

Makrofagni centri u jetri riba-histološki biomarkeri stresa

Krbavčić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:486890>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MAKROFAGNI CENTRI U JETRI RIBA-HISTOLOŠKI
BIOMARKERI STRESA
MACROPHAGE CENTERS IN FISH LIVER-HISTOLOGICAL
BIOMARKERS OF STRESS

SEMINARSKI RAD

Martina Krbavčić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)
Mentor: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. MORFOLOGIJA.....	4
3. PIGMENTI.....	6
3.1. Melanin.....	6
3.2. Lipofuscin.....	7
3.3. Hemosiderin.....	8
4. MOGUĆE FUNKCIJE MELANO-MAKROFAGNIH CENTARA	10
5. PROCJENA MOGUĆNOSTI KORIŠTENJA MELANO-MAKROFAGNIH CENTARA KAO POKAZATELJA ZAGAĐENJA OKOLIŠA	11
6. LITERATURA.....	14
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY	18

1. UVOD

Tijekom 20. stoljeća, uz nagli razvoj industrije, proizvedene su velike količine zagađivača organskog podrijetla od kojih je veliki dio naposljetku završio u vodenim ekosustavima. Najugroženija su često područja na kojima žive i razmnožavaju se najvažnije vrste riba. Ribe dolaze u kontakt sa velikim brojem zagađivača obitavajući u takvoj zagađenoj vodi ili putem hranidbenog lanca u kojem su ti zagađivači već prethodno akumulirani. Na taj način dolazi i do bioakumulacije štetnih tvari u njihovom organizmu, a ponajprije jetri kao glavnom metaboličkom organu, pa su ribe zato pogodne kao biomarkeri u istraživanjima zagađenja okoliša.

Makrofazi su velike stanice imunosnog sustava koje imaju izrazitu sposobnost fagocitoze i mogućnost kretanja kroz tkivo. Nastaju u koštanoj srži diferencijacijom iz monocita a osnovna im je zadaća čišćenje organizma od otpadnih tvari i borba protiv stranih tijela (antigena). Postoji više vrsta makrofaga a čije osobine ovise o mikrosredini u kojoj se nalaze.

Melano-makrofagni centri su nakupine pigmentiranih stanica u tkivima heterotermnih vertebrata. Takve centre normalno možemo pronaći kao dio strome hematopoetskog tkiva u slezeni i bubregu kod riba, a kod gmazova, vodozemaca i nekih riba i u jetri. Mogu se pojaviti i u drugim dijelovima tijela kao odgovor na kronična upalna oštećenja.

U tkivima heterotermnih životinja takve pigmentirane stanice možemo pronaći u peritoneumu, u blizini limfnih i krvnih žila i u stromi hematopoetskog tkiva što čini veliku razliku između njihovog i tkiva ostalih viših životinja kod kojih su pigmenti uglavnom rasprostranjeni u dermisu. Iako su pigmentirani agregati prvotno pronađeni kod pravih koštunjača (Ellis 1974; Roberts 1975), kasnije su pronađeni i kod hrskavičnjača i primitivnih koštunjača i to pretežito u jetri (Agius 1980).

U pravim se koštunjačama pojavljuju kao odvojeni centri u kojima možemo pronaći i leukocyte dok kod lososa i ostalih hrskavičnjača nisu odvojeni već nasumično porazbacani po tkivu i imaju veliki udio tamnih pigmenata (Agius 1985).

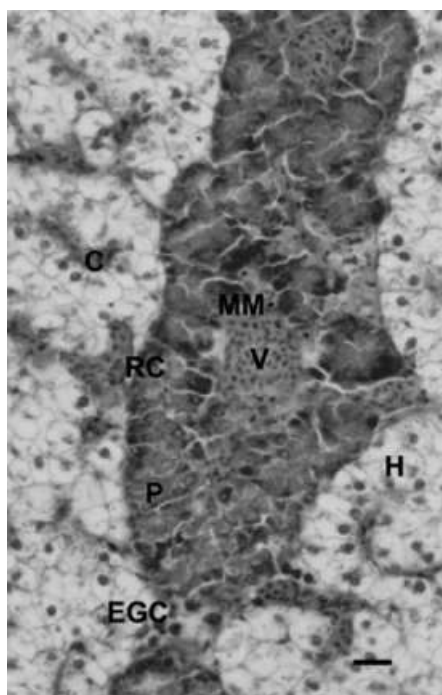
Na temelju strukture i funkcije melano-makrofagnih centara predloženo je da su oni primitivni analozi zametnih centara limfnih čvorova kod ptica i sisavaca (Ferguson 1976; Ellis 1980), a slične su pigmentirane makrofagne strukture pronađene i kod vodozemaca.

