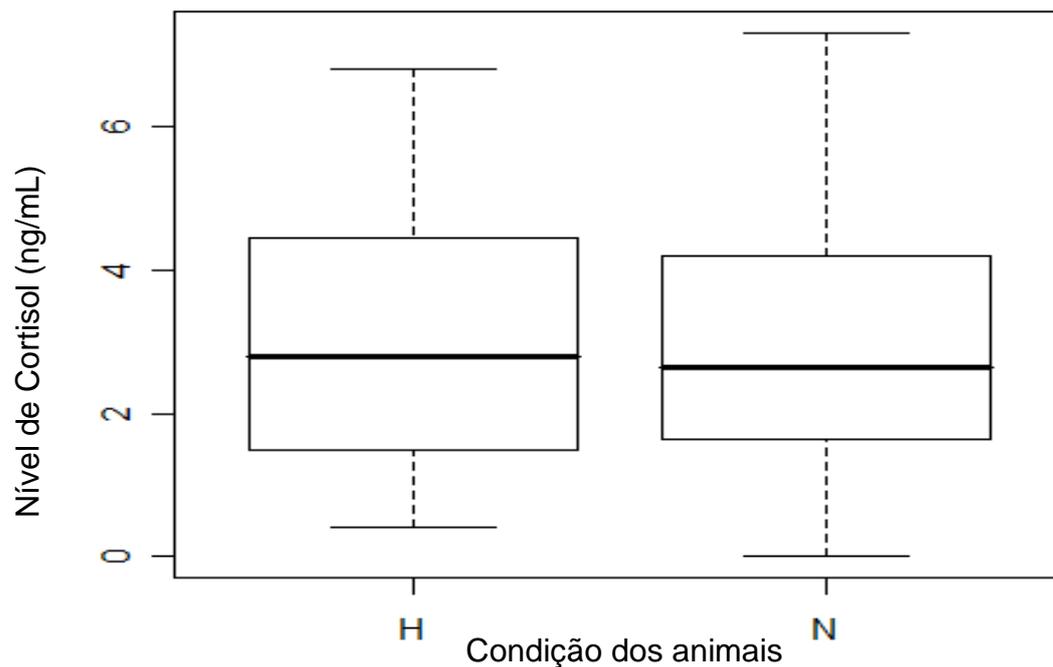


FIGURA 8 - Valores de cortisol plasmático (ng/mL) obtidos a partir de animais que foram privados (H) ou não (N) de oxigênio nas coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente

O cortisol é um hormônio necessário para a sobrevivência de organismos estressados (HILL e WYSE, 1989). GUYTON e HALL (2002) afirmam que estresses significativos estimulam acentuadamente a tríade de liberação seqüencial de hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol. Fisiologicamente o CRH liberado no hipotálamo estimula a produção de ACTH, que por sua vez estimula a liberação de cortisol no córtex-supra-renal. No presente trabalho, valores de cortisol obtidos não evidenciaram quaisquer diferenças entre os três métodos de manejo testados, (captura individual com puçá, captura em massa com puçá ou captura por escoamento). Em outras palavras, sob este ponto de vista, todos estes métodos poderiam ser utilizados sem causar substanciais alterações na concentração de cortisol circulante e, conseqüentes danos à saúde dos girinos de *R. catesbeiana*. Como o método de captura por escoamento é mais rápido e eficiente ele seria o mais indicado para as criações comerciais de rãs.

Na literatura, encontram-se valores de cortisol com grande variação, fato que pode ser atribuído a eventos que afetam a liberação do mesmo pelo organismo, tais como o estágio de desenvolvimento e maturação sexual, estação do ano, temperatura, ritmo circadiano e o método utilizado para a coleta do plasma (PANKHURST e SHARPLES, 1992; IWAMA, 1993).

Os valores médios de cortisol plasmático para girinos de rã-touro obtidos durante esta experimentação variaram de 2,1 a 5,0 ng/mL, mais altos dos que os encontrados por WRIGHT *et al.* (2003) que variam de 0,8 a 1,08 ng/mL. Provavelmente nossos resultados foram influenciados pela baixa quantidade de oxigênio dissolvido nos tanques, e os reportados pelos autores acima, são provenientes de experimentos realizados em laboratório, com fotoperíodo e condições físicas e químicas da água controladas, além de suas determinações terem sido feitas por radioimunoensaio. Já os valores detectados por KRUG *et al.* (1983) variaram de 12 e 22,3 ng/mL, no período de pró-metamorfose e clímax, respectivamente. Entretanto, eles reportaram incertezas qualitativas sobre o material mensurado denominando estas substâncias quantificadas de “material cortisol-like”.

BARTON e IWAMA (1991) atestam que o padrão de resposta do cortisol, na maioria das espécies de peixes, após distúrbios agudos consiste em rápida elevação (minutos) seguida de declínio lento (horas ou dias). Além dos diferentes tipos de captura testados neste estudo, o mecanismo estressor empregado foi, 15 minutos de hipóxia, seguido de 30 minutos de repouso na água, antes da extração de sangue, com a intenção de seguir-se o modelo padrão de liberação de cortisol em vertebrados, que é de 30 minutos após o evento estressor (BARCELLOS *et al.*, 2000; SLOMAN *et al.*, 2001). Contudo, este tempo para a amostragem não foi suficiente para evidenciar uma elevação nos valores plasmáticos deste hormônio, sugerindo que estudos adicionais com quantificações em série temporal de cortisol em *R. catesbeiana* fossem realizados.

Com base nesta necessidade TEIXEIRA (2007) trabalhando com girinos da mesma espécie e fase de desenvolvimento, quantificou os valores de cortisol plasmático em diferentes tempos (0, 15, 30, 45, 60, 90 minutos), após exposição aérea de 15 minutos. Seus resultados indicaram não haver diferenças estaticamente significativas entre os valores de cortisol encontrados, sendo que o valor médio desse hormônio obtido nessa experimentação foi de 3,38 ng/mL.

Entretanto, estudos realizados com peixes (*Oncorhynchus mykiss*) submetidos a estresse por exposição ao ar durante 30 segundos e com coleta de sangue 30 minutos após este procedimento, evidenciaram que os níveis de cortisol foram significativamente maiores nos animais que foram expostos ao ar quando comparados aos níveis dos indivíduos não expostos (SLOMAN *et al.*, 2001). Já BARCELLOS *et al.* (2000) observaram que exemplares de *Rhamdia quelen* submetidos a procedimentos de captura e transferência de tanque, apresentaram um pico de cortisol uma hora após o procedimento. POTTINGER (1998) em seus estudos simulou distúrbios naturais que ocorrem durante a pesca (captura e exposição aérea) de *Cyprinus carpio*, provocando aumento nos níveis plasmáticos de cortisol e retorno aos valores basais 24 horas mais tarde.

3.1.3 – Análise da Glicemia

Os valores de glicemia dos diferentes tratamentos durante s 1^a e 2^a coleta encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 - Valores médios (X) de glicose plasmática (mg/dL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia, nos diferentes tempos de coleta

Coleta	T1		T2		T3	
	N	H	N	H	N	H
1 ^a	67,67 ± 24,16	99,80 ± 19,46	62,00 ± 30,82	55,80 ± 42,58	68,50 ± 43,04	49,33 ± 7,61
2 ^a	80,00 ± 34,42	92,40 ± 19,71	56,67 ± 32,72	89,00 ± 17,35	104,33 ± 22,30	87,33 ± 35,35

T1 – captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento (N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar

Assim como nos resultados das determinações de cortisol não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os distintos tratamentos testados, entre os dados da 1^a e 2^a coleta (Tabela 5). Quando os dados foram ordenados (estabelecimento de postos) estas diferenças não evidenciadas (Figura 9 e 10).

TABELA 5 - Valores de significância (F e P) dos resultados estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) nos distintos tratamentos, coletas e animais que foram ou não privados de oxigênio

	F	p
Tratamentos 1^a coleta	1,73	0,16
Tratamentos 2^a coleta	0,93	0,48
1^a coleta e 2^a coleta	1,52	0,20
Normóxia e Hipóxia	1,03	0,44

p – nível de significância

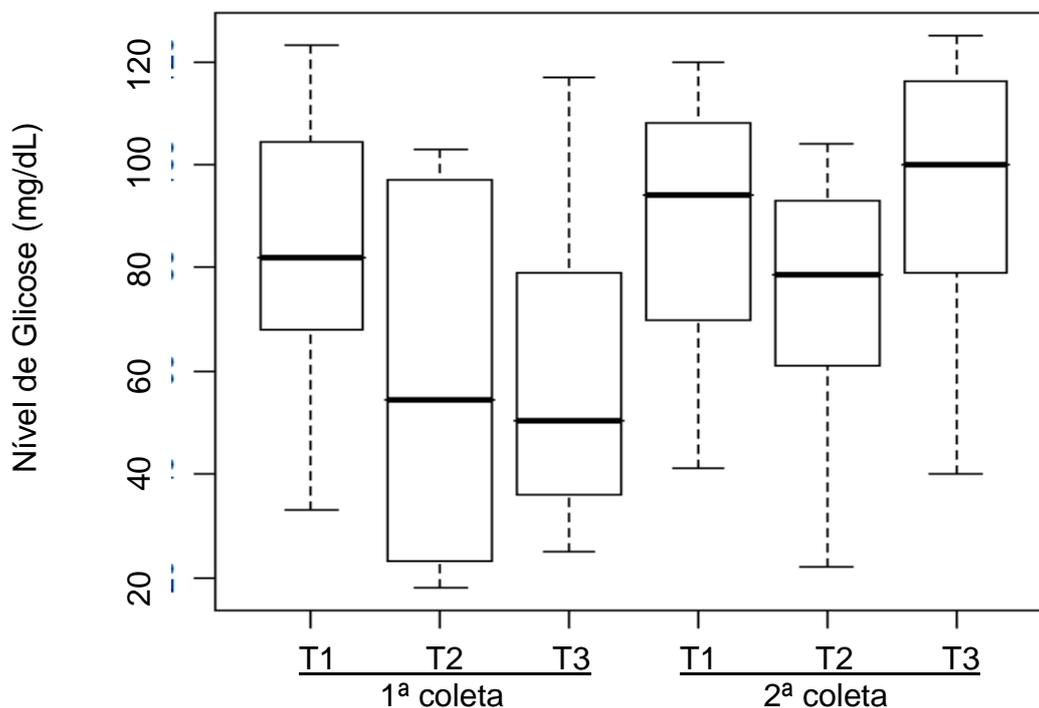


FIGURA 9 - Valores de glicose plasmática (mg/dL) nos distintos tratamentos e coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente
T1 - tratamento 1 (captura individual com puçá)
T2 - tratamento 2 (captura em massa com puçá)
T3 - tratamento 3 (captura por escoamento)

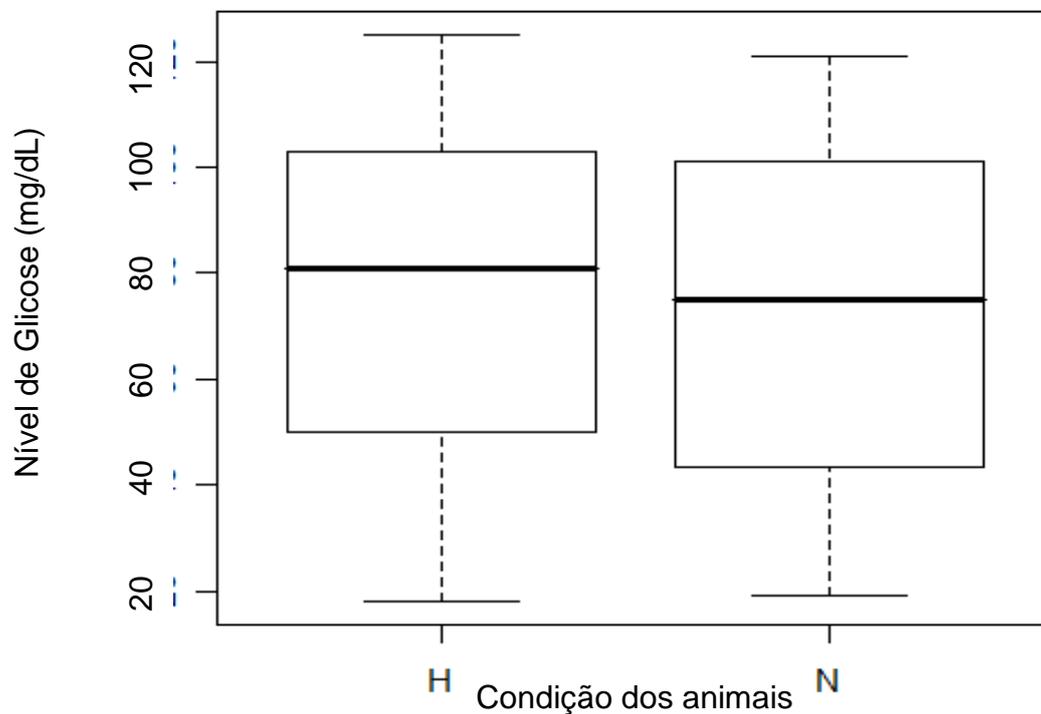


FIGURA 10 - Valores de glicose plasmática (mg/dL) obtidos a partir de animais que foram privados (H) ou não (N) de oxigênio nas coletas realizadas durante a experimentação com girinos de *R. catesbeiana*. O gráfico é expresso em Box-plot onde as barras representam as medianas, as bases e os topos dos retângulos 25 e 75% da amostra, respectivamente

WIJAYAN *et al.* (1991; 1994) afirmam que a elevação da glicemia em peixes, como resposta ao estresse, deve-se a ação das catecolaminas que estimulam a glicogenólise, enquanto que a manutenção destes altos níveis de glicemia é mantida pelo cortisol, que age após a adrenalina.

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

Os valores médios encontrados para este parâmetro na literatura são bem distintos e encontram-se resumidos na Tabela 6.

TABELA 6 - Valores médios (X) de glicose plasmática de anuros do gênero *Rana*

Autor / Espécie	Variação de glicemia
Presente trabalho / <i>R. catesbeiana</i>	49,33 a 104,33 mg/dL
SMITH (1954) / <i>R. temporaria</i>	38 ± 1,4 mg%
WRIGHT (1959) / <i>R. catesbeiana</i>	13,51 mg%
BYRNE e WHITE (1975) / <i>R. catesbeiana</i>	40 e 50 mg%
HUTCHISON e TURKEY (1975) / <i>R. pipiens</i>	24,5 ± 3,0 mg%
WANG e CHANG (1994) / <i>R. catesbeiana</i>	20 a 64 mg/dL
STÉFANI (1996) / <i>R. catesbeiana</i>	48,97 a 55,86 mg%
COPPO <i>et al.</i> , 2005 / <i>R. catesbeiana</i>	50 ± 12 mg/dL
TEIXEIRA 2007 / <i>R. catesbeiana</i>	9,31 a 30,87 mg/dL

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

desenvolvimento (girino X rã adulta) e a presença ou não de um estímulo estressor.

3.1.4 - Parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros hematológicos (Ht, Hb e Er) obtidos nas duas coletas estão descritos na Tabela 7. Com os resultados do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos absolutos: Volume Corpuscular Médio (VCM = $Ht \times 10/Er$ em fentonlitros), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM = $Hb \times 100/Er$ em picogramas/célula), e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM = $Hb \times 100/Ht$ em gramas/dL) (Tabela 8).

TABELA 7 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos (Ht, Hb e Er) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia

	Ht	Hb	Er
	X ± EPM	X ± EPM	X ± EPM
1ª coleta			
T1 (N)	22,70±6,03	6,52±0,45	44,42±3,38
T1(H)	29,70±1,69	5,43±0,37	55,00±7,07
T2 (N)	33,82±2,88	6,25±0,45	53,00±4,05
T2(H)	30,15±2,56	5,76±0,38	55,50±8,62
T3(N)	32,74±1,71	6,17±0,32	46,92±12,6
T3(H)	25,94±2,66	5,40±0,04	46,92±5,33
2ª coleta			
T1 (N)	34,83±0,96	5,75±0,29	50,33±6,69
T1(H)	32,13±0,76	5,35±0,36	44,33±9,79
T2 (N)	30,78±2,19	5,65±0,46	58,17±11,4
T2(H)	32,18±2,13	5,92±0,42	42,25±12,2
T3(N)	28,60±4,23	5,62±0,53	48,17±7,60
T3(H)	29,03±1,96	5,70±0,36	50,92±6,59
F	1,06 ^{NS}	0,55 ^{NS}	0,33 ^{NS}

Ht - hematócrito (%); Hb – taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er – número de eritrócitos ($10^4/mm^3$)

T1- Tratamento 1 – captura individual com puçá; T2- Tratamento 2 – captura em massa com puçá; T3- Tratamento 3 – captura por escoamento

(N) Normóxia - coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar ^{NS} – não significativo

TABELA 8 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos os índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia

	VCM	HCM	CHCM
	X ± EPM	X ± EPM	X ± EPM
1ª coleta			
T1 (N)	529,04±156,24	152,94±10,38	19,69±0,42
T1(H)	564,18±94,40	102,35±7,70	19,39±2,28
T2 (N)	658,55±85,42	120,41±14,09	17,75±0,28
T2(H)	573,94±36,59	110,59±8,38	19,89±1,82
T3(N)	988,56±248,27	242,77±51,17	19,32±0,15
T3(H)	599,14±80,27	130,81±18,17	21,86±2,27
2ª coleta			
T1 (N)	694,69±55,99	106,62±7,13	16,99±1,00
T1(H)	1158,61±402,04	197,17±71,46	16,62±1,05
T2 (N)	750,37±278,25	150,38±50,29	18,44±2,36
T2(H)	1273,65±365,5	220,44±72,30	17,84±1,00
T3(N)	757,87±236,79	133,10±29,46	20,13±2,27
T3(H)	651,14±129,14	106,90±15,20	18,67±0,74
F	0,93 ^{NS}	0,97 ^{NS}	0,53 ^{NS}

VCM- volume corpuscular médio (ft); HCM – hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média (%)

T1- Tratamento 1 – captura individual com puçá; T2- Tratamento 2 – captura em massa com puçá; T3- Tratamento 3 – captura por escoamento

(N) Normóxia - coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue no tempo de 15 minutos de exposição ao ar

^{NS} – não significativo

Após a análise de variância não foram evidenciadas diferenças significativas entre os parâmetros hematológicos dos animais submetidos ao estresse dos distintos tratamentos testados, da 1ª e 2ª coletas e entre os animais que foram ou não privados de oxigênio.