2. MORFOLOGIJA

Melano-makrofagne centre (MMC) uglavnom nalazimo kao dio retikuloendotelnog tkiva uz krvožilni sustav, a lako ih možemo prepoznati po tome što su nodularni sa izrazito osjetljivom argirofilnom kapsulom. Kapsula je posebno dobro razvijena u većim makrofagnim centrima i sastoji se od sloja plosnatih stanica.

Makrofazi se nalaze u nakupinama tvoreći aggregate (Sl.1) koji se povećavaju nakon aktivne fagocitoze heterogenog materijala kao što su npr. stanični ostaci, melaninski pigmenti, hemosiderinske granule, ostaci lipofuscina (Agius i Agbede 1984; Agius 1985), lipidne kapljice, proteinski agregati i neutralni mukopolisaharidi (Herraez i Zapata 1986).

Izgled melano-makrofagnih centara može varirati među vrstama, organima i fiziološkim stanjima unutar iste vrste. Ta se stanja uglavnom odnose na razlike u starosti, nedostatnu prehranu, metabolizam željeza i hemoglobina, razna patološka i upalna stanja te imunološko reagiranje poput "hvatanja antigena". Opaženo je da su i promjene u okolišu



Slika 1. Hepatopankreas (gušterača) ribe. C = kapilara; EGC = eozino granularne stanice; H = hepatocit; MM = agregirani melanomakrofagi; P = pankreociti; RC = štapićasta stanica; V = vena. (Preuzeto iz Fiuza i suradnici 2009).

sposobne inducirati promjene broja i kapaciteta makrofaga (Kranz i Gercken, 1987; Fournie i sur. 2001). Ultrastruktura melano-makrofagnih centara je veoma kompleksna sa razvijenim jezgrama i brojnim vakuolama različitog materijala koje su vezane za membrane. Te vakuole često sadrže nakupine pigmentnih granula što ukazuje na aktivni proces fagocitoze.

3. PIGMENTI

Melano-makrofagni centri sadrže različite vrste pigmenata koje često možemo naći i zajedno unutar iste stanice. Histokemijskim je metodama do danas potvrđeno postojanje najmanje tri tipa pigmenata: melanina, lipofuscina (ceroida) i hemosiderina. Porijeklo i biokemijska uloga tih pigmenata varira i nije još u potpunosti poznata. U makrofazima najzastupljeniji pigment je lipofuscin, a ponekad se uz njega nalazi i melanin. Za razliku od melanina i lipofuscina, hemosiderin u većim količinama uglavnom nalazimo pri nekim patološkim stanjima poput hemolitičke anemije.

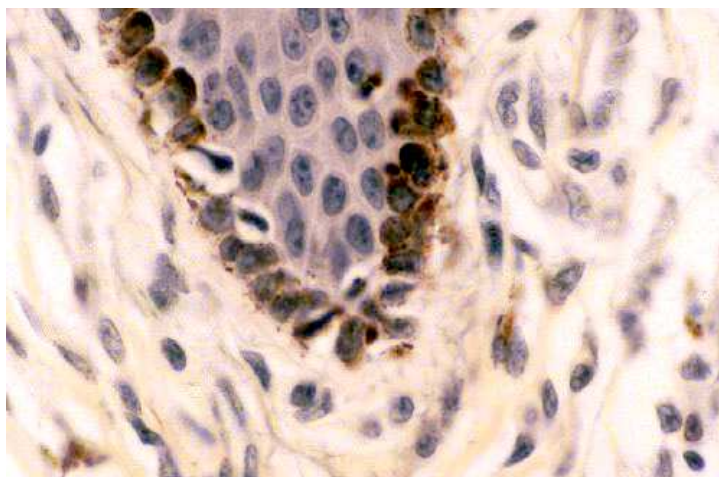
3.1.Melanin

Melanin je crni ili tamno smeđi pigment koji nastaje enzimatskom oksidacijom tirozina a možemo ga pronaći u velikom broju biljnih i životinjskih vrsta pa i kod čovjeka. (Sl.2). Proizvode ga melanociti. Melanociti su nezreli melanofori koji aktivno proizvode melanin ali su i u mogućnosti postati pravim melanoforima koji zatim migriraju u svoj funkcionalni sloj.