Os resultados da contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos) realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz são representados pelas Figuras 11 e 12.

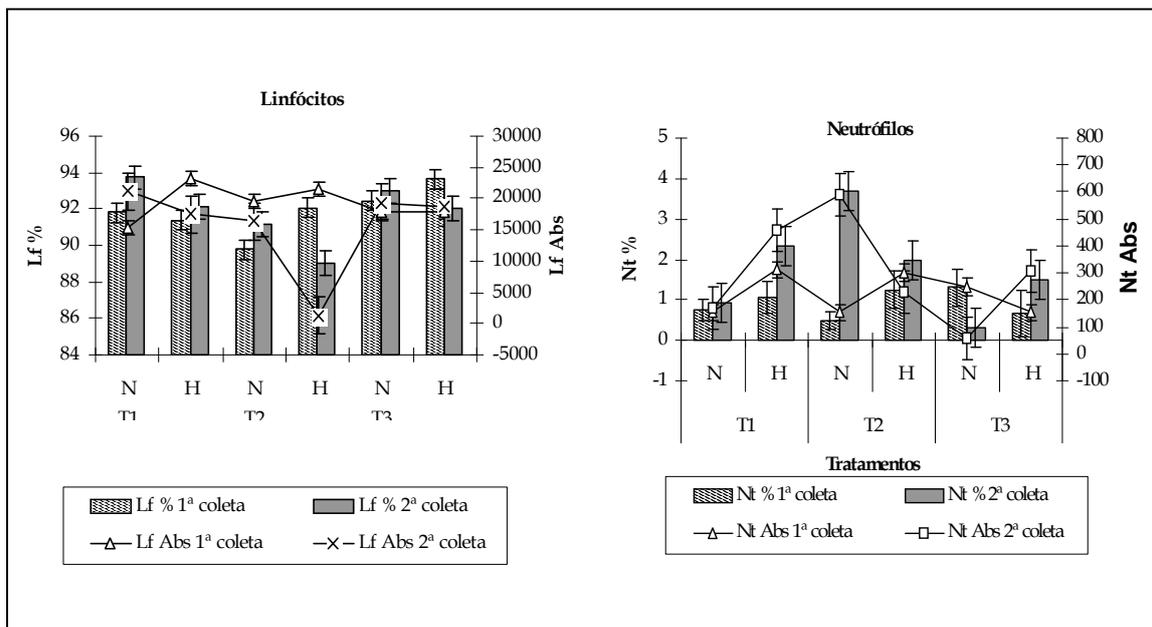


FIGURA 11 - Valores médios (X) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia. T1 –captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento. (N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar; Lf% - porcentagem de linfócitos; Nt% - porcentagem de neutrófilos; Lf abs - número absoluto de linfócitos e Nt abs - número absoluto de neutrófilos

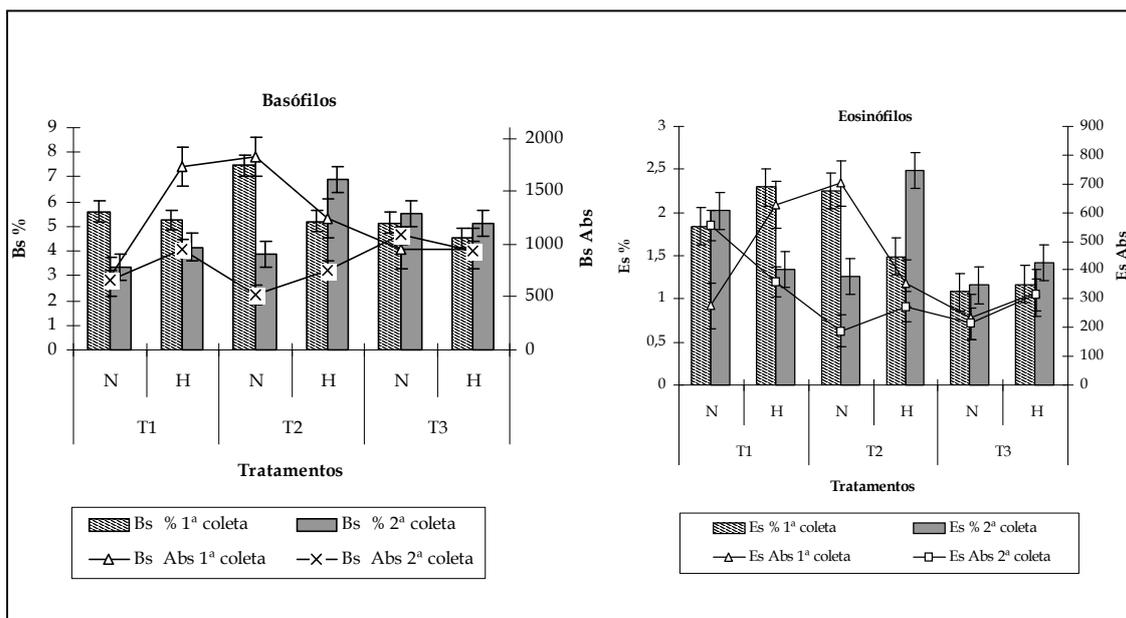


FIGURA 12 - Valores médios (\bar{X}) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos aos efeitos estressores de captura e hipóxia. T1 – captura individual com puçá; T2 – captura em massa com puçá e T3 – captura por escoamento. (N) Normóxia – coleta de sangue imediata; (H) Hipóxia – coleta de sangue após 15 minutos de exposição ao ar; Bs% - porcentagem de basófilos; Es% - porcentagem de eosinófilos; Bs abs - número absoluto de basófilos e Es abs - número absoluto de eosinófilos

A análise de variância não evidenciou diferenças significativas entre os parâmetros hematológicos dos animais submetidos ao estresse dos distintos tratamentos testados, da 1ª e 2ª coletas e entre os animais que foram ou não privados de oxigênio.

Trabalhos na mesma linha realizados por PICKERING *et al.* (1982) utilizando truta (*Salmo trutta*) e ELLSAESSER e CLEM (1986) utilizando catfish (*Ictalurus punctatus*), também não observaram diferenças significativas quanto ao número de eritrócitos e demais parâmetros hematológicos. Entretanto, KEBUS *et al.* (1992) e IWAMA (1993) afirmam que a imunodeficiência resultante da resposta ao estresse apresenta correlação negativa com a elevação do cortisol plasmático, levando a diminuição do número de linfócitos circulantes. Ainda, PICKERING *et al.* (1982) observaram que um simples

estresse de manejo de 2 animais causou linfopenia em *Salmo trutta* após 8 horas e que foram necessárias 72 horas para recuperação aos níveis basais.

FERREIRA (2002) e MARCANTÔNIO (2005) relatam que os leucócitos mais abundantes no sangue de girinos de *R. catesbeiana* são os linfócitos. Este mesmo resultado foi encontrado no presente trabalho: Lf = $91,85 \pm 0,57\%$. Os demais leucócitos quantificados foram: NT = $1,36 \pm 0,38 \%$; Bs = $5,18 \pm 0,48 \%$ e Es = $1,65 \pm 0,20 \%$, não foram detectados monócitos. Os resultados obtidos na contagem de leucócitos estão muito próximos aos de FERREIRA (2002): Lf = $88,0 \pm 1,4\%$; NT = $3,8 \pm 0,9\%$; Bs = $5,8 \pm 0,7\%$; Es = $2,0 \pm 0,3\%$ e Mn = $0,4 \pm 0,1\%$ e também se assemelham com os de FRANÇA (2007) que trabalhou com imagos recém metamorfoseados: Lf = $82,64 \pm 2,86\%$; Nt = $8,61 \pm 1,98\%$; Bs = $6,38 \pm 1,45\%$; Es = $1,82 \pm 0,41\%$ e Mn = $0,56 \pm 0,24\%$.

Para efeitos comparativos os resultados de FRANÇA (2007), DIAS (2006) e COPPO (2003) relatando valores médios encontrados em indivíduos de *R. catesbeiana* em diferentes estágios de desenvolvimento são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - Valores médios (X) e erro padrão (EPM) de parâmetros hematológicos de rã-touro, *R. catesbeiana*

AUTOR/ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO	PARÂMETRO HEMATOLÓGICO					
	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
PRESENTE TRABALHO (girino)	30,22 ± 1,39	5,92 ± 0,15	49,66 ± 2,05	732,1 ± 97,44	147,87 ± 19,40	18,88 ± 0,60
COPPO (2003) (adulto)	30,10	6,80 ± 1,48	42,00	709,00	157,00	23,30
DIAS (2006) (adulto)	30,17 ± 1,92	9,73 ± 0,34	47,67 ± 8,96	713,59 ± 9,46	234,77 ± 0,33	32,72 ± 1,72
FRANÇA (2007) (girino)	15,94 ± 1,87	3,20 ± 0,43	29,53 ± 6,02	584,5 ± 87,4	117,0 ± 14,0	20,23 ± 2,93
FRANÇA (2007) (imago)	19,76 ± 1,93	5,33 ± 0,25	28,38 ± 3,09	688,2 ± 49,9	191,24 ± 10,0	28,01 ± 2,80
TEIXEIRA (2007) (girino)	18,33 ± 2,51	3,67 ± 0,49	25,43 ± 3,68	816,05 ± 111,71	158,89 ± 23,99	22,81 ± 3,76

Ht - hematócrito (%); Hb – taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er – número de eritrócitos ($10^4/\text{mm}^3$); VCM – volume corpuscular médio (fL); HCM – hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média (%)

Comparando-se os valores de hematócrito e hemoglobina encontrados no presente trabalho (Ht = 30,22 ± 1,39 % e Hb = ± 0,15 g/dL) com o de outros trabalhos podemos observar que nossos valores são semelhantes aos encontrados por CATHERS (1997) e COPPO (2003) em *R. catesbeiana* (Ht = 22,00 ± 5,00 % e Hb = 4,7±0,9 g/dL) e (Ht = 30,10 % e Hb = 6,80 ± 1,48 g/dL) respectivamente. Quando comparamos nossos resultados com outras espécies, *Rana tigrina* (Ht = 19,5 – 31,8 % e Hb = 3,87–6,22 g/dL) estudado por SINGH (1978) e *Bufo sp.* (Ht = 36 – 44 %) por COPPO (2001) também apresentam resultados próximos.

Já TEIXEIRA (2007) trabalhando com girinos da mesma espécie e do mesmo estágio de desenvolvimento, e submetendo estes organismos ao estresse por densidade (1, 5 e 10 girinos/L) e hipóxia, reportou uma redução no número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos aos 12 dias de experimentação, mas sem prejuízo à saúde dos animais.

Mesmo não tendo sido modificada pelos mecanismos estressores testados as informações coletadas são valiosas para análise e composição dos valores hematológicos basais, ou considerados normais, para organismos desta espécie. Trata-se de um ponto de partida para futuras comparações com animais submetidos a condições adversas. Entretanto, a partir destes dados pouco se pode inferir sobre animais em situação de estresse, pois trabalhos nesta linha de pesquisa ainda são escassos.

3.2 - Experimento 2- Transporte

Os valores médios de cortisol plasmático dos animais submetidos ao estresse causados por transporte (4 horas), nos diferentes tempos de coleta estão apresentados na Tabela 10 e na Figura 13.

TABELA 10 – Valores médios (X) de cortisol plasmático (ng/mL) e desvio padrão (DP) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos ao mecanismo estressor de transporte, nos diferentes tempos de coleta

	MZ	0T	15T	30T	45T	60T	90T	24h
Cortisol	3,71 ±	2,67 ±	4,71 ±	4,53 ±	2,95 ±	2,35 ±	2,89 ±	2,29 ±
(ng/mL)	1,46	1,40	2,15	2,45	1,29	2,40	0,45	0,59

MZ- antes do transporte; 0T- momento zero após transporte; 15T- 15 minutos após transporte; 30T- 30 minutos após transporte; 45T- 45 minutos após transporte; 60T- 60 minutos após transporte; 90T- 90 minutos após transporte; 24T- 24 horas após transporte

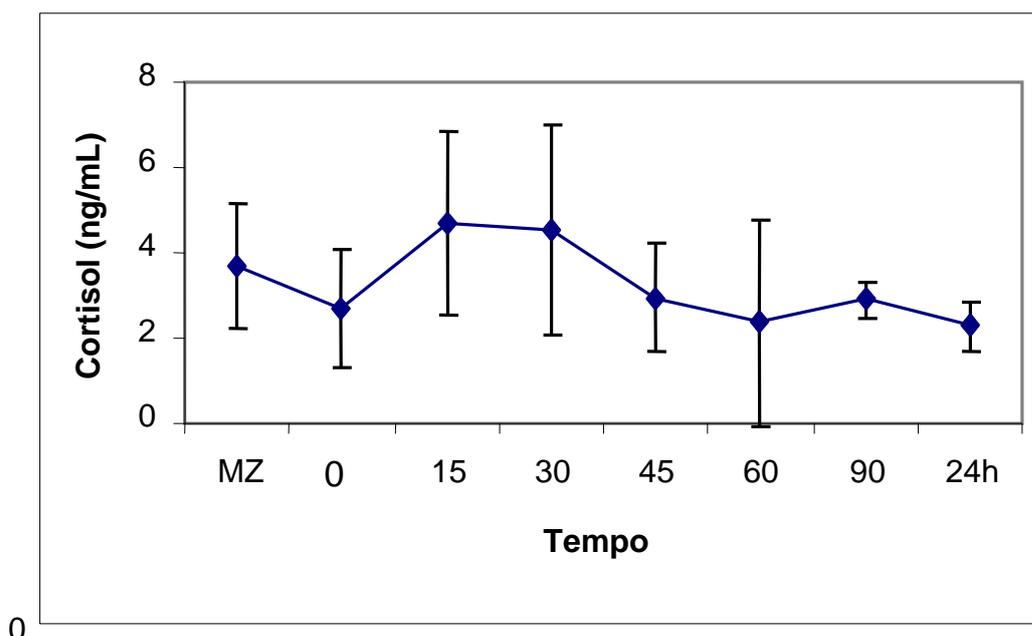


FIGURA 13 - Valores médios (X) e desvio padrão da média (EPM) da quantificação de cortisol plasmático (ng/mL) de girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*, submetidos ao efeito estressor de transporte. MZ - antes do transporte; 0T - momento zero após transporte; 15T - 15 minutos após transporte; 30T - 30 minutos após transporte; 45T - 45 minutos após transporte; 60T - 60 minutos após transporte; 90T - 90 minutos após transporte; 24T - 24 horas após transporte

A análise estatística indicou não haver diferenças significativas nos valores de cortisol plasmático dos animais expostos ao estresse por transporte nos diferentes tempos de coleta, nem mesmo quando comparados aos de animais que não sofreram esse tipo de estresse.

Apesar de o transporte representar um grande problema à piscicultura, onde são observadas alterações na liberação de cortisol e glicose (ARENDS *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003; BRANDÃO *et al.*, 2006), esse fato não ocorreu com girinos de rã-touro, submetidos a esta situação de estresse neste último experimento.

Singularmente, para estes organismos é provável que, as diferenças entre a os parâmetros físicos e químicos da água (pH, condutividade elétrica, alcalinidade e dureza total, amônia, nitrito, nitrato, fósforo, cloretos, ferro, entre outros), do ponto de origem e o destino, e condições inadequadas de

aclimação representem maiores prejuízos aos animais do que o próprio transporte (FERREIRA, 2003).

Dados de qualidade de água de ranários comerciais analisadas por este mesmo autor demonstram que girinos de rã-touro são mais resistentes do que a maioria dos peixes, em relação às condições da água em que vivem. Essa condição fisiológica faz com que alguns anfíbios sejam conhecidos como "homebodies", termo que faz referência à grande capacidade adaptativa desses animais a condições adversas (SCHUYTEMA *et al.*, 1991; BUENO-GUIMARÃES, 1999 e FERREIRA, 2002). Essa capacidade de adaptação foi observada no decorrer dos experimentos, durante todo o tempo em que os animais foram mantidos nos tanques de polipropileno no Ranário Experimental, pois o nível de oxigênio dissolvido da água ($3,20 \pm 0,20$ mg/L) foi abaixo do recomendado (5,00 mg/L) para criação de organismos aquáticos e não foi observada mortalidade.

3.3 - Considerações Finais

A maior parte dos anfíbios e répteis reage aos agentes estressores com um aumento dos níveis dos hormônios corticosteróides no plasma (LANCE, 1990; GUILLETTE JR. *et al.*, 1995; TYRRELL e CREE, 1998). Contudo, uma variação de reações ao mesmo estímulo pode ocorrer em relação ao tipo de resposta, às taxas apresentadas e ao tempo de duração dessas respostas. Essas variações da ativação adrenocortical demonstram uma sensibilidade diferente no eixo hipotálamo – glândulas pituitárias – supra-renais (adrenais) aos estressores e são denominadas modulação adrenocortical (WINGFIELD e ROMERO, 2001).

Diferenças fisiológicas entre indivíduos, sexo, idade, estado reprodutivo, doenças, status social podem interferir na modulação adrenocortical dos animais (GRASSMEN e HESS, 1992; DUNLAP e SCHALL, 1995; KNAPP e

MOORE, 1996). O efeito do estresse pode variar também de acordo com a carga genética do animal.