Melanini su kompleksni polimeri koji mogu apsorbirati i neutralizirati slobodne radikale, katione i ostale potencijalno toksične tvari nastale degradacijom fagocitiranog materijala (Zuasti i sur. 1989). Neki autori pripisuju im i baktericidno djelovanje zbog proizvodnje baktericidnih tvari poput hidrogen peroksida (Wolke i sur. 1985).

Uloga i funkcija melanina varira među organizmima a neke od njih su još i: zaštita od UV zračenja (kod mikroorganizama), zaštita od visoke temperature i kemijskih agensa kao što su teški metali i oksidirajući agensi koji kod nekih jedinki imaju važnu ulogu u virulentnosti i patogenosti jer mogu zaštititi patogene od imunološkog sustava domaćina.

Kod nekih beskralježnjaka melanini imaju i ulogu zaštite od mikroorganizama i to tako što pri ulasku patogena u organizam dolazi do njegove inkapsulacije od strane melanina u kojem on vjerojatno kasnije bude razoren slobodnim radikalima nastalim prilikom same melanizacije.



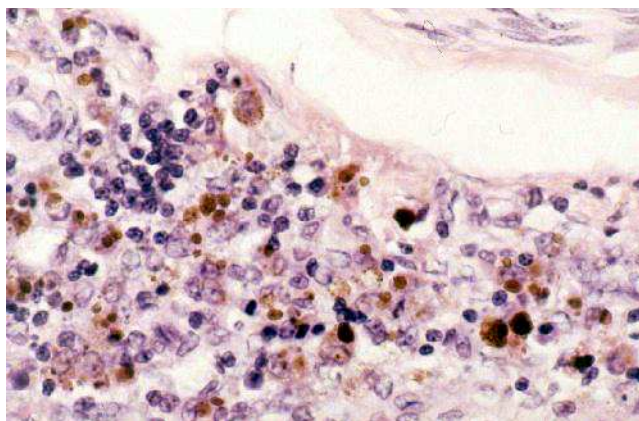
Slika 2. Nakupine melanina (smeđe) (Preuzeto iz <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab3/Lab3.htm>).

3.2. Lipofuscin

Lipofuscini i ceroidi su pigmenti koji nastaju oksidativnom polimerizacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina. I lipofuscidni i ceroidni pigmenti su produkti istog oksidativnog procesa pa je razlike među njima teško u potpunosti odrediti. Zbog toga su potrebne razne histokemijske metode kako bi se svaki od njih mogao identificirati (Pearse 1972).

Kao skupinu organizama koja je posebno sklona proizvodnji lipofuscina možemo navesti ribe upravo zbog visoke razine nezasićenih masnih kiselina i niske razine vitamina E koje nalazimo u njihovom organizmu. Povećano odlaganje lipofuscina primjećeno je i pri stanjima izgladnjelosti, virusnih oboljenja ili zbog utjecaja nekih toksičnih tvari, a akumulacija lipofuscina u organizmu dokazano raste sa povećanjem starosti i oštećenja tkiva (Agius 1981) (Sl. 3).