Variações de temperatura, umidade (diferentes nas estações do ano), disponibilidade de alimento, qualidade da água, e condições gerais podem resultar em diferenças na modulação adrenocortical em populações distintas de uma mesma espécie (DUNLAP e WINGFIELD, 1995; MOORE e JESSOP, 2003). Em relação à minimização dos efeitos das variantes acima citadas, desenvolveu-se o experimento do presente estudo, sob a proteção de uma estufa agrícola, tendo sua superfície coberta com plástico polietileno e suas laterais com sombrite, a fim de evitar grandes variações de temperatura e umidade relativa do ar. Não houve diferenças na oferta de alimento entre os tanques, e a qualidade da água se manteve semelhante entre todos os tratamentos e suas réplicas. Dessa forma, tentou-se reduzir alguns dos fatores ambientais que poderiam interferir nos resultados.

Variações significativas nos valores de cortisol e glicose, que foram observados em outros estudos com organismos aquáticos (peixes), não foram observadas neste trabalho, o que seria esperado como reações frente às situações estressantes de captura, hipóxia e transporte.

Estes estímulos estressores já foram testados em outros trabalhos (BARTON e IWAMA, 1991; WIJAYAN *et al.* 1991; 1994; BARCELLOS *et al.*, 2000; SLOMAN *et al.*, 2001), e os animais submetidos a eles apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros analisados, mostrando-os eficientes em provocar estresse com conseqüente liberação de cortisol seguido de hiperglicemia. Em girinos de *R. catesbeiana* nenhum experimento testando estes estressores havia sido realizado. A maior parte das conclusões relativas à modulação adrenocortical nestes organismos são baseados em observações comportamentais (DUELLMAN e TRUEB, 1986; LIMA e AGOSTINHO, 1992; FERREIRA *et al.*, 2001) e, por esse motivo, utilizou-se outras classes de vertebrados (peixes, répteis), além de outras espécies de anfíbios para comparação de resultados.

Uma possível causa para a falta de aumento dos parâmetros testados seria uma opção fisiológica do organismo (“recurso”) que ao invés de promover uma resposta adrenocortical imediata, mantém os níveis hormonais estáveis, como no exemplo estudado por JESSOP *et al.* (1999; 2000) com tartarugas verdes (*Chelonia mydas*); e VALVERDE *et al.* (1999a), que observou em tartarugas marinhas (*Lepidochelys olivacea*) em período reprodutivo essa falta de resposta. Os animais em período de desova morriam sem apresentar respostas adrenocorticais ao agente estressor a que estavam sendo submetidos (superaquecimento). Uma resposta adrenocortical imediata iria promover sua sobrevivência naquele momento, mas provavelmente iria prejudicar a reprodução, e por esse motivo a resposta adrenocortical foi inibida não permitindo uma maior sobrevida ao animal, mas permitindo que ele pudesse reproduzir-se mesmo na presença do superaquecimento (VALVERDE *et al.*, 1999b).

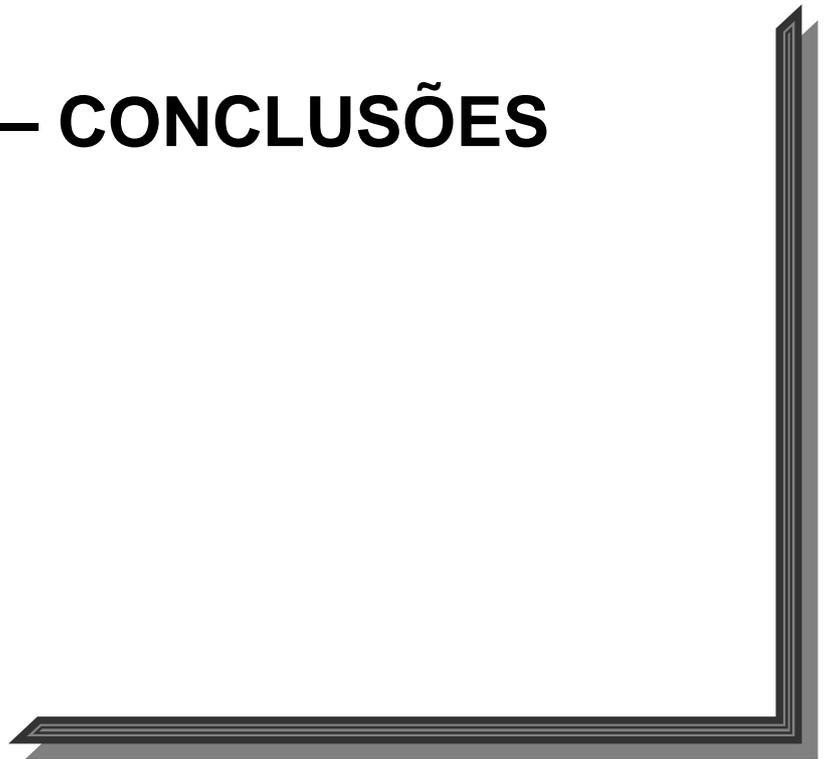
Ainda, VALVERDE *et al.* (1999a; 1999b) verificaram que tartarugas verde-oliva (*Lepidochelys olivacea*) apresentaram uma resposta adrenocortical baixa quando o agente estressor foi a captura e exibiram níveis muito altos de corticosterona quando foram expostas a um desafio com ACTH evidenciando rotas fisiológicas distintas para estas situações.

Os girinos do experimento não apresentaram a resposta adrenocortical clássica, talvez em função dos prejuízos que essas respostas poderiam lhe trazer durante o desenvolvimento, já que os produtos desta resposta interfeririam diretamente nos processos de crescimento e metamorfose, como citado anteriormente.

Um exemplo da atuação fisiológica do estresse em anfíbios é a possibilidade de alterações na formação cutânea dos girinos, tendo em vista que, os corticóides atuam em antagonismo com os hormônios tireoidianos nos estágios larvais iniciais, mas depois sinergizam com estes mesmos hormônios na aceleração da metamorfose e em especial na queratinização, e nas últimas fases, na diferenciação da pele dos girinos (MILLER, 1996). Outras ações que

se destacam e que poderiam sofrer interferência dos produtos do estresse seriam: a capacidade dos glicocorticóides destes animais em induzir apoptose em linfócitos larvais durante a reorganização do sistema imune próximo à metamorfose (ROLLINS–SMITH *et al.*, 1997) e o fato de terem sua metamorfose adiantada em casos de estresse causados por privação de alimento e grande manipulação (ROSENKILDE, 1985). Este último processo também apresenta relação direta com o custo benefício e a produtividade das criações comerciais.

4 – CONCLUSÕES



De acordo com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que:

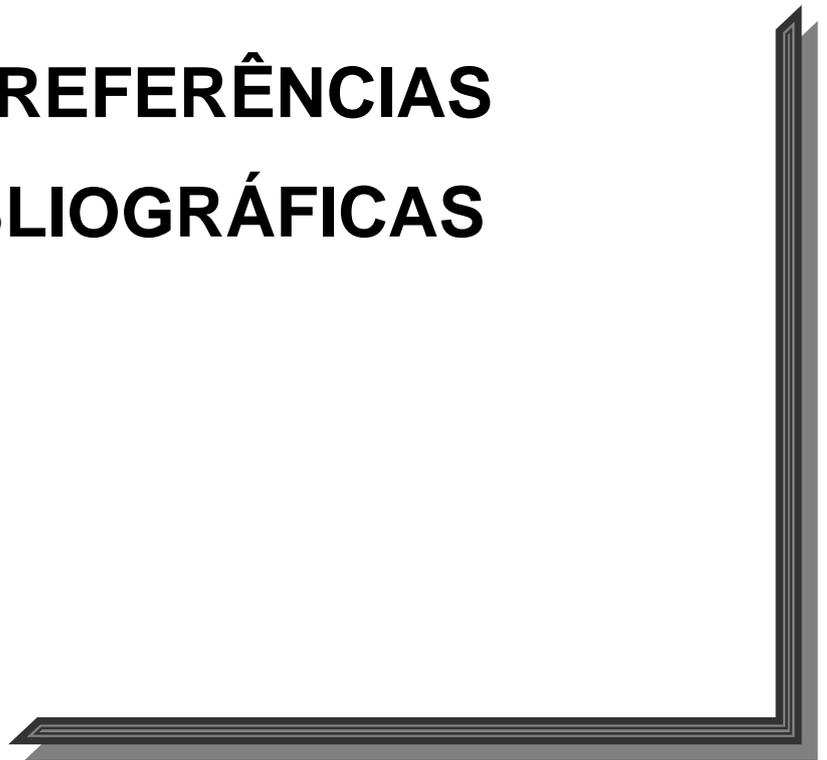
A quantificação de cortisol plasmático por Elisa (DSL10) é apropriada para anuros da espécie *Rana catesbeiana*.

Os marcadores biológicos de estresse avaliados (cortisol, glicemia e parâmetros hematológicos) não apresentaram alterações estatisticamente significativas em seus valores, tanto para o estresse provocado por captura e hipóxia quanto por transporte, o que seria esperado para outras classes de organismos aquáticos.

Entretanto, deve-se ressaltar, que o fato de não haver diferenças significativas nos parâmetros avaliados pode indicar: que os estímulos estressores testados não foram adequados para elevar os valores plasmáticos dos marcadores biológicos (cortisol e glicose), ou talvez que o padrão de resposta a estes estímulos estejam expressos tissularmente (cortisol tecidual), pois o aumento extremo do hormônio cortisol ou em outro nível hormonal (corticosterona) interfere diretamente na metamorfose destes animais.