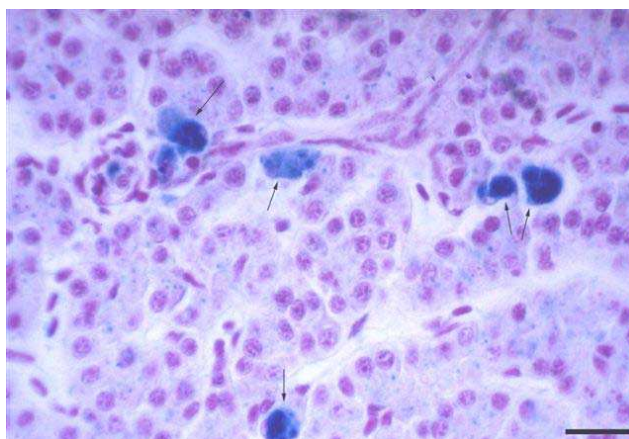
Lipofuscin je najzastupljeniji pigment u melano-makrofagnim centarima riba ali ga ima mnogo i u vodozemcima, gmazovima i ljudima.



Slika 3. Prikaz stanica koje sadrže lipofuscin. U ovome polju vide se makrofazi koji su aktivni čistači tijela. Makrofazi su zauzeli područje infekcije i preuzeli ulogu micanja mrtvih stanica i/ili bakterija. Liposuficin je smeđe- zlatni piment vidljiv unutar njih. (Preuzeto iz <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab3/Lab3.htm>).

3.3. Hemosiderin

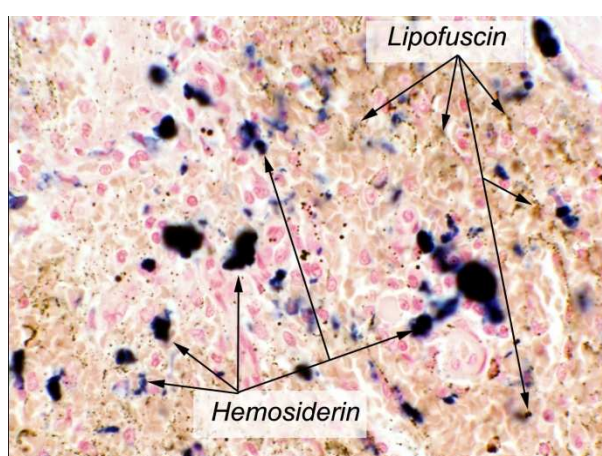
Hemosiderin je smeđi, granularni i relativno netopljivi pigment koji se sastoji od proteina i željezovog (Fe^{3+} iona) (Sl. 4 i 5). U višim se organizmima željezo u tijelu skladišti u obliku feritina, no kada tijelo ili organ postane zasićen tim spojem, željezo se počinje skladištiti intracelularno u obliku pigmenta hemosiderina (Agius 1979).



Slika 4. Jetra Ohridske pastrve, makrofagi (strelice) pridruženi hepatocitima. Obojenje ukazuje na to da su makrofagi puni hemosiderina. Obojeno metodom „Perl's Prussian blue“ (Preuzeto iz http://balwois.mpl.ird.fr/balwois/administration/full_paper/ffp-498.pdf).

Hemosiderin, za razliku od feritina, puno teže otpušta željezo a nastaje kao metabolički međuprodukt razgradnje hemoglobina iz istrošenih eritrocita (Kranz 1989). Makrofazi u centrima fagocitiraju hemoglobin a nakon njegove degradacije nastaju hemosiderin i porfirin.

Postoje dva moguća mehanizma nastanka velike koncentracije hemosiderina: povišenim katabolizmom oštećenih eritrocita ili povećanim zadržavanjem željeza u melano-makrofagnim centrima kao posljedica obrambene organizma.



Slika 5. Nakupine lipofuscina i hemosiderina (Preuzeto iz <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab3/Lab3.htm>).

4. MOGUĆE FUNKCIJE MELANO-MAKROFAGNIH CENTARA

Do nedavno, jetra riba nije se smatrala toliko važnim imunološkim organom kao što je to u sisavaca. No, nakon što su u jetri mnogih riba pronađeni melano-makrofagni centri, o čijoj se funkciji još raspravlja, došlo je do pojave mnoštva nalaza koji ukazuju na to da su ti centri središta uništavanja, detoksifikacije i reciklaže endogenog i egzogenog staničnog materijala (Ferguson 1976; Ellis 1980). To je dokazano eksperimentom u kojem je praćena sudbina injektiranih čestica kao što su ugljik ili zrnca lateksa. Te su čestice bile fagocitirane stanicama, vjerojatno makrofazima, koje su potom migrirale u melano-makrofagne centre (Mackmull i Michaels 1932; Ferguson 1976; Ellis i sur. 1976).