Devido à falta de pesquisas definindo quais os níveis basais de cortisol e glicose nas diferentes fases de vida de girinos de *R. catesbeiana*, o presente trabalho contribui também neste sentido, sendo importante para futuras comparações. Ratifica-se que outros estudos mensurando estes e outros marcadores biológicos devam ser realizados para complementar as informações sobre estresse ligado ao manejo físico em criações comerciais de rã-touro.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ADAMS, S.M. 1990 Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. In: ADAMS, S.M. (Ed.) *Biological indicators of stress in fish*. Bethesda: American Fisheries Society. p.1-9. (American Fisheries Symposium, 8).
- APHA; AWWA; WPCF. 1998 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17 ed. Washington, D.C.: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water WORKS Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation.
- ARENDS, R.J.; MANCERA, J.M.; MUNOZ, J.L.; BONGA, S.E.W.; FLIK, G. 1999 The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, Stanford, 163: 149–157.
- BALM, P.H.M. 1999 *Stress Physiology in Animals*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 296p.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHL, V.M. 2000 Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (Revisão). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 26 (1): 99-111.
- BARTON, B.A. e IWAMA, G.K. 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Disease*, Vancouver, 10: 3-26.
- BARTON, B.A.; RAHN, A.B.; FEIST, G.; BOLLIG, H.; SCHRECK, C.B. 1998 Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Ployodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, Oxford, 120 (2): 355-363.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. 2004 *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1059p.
- BERVEN, K.A. e CHADRA, B.G. 1988 The relationship among egg size, density, and food level on larval development in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Oecologia*, Berlin, 75: 67–72.
- BICEGO, K.C. e BRANCO, L.G. 1999 Seasonal changes in the cardio respiratory responses to hypercardia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 124: 221-229.
- BONGA, S.E.W. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, Bethesda, 77: 591-625.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. 2006 Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, Manaus, 36(3): 349 –356.

- BUENO-GUIMARÃES, H. M. 1999 *Avaliação da resposta da Rana catesbeiana frente as variações ambientais: determinação das condições ideais de manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos*. São Paulo. 180p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- BYRNE, J.J.; e WHITE, R.J. 1975 Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 50A: 709-715.
- CARNEIRO, P.C.F. e URBINATI, E.C. 2001 Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther) during transport. *Aquaculture Research*, Oxford, 32: 297–304.
- CASTRO, J.C. e PINTO, A.T. 2000 Qualidade de água em tanques de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802, cultivadas em diferentes densidades de estocagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 29(6): 1903-1911.
- CATHERS, T. 1997 Serum chemistry and hematology for anesthetized american bullfrogs. *Journal of Zoology & Wildlife Medicine*, Lawrence, 28: 171–174.
- CELIS, M.E. 1998 *Fisiologia Humana- Sistemas Nervioso y Endócrino*, Córdoba: Ed. Rerer Milênio. 635p.
- COLLIER, H.B. 1944 The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Assistance Journal*, Ottawa, 50: 550-552.
- COPPO, J.A. 2001 *Fisiología Comparada del Medio Interno*, Buenos Aires: Dunken. 297 p.
- COPPO, J.A. 2003 El médio interno de la rana toro *Rana catesbeiana*, Shaw 1802. *Revista Veterinaria*, Corrientes, 14(1): 25-41.
- COPPO, J.A.; MUSSARNB, T.; FIORANELLI, S.A.; ZEINSTEGER, P.A. 2005 Blood and urine physiological values in captive bullfrog, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Analecta Veterinária*, Buenos Aires, 25 (1): 15-17.
- DENVER, R.J. 1998 Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the western spadefoot toad, *Scaphiopus hammondi*. *General and comparative endocrinology*, New York, 110: 326–336.
- DETHLOFF, G.M. e BAIMAIER, K.L. 2001 Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical and immunological parameters of wild rainbow trout (*Orchorynchus mykiss*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, New York, 40: 371-380.

- DIAS, D.C. 2006 *Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro (**Rana catesbeiana** Shaw, 1802)*. Jaboticabal. 80p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista).
- DUELLMAN, W.E. e TRUEB, L. 1986 *Biology of amphibians*. Baltimore – Marylan: The Johns Hopkins University Press. 613 p.
- DUNLAP, K.D. e SCHALL, J.S. 1995 Hormonal alterations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiological Zoology*, Chicago, 68: 608– 621.
- DUNLAP, K.D. e WINGFIELD, J.C. 1995 External influences on indices of physiological stress I. Seasonal and population variation in adrenocortical secretion of free-living lizards, *Sceloporus occidentalis*. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, 271: 36–46.
- EDDY, F.B. 1981 Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press. p.77-102.
- ELLSAESSER, C.F. e CLEM, L.W. 1986 Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology*, London, 28: 511-521.
- FEDER, M.E. e BURGGREN, W.W. 1992 *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press. p. 40-54.
- FERREIRA, C.M. 2002 *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (**Rana catesbeiana**) como animais sentinelas*. São Paulo. 109p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).
- FERREIRA, C.M. 2003 A importância da água e sua utilização em ranários comerciais. *Panorama da Aqüicultura*, 79(13):15-17.
- FERREIRA, C.M.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; BARBOSA, C.J.S. 2001 Estresse e sistemas de criação. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA 11. Bragança Paulista, 16-19/jul 2001. *Anais...* São Paulo: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura. p.37-40.
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-14.
- FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TEIXEIRA, P.C.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M. 2003 I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 34: 95.

- FONTANELLO, D. 1994 Histórico da Ranicultura Nacional. In: LIMA, S.L.; FIGUEIREDO, M.R.C.; MOURA, O.M. (Eds) *Diagnóstico da Ranicultura: problemas, propostas de soluções e pesquisas prioritárias*. Viçosa: ABETRA. p. 3-6.
- FORMAN, L.J. e JUST, J.J. 1976 The life span of red blood cells in the amphibian larvae, *Rana catesbeiana*. *Developmental Biology*, Orlando, 50(2): 537-540.
- FRANÇA, F.M. 2007 *Efeito da utilização de probióticos no desempenho, resposta imune e hematológica de girinos e imagos de rã-touro (Rana catesbeiana)*. São Paulo. 92p. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesca, SP).
- GLENNEMEIER, K.A. e DENVER, R.J. 2002 Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, 292: 32–40.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal Clinic Pathology*, Philadelphia, 56: 35-39.
- GOMES, L.C. 2002 *Transporte de juvenis de tambaqui Colossoma macropomum (CUVIER 1818) (Teleostei, Characidae)*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, 101p.
- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. 2003 Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte do tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38(2): 283-290.
- GOSNER, K.L. 1960 A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Johnson, 16: 183-190.
- GRASSMEN, M. e HESS, D.L. 1992 Sex differences in adrenal function in the lizard *Cnemidophorus sexlineatus*: II Responses to acute stress in the laboratory. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, 264: 183–188.
- GUILLETTE JR., L.J.; CRAIN, D.A.; ROONEY, A.A.; WOODWARD, A.R. 1995 Effect of acute stress on plasma concentrations of sex and stress hormones in juvenile alligators living in control and contaminated lakes. *Journal of Herpetology*, Bethesda, 31: 347–353.
- GUYTON, A.C. e HALL, J.E. 2002 *Tratado de Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 818-823 e 875-877.
- HARRIS, J.A. 1972 Seasonal variations in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 43(A): 975-989.

- HASEBE, T.; OSHIMA, H.; KAWAMURA, K.; KIKUYAMA, S. 1999 Rapid and selective removal of larval erythrocytes from systemic circulation during metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Development, Growth & Differentiation*, Nagoya, 41: 639–643.
- HAYES, T.; CHAN, R.; LICHT, P. 1993 Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). *The Journal of experimental zoology*, New York, 266: 206–215.
- HERMAN, C.A. 1977 Comparative effects of epinephrine and norepinephrine on plasma glucose and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, 32: 321-329.
- HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. 2003 *Princípios Integrados de Zoologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.722-723.
- HILL, R.W. 1980 *Fisiología Animal Comparada*, Reverté, Barcelona, 512 p.
- HILL, R.W. e WYSE, G.A. 1989 *Fisiologia Animal*. Ed. Akal Madrid. p. 598-608.
- HUTCHISON, V.H.; TURKEY, L.D. 1975 Glucose and lactate concentrations during activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, Berlin, 99: 287-295.
- INOUE, L.A.K.A. 2003 Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, Santa Maria, 33(5): 943-947.
- IRWIN, A.; KENNY, A.P.; O' HALLORAN, J.; FITZGERALD, R.D.; DUGGAN, P.F. 1999 Adaptation and validation of radioimmunoassay kit for measuring plasma cortisol in turbot. *Comparative Biochemistry and Physiology*, London, 124: 27-31.
- IWAMA G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. 1997 Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, Society for Experimental Biology Seminar Series 62, Cambridge, UK.
- IWAMA, G.K. 1993 *Intensive Fish Production: Course Manual UBC Access Guided Independent Study*. Vancouver: The University of British Columbia. p.130.
- JENSEN, F.B.; NIKINMAA, M.; WEBBER, R.E. 1993 Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes consequences and compensations. In: RANKIN, J.C E JENSEN, F.B. (eds) *Fish Ecophysiology...*, London: Chapman e Hall. p.161-179.

- JESSOP, T.S.; HAMANN, M.; READ, M.A.; LIMPUS, C.J. 2000 Evidence for a hormonal tactic maximizing green turtle reproduction in response to a pervasive ecological stressor. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 118: 107–117.
- JESSOP, T.S.; LIMPUS, C.J.; WHITTIER, J.M. 1999 Plasma steroid interactions during high-density green turtle nesting and associated disturbance. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 115: 90–100.
- KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.A. 1992 Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Medicine and Biology Research*., São Paulo, 22: 1019-1022.
- KIKUYAMA, S.; KAWAMURA, K.; TANAKA, S.; YAMAMOTO, K. 1993 Aspects of amphibian metamorphosis: Hormonal control. *International Review of Cytology*, San Diego, 145: 105-148.
- KNAPP, R. e MOORE, M.C. 1996 Male morphs in tree lizards, *Urosaurus ornatus*, have different delayed hormonal responses to aggressive encounters. *Animal Behaviour*, London, 52: 1045–1055
- KRUG, E.C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J.; NICOLL, C.S. 1983 Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, San Diego, 52: 232-241.
- KUBITZA, F. 1997 Transporte de peixes vivos. Parte 1. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, 7: 20–26.
- LANCE, V.A. 1990 Stress in reptiles. In: EPPLE, A., SCANES, C.G.; STETSON, M.H. (Eds.), *Prospects in Comparative Endocrinology*, New York: Wiley-Liss, p.461–466.
- LICHT, P.; MCCREERY, B.R.; BARNES, R.; PANG, R. 1983 Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 50:124–145.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C.A. 1992 *A tecnologia da criação de rãs*. Viçosa: Imp. Universitária. p.168.
- MAHONEY, J.B. e MCNULTY, J.K. 1992 Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*, Grosvenor Lane, 121: 261-268.
- MARCANTÔNIO, A.S. 2005 *Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): toxicidade aguda e*

- crônica e parâmetros hematológicos*. Jaboticabal. 94p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista).
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. 1977 Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, Grosvenor Lane, 106: 201-212.
- McCOLLUM, S.A. e VAN BUSKIRK, J. 1996 Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. *Evolution*, Lawrence, 50: 583–593.
- MCDONALD, D.G. e MILLIGAN, C.L. 1992 Chemical properties of the blood. In HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARELL A.P., *Fish Physiology*, Vol XII, San Diego: Academic Press p. 55–133.
- McDONALD, G. e MILLIGAN, L. 1997 Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.) *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 119-144.
- MILLER, L. 1996 Hormone-induced changes in keratin gene expression during amphibian skin metamorphosis. In: GILBERT, L.I.; TATA, J.R.; ATKINSON, B.G. (Eds.), *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells*. New York, Academic Press, p.599–624.
- MOBERG, G.P. 1996 Suffering from stress: an approach for evaluating the welfare of an animal. In: Sandoe, P. and Hurnik, T. (eds) *Proceedings of Welfare of Domestic Animals Concepts, Theories and Methods of Measurement. Acta Agriculture Scandinavica*, Sect. A. Animal Science, London, 27: 46-49.
- MOBERG, G.P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: Moberg, G.P. and Mench, J.A. (eds) *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing, 1-22.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. 1999 Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, New York 9: 211-268.
- MOORE, I.T. e JESSOP, T.S. 2003 Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior*, Amsterdam, 43: 39–47.
- PANKHURST, N.W. e SHARPLES, D.F. 1992 Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper *Pagrus*

- auratus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, Melbourne, 43: 345-356.
- PICKERING, A.D. 1981 *Stress and fish*. Introduction; the concept of biological stress. London: London Academic Press. p.1-7.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. 1982 Recovery of the trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: A time-course study. *Journal of Fish Biology*, London, 24: 731-740.
- POTTINGER, T.G. 1998 Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *Journal of Fish Biology*, London, 53: 728-742.
- POTTINGER, T.G.; YEOMASN, W.E.; CARRICK, T.R. 1999 Plasma cortisol and 17 β -oestradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. *Journal of Fish Biology*, London, 54: 525-532.
- RANDALL, D.J. e PERRY, S.F. 1992 Catecholamines. In *Fish Physiology*, Vol XIIB, Eds WS Hoar, DJ Randall & AP Farrell. San Diego, CA: Academic Press. p. 255–300.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e EIRAS, A.C. 1992 Células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná – PR. In: 7º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E 2º ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Peruíbe. *Anais...São Paulo*, Associação Brasileira de Aquicultura e Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, p.173-182.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A.T. 2004 Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.de los A.P. (Ed.) *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela. p.89-120.
- RIBEIRO-FILHO, O.P. 1998 Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário, *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 27(4): 658-663.
- ROLLINS-SMITH, L.A.; BARKER, K.S.; DAVIS, A.T. 1997 Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. *Developmental Immunology*, London, 5: 145–152.
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto do. Butantan*, 20: 329-334.
- ROSENKILDE, P. 1985 The role of hormones in the regulation of amphibian metamorphoses. In: BALLS, M.; BOWENES, M. *Metamorphoses*. Oxford: Clarendon press, p. 221-259.

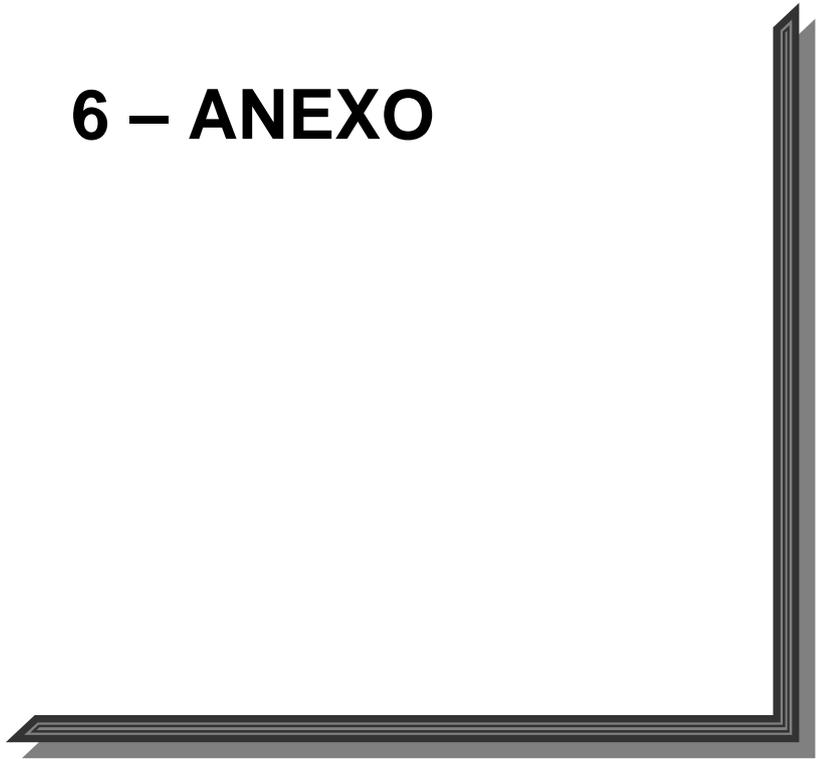
- ROSS, L.G. e ROSS, B. 1999 *Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell Science. 159 p.
- SAMPLE, W.D. 1994 Water quality is essential in holding fish in vats and hauling tanks. *Aquaculture Magazine*, Litte Rock, 20(3): 68-72.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. 2000 How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, Baltimore, 21: 55–89.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002 *Fisiologia Animal, Adaptação e Meio Ambiente*. 5ª. Ed., São Paulo: Livraria Santos. 600p.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L.; WILSON, K.N. 1991 Teratogenesis, Toxicity, and Bioconcentration in Frogs Exposed to Dieldrin. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 332-350.
- SCOTT, D.E. 1990 Effects of larval density in *Ambystoma opacum*: an experiment in large-scale field enclosures. *Ecology*, Washington. 71: 296–306.
- SINGH K. 1978. Hematology of the common Indian frog *Rana tigrina*. III. Hemoglobin and hematocrit. *Annals of anatomy*, New York, 143: 161–166.
- SLOMAN, K.A.; METCALFE, N.B.; TAYLOR, A.C.; GILMOUR, K.M. 2001 Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiology and Biochemistry Zoological*, Chicago, 74: 383-389.
- SMITH, C.L. 1954 The relation between seasonal hyperglycaemia and thyroid activity in the frog (*Rana temporaria*). *Journal of Endocrinology*, Bristol, 10: 184-191.
- SMITH, D.C. e VAN BUSKIRK, J. 1995 Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *The American Naturalist*, Chicago, 145: 211–233.
- STÉFANI, M.V. 1996 *Metabolismo e crescimento da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) alimentada com níveis crescentes de carboidratos*. Jaboticabal. 92p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista).
- SUMPTER, J.P. 1993 The deleterious effect of stress and their significance to aquaculture. Production, environment and quality. Ghent: *European Aquaculture Society*. Oostende, p.157-165.
- SWENSON, M.J. e REECE, W.O. 1993 Dukes: *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 267p.