Vrsta i aktivnost pigmenata u melano-makrofagnim centrima može također navoditi na zaključak da je primarna funkcija melano-makrofagnih centara centralizacija stranih tvari za daljnu obradu i korištenje. Također je primjećeno je da se njihov broj i veličina mijenjaju sa starošću i oksidativnim sresom.

Osim funkcije “skupljača smeća”, melano-makrofagni centri smatraju se i filogenetskim prekursorom zametnih centara limfnih čvorova.

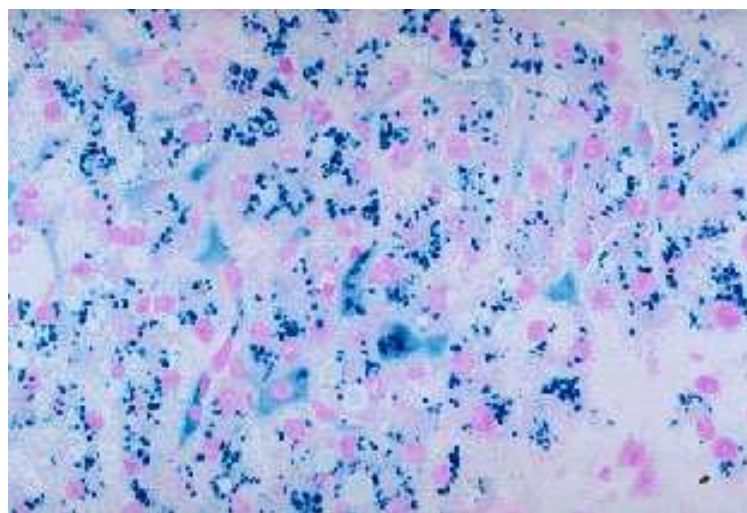
5. PROCJENA MOGUĆNOSTI KORIŠTENJA MELANO- MAKROFAGNIH CENTARA KAO POKAZATELJA ZAGAĐENJA OKOLIŠA

Wolke i sur. (1985) predložili su mogućnost korištenja melano.makrofagnih centara kao pokazatelja zdravlja riba. Postavili su hipotezu da se povećanje broja, veličine i sadržaja pigmenata u melano-makrofagnim centrima može smatrati odgovorom organizma ribe na kronično zagađenje okoline. Svoju hipotezu pokušali su potkrijepiti eksperimentom koji je ukratko opisan dalje u tekstu.

U studiji je korišteno 107 jedinki populacije *Pseudopleuronectes americanus* sakupljenih sa 3 područja različitog stupnja zagađenja: Georges Bank (čisto), Long Island (čisti i zagađeno) i Arthur Kill, New York (zagađeno).

Jedinkama je potom određena starost na temelju dužine, spola i zrelost spolnog sustava te im je odstranjena jetra i slezena.

Jetra i slezena su nakon fiksacije formalinom i uklapanja u parafin rezane i bojane metodom “Prussian Blue” koja omogućuje vizualizaciju sva tri najzastupljenija pigmenta unutar melano-makrofagnih centara. Željezni ion u hemosiderinu oboji se plavo (Sl. 6),



Slika 6. Tkivo jetre. Jezgre stanica jetre (crvene točke), pozitivna reakcija na željezo – “Perls' Prussian Blue” tehnika (plave točke) (Preuzeto iz <http://www.rat-hole.org/sub/staining.html>).

lipofuscin ostane žutkasto-smeđ, dok melanin vidimo kao male, tamno smeđe do crne, nepravilne čestice. Nakon analize određen je broj i površina makrofagnih centara po mm² (Tab. 1).

Tablica 1. Usporedba parametara melano-makrofagnih centara u *Pseudopleuronectes americanus* s obzirom na stupanj zagađenja

Postaja	Zagađena voda (test)	Čista voda (kontrola)
Jetra	N=40	N=63
Broj MA/mm ²	2.29±0.51	1.74±0.40
Površina MA (mm ² ×10 ⁻³)	0.48±0.08	0.20±0.04
Željezo	6.05±0.91	6.22±0.93
Lipofuscin	7.93±1.20	5.17±0.80
Melanin	0.40±0.28	0.11±0.05
Broj jedinki	N=42	N=65
Veličina	24.98±1.24	28.40±1.11

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu da melano-makrofagni centri u jetri mogu koristiti kao biomarkeri stresa i pokazatelji zdravlja riba. Ta se teza temelji na nekoliko pretpostavki. Prilikom pretjeranog oštećenja tkiva zbog nekog patološkog stanja, makrofagni agregati u centrima lokaliziraju produkte razaranja tkiva i ispoljavaju lako vidljive pigmente (lipofuscin, hemosiderin i melanin). Lipofuscin i ceroid možemo pronaći među produktima razgradnje tkiva koji sadržavaju lipoproteine. Njihov se broj povećava tijekom stanja izgladnjelosti i nekroze tkiva. Hemosiderin, produkt hemolize i razgradnje eritrocita, se također može povezati sa stanjem izgladnjelosti. Treći pigment kojeg možemo naći akumuliranog u melano-makrofagnim centrima je melanin, koji vjerojatno pomaže u daljnjem premještanju supstanci koje su unesne fagocitozom i koncentrirane u makrofagnim centrima. (Sealy i sur. 1980).

Povećana raspodjela pigmenata, broj i površina melano.makrofagnih centara ukazuju na to da su homeostatski mehanizmi u organizmu pod pretjeranim stresom i da je time narušeno zdravlje same jedinke.

Pri korištenju melano-makrofagnih centara kao biomarkera potrebno je uzeti u obzir stupanj pogreške zbog raznih varijabilnih parametara koji bi mogli utjecati na samu morfologiju melano-makrofagnih centara. Takvi su parametri spol, stupanj zrelosti, veličina i starost jedinke te temperatura okoliša. Povišenje temperature samo po sebi ne uzrokuje hiperplaziju melano-makrofagnih centara ali može povećati magnitude odgovora ribe na zagađenje. Eksperiment se paralelno s jetrom vršio i na tkivu slezene. Dobiveni su vrlo slični rezultati.

6. LITERATURA

- Agius C., Roberts J.S, 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology *Journal of Fish Diseases* **26**: 499–509.
- Agius C, 1985. The melano-macrophage centres in fish. *Fish Immunology* (ed. by M.J. Manning i M.F.Tatner): 85–105.
- Agius C. & Agbede S.A., 1984. Electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology* **24**: 471–488.
- Agius C, 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissue and age-related changes. *Developmental and Comparative Immunology* **5**: 597–606.
- Agius C, 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *Journal of Zoology* **191**: 11–31.
- Agius C, 1979. Aspects of the melano-macrophage centres in fish. *PhD Thesis, University of Stirling*.
- Ellis A.E, 1980. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Fish Diseases* **3**: 413–426.
- Ellis AE, Munro ALS, Roberts RJ, 1976. Defense mechanisms in fish I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Fish Biology* **8**: 67-78.
- Ellis A.E, 1974. Aspects of the lymphoid and reticulo-endothelial system in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *PhD Thesis, University of Aberdeen*.
- Ferguson HW, 1976a. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Comparative Pathology* **86**: 377-380.
- Ferguson H.W, 1976b. The reticulo-endothelial system of teleost fish with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *PhD Thesis, University of Stirling*.

- Fiuza T., Silva P., Paula J., Tresvenzol L., Sabóia-Morais S, 2009. The effect of crude ethanol extract and fractions of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley on the hepatopancreas of *Oreochromis niloticus* L. *Biological Research* **42**: 153-162
- Herraez M.P., Zapata A.G, 1986. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **12**: 117–126.
- Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A., Engle V.D., Blazer V.S, 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health* **13**: 105–116.
- Kranz H., 1989. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab (*Limanda limanda*) during and after infection with ulcer disease. *Diseases of Aquatic Organisms* **6**: 167–173.
- Kranz H., Gercken J, 1987. Effects of sublethal concentration of potassium dichromate on the occurrence of splenic melanomacrophage centres in juvenile plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Journal of Fish Biology* **31**: 75–80.
- Mackmull