- TEIXEIRA, P.C. 2007 *Valores de Cortisol, Glicemia e perfil sangüíneo de girinos de Rã-touro (**Rana catesbeiana**) em Diferentes Densidades e Exposição Aérea*. Jaboticabal. 86p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista).
- TEIXEIRA, R.D.; PEREIRA MELLO, S.D.R.; LIMA DOS SANTOS, C.A.M. 2001 *The world market for frog legs*. Rome: FAO/GLOBEFISH, 68.44p
- TURNER, R.J. 1988 Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N. N.A., *Vertebrate Blood Cells*, New York: Cambridge University Press, p. 129-209.
- TYRELL, C.L. e CREE, A. 1998 Relationships between corticosterona concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). *General and Comparative Endocrinology*, New York, 110: 97–108.
- URBINATI, E.C. e CARNEIRO, P.C.F. 2004 Práticas de manejo e estresse dos peixe em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. Editora Tecart, São Paulo, p. 171-193.
- VAL, A.L. 2000 Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, New York, 125(A): 417-435.
- VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; AFFONSO, E.G. 1990 Adaptative features of Amazon fishes: Hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bhor effect of *Pterygoplichthys multiratus* (Siluriformes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, New York, 97: 435-440.
- VAL, A.L. e ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1995 *Fishes of Amazon and their environments. Physiological and biochemical Aspect*., Berlin: Springer-Verlag, 223p.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2004 Estresse em peixes – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.de los A.P. (Ed.) *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela.p.75-88.
- VALVERDE, R.A.; OWENS, D.W.; MACKENZIE, D.S.; AMOSS, M.S. 1999a Basal and stress-induced corticosterone levels in olive Ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) in relation to their mass nesting behavior. *The Journal of experimental zoology*, New York, 284: 652–662.
- VALVERDE, R.A.; OWENS, D.W.; MACKENZIE, D.S.; AMOSS, M.S. 1999b Adrenal responsiveness during nesting of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *American Zoologist*, Utica, 32(A): 21-30.

- VOET, D.I.; VOET, J.G.I.; PRATT, C.W. 2000 *Fundamentos de Bioquímica*. São Paulo: Artmed. p.229.
- WANG, J.H. e CHANG, M.H. 1994 Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fish*, Taipei, 46: 69-87.
- WEBER, R.E.; LYKKEBOE, G.; JOHANSEN, K. 1975 Biochemical aspects of the adaptation of hemoglobin affinity of eels to hypoxia. *Life Sciences*, Oxford, 17: 1345-1350.
- WEIRICH, C.R.; TOMASSO, J.R.; SMITH, T.I.J. 1993 Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, Grosvenor Lane, 5: 64–72.
- WIJAYAN, M.M.; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. 1991 Cortisol induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, 82: 476-486.
- WIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. 1994 The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU 486. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, 96: 75-84.
- WILSON, J.A. 1989. *Fundamentos de Fisiología Animal*, México: Limusa. p.984.
- WINGFIELD, J.C. e ROMERO, L.M. 2001 Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates, In: MCEWEN, B.S.; GOODMAN, H.M. (Eds.), *Handbook of Physiology: The Endocrine System*, Vol. IV, Section 7, New York : Oxford University Press, p. 211–234.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various of vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig , 51: 32-49.
- WRIGHT, M.L.; CYKOWSKI, L.J.; LUNDRIGAN, L.; HEMOND, K.L.; KOCHAN, D.M.; FASZEWSKI, E.E. 1994 Anterior pituitary and adrenal cortical hormones accelerate or inhibit tadpole hind limb growth and development depending on stage of spontaneous development or thyroxin concentration in induced metamorphosis. *The Journal of Experimental Zoology*, New York, 270: 175–188.
- WRIGHT, M.L.; GUERTIN, C.J.; DUFFY, J.L.; SZATKOWSKI, M.C.; VISCONTI, R.F.; ALVES, C.D. 2003 Developmental and diel profiles of plasma corticosteroids in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, London, 135(A): 585-595.

- WRIGHT, M.L.; RZASA, B.A.; WEIR, R.J.; BABSKI, A.M. 1999 Influence of Cortisol on the Larval Bullfrog Thyroid Axis *in Vitro* and *in Vivo* and on Plasma and Ocular Melatonin. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, 116: 249–260.
- WRIGHT, P.A. 1959 Blood sugar studies in the bullfrog, *Rana catesbeiana*., *Endocrinology*, Menasha, 64: 551-558.
- ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall 3^a ed.
- ZERANI, M.; AMABILI, F.; MOSCONI, G.; GOBBETTI A. 1991 Effects of captivity stress on plasma steroid-levels in the green frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology. A Physiology*, Oxford, 98: 491–496.

6 – ANEXO



Anexo 1

Contagem de Eritrócitos (Er)

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

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

Obs. Solução de Hayen

0,6 g de bicloreto de mercúrio

5,0 g de sulfato de sódio

1,0 g de cloreto de sódio

200,0 mL de água destilada

* Conservar em geladeira a 4°C

Determinação do Hematócrito (Ht)

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

Determinação da Taxa de Hemoglobina (Hb)

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

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

X= valor encontrado por espectrofotometria

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

O resultado final foi dado em g/dL

Índices Hematimétricos Absolutos

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

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

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{n}^{\circ} \text{ Eritrócitos}} \times 10 = \text{fL}$$

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

$$\text{HCM} = \frac{\text{taxa de hemoglobina}}{\text{n}^{\circ} \text{ Eritrócitos}} \times 10 = \text{pg/célula}$$

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

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

Obs. Solução de Cianometahemoglobina

0,2 g de fericianeto de potássio

1,0 mg de bicarbonato de sódio

0,05 g de cianeto de potássio

1000,0 mL de água destilada

*Conservar em geladeira a 4°C

Confecção das extensões sangüíneas

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

As primeiras alíquotas de sangue destinadas à avaliação dos parâmetros hematológicos foram colocadas em uma das extremidades da lâmina, em seguida com outra lâmina, com os cantos recortados, colocada em frente à gotícula e em ângulo de 45° sobre a lâmina inferior, fez-se um movimento para frente de modo a deslizar e espalhar a gotícula de sangue (Figura 5). Depois de prontas, as extensões foram coradas com o corante de ROSENFELD (1947), sendo cobertas por 10 gotas deste corante, ficando de três a cinco minutos em repouso. Em seguida, foi colocada a mesma quantidade de água destilada e homogeneizado com um bastão. Após 10 minutos as lâminas foram lavadas com água corrente, e secas a temperatura ambiente.

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

A Contagem Total de Leucócitos (CTL) e a Contagem Total de Trombócitos (CTT) foi realizada nas extensões sangüíneas, em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100x) onde foram contadas 2.000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) das quais marcou-se a quantidade de leucócitos e trombócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo aleatório seguinte. Através de uma regra de três,

considerando-se o número total de células contado na câmara de Neubauer, calculou-se o número total de leucócitos e de trombócitos. A partir deste cálculo, calculou-se os valores absolutos de cada leucócito, baseado em sua porcentagem (HRUEB e SMITH, 1998).

Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL)

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) foi realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) onde foram contados 200 leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) dos quais marcou-se a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo logo seguinte. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem, obtendo-se, desta forma, o valor relativo. O valor absoluto foi calculado por uma regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento.

Obs. Corante Rosenfeld

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

0,97 g Giemsa em pó

0,53 g May-Grünwald em pó

1.000 mL Metanol

Obs. Solução de heparina:

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

50,0 mL de solução salina 0,7%

* Conservar em geladeira a 4°C

Anexo 2**Ensaio Preliminares para determinação do tempo da exposição aérea**

Segundo BARCELLOS *et al.* (2000) 60 segundos de hipóxia são suficientes para a liberação de cortisol em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), organismos cuja respiração dá-se por via branquial. Para girinos de *R. catesbeiana* que além da respiração branquial apresentam 30% de respiração cutânea, houve a necessidade de se trabalhar com um intervalo maior. Este intervalo de tempo foi definido a partir de testes preliminares realizados pela equipe de trabalho, onde se avaliou a sobrevivência e performance dos animais (grupos de 10 girinos) submetidos a hipóxia em intervalos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Cada grupo de animal era colocado sobre uma superfície úmida (plástico com uma lâmina d'água) e seca (folha de papel). Após os intervalos de tempo pré-estabelecidos, os animais eram reconduzidos aos aquários para recuperação. Observou-se que os girinos colocados em superfície seca quando submetidos a 5 minutos de hipóxia já não mais respondiam quando recolocados na água, ou seja, apresentavam-se moribundos e/ou com movimentos natatórios lentos. Quanto aos animais colocados em superfície úmida a recuperação passou a não ocorrer a partir de 20 minutos de hipóxia, com óbito de 70% após 1 hora de recuperação. Baseado nos resultados deste ensaio estabeleceu-se 15 minutos de hipóxia para os girinos a serem testados, acreditando-se que este intervalo seja suficiente para a liberação de cortisol mediante o estímulo agudo estabelecido, e posterior recuperação do animal para a retirada de sangue e processamento das análises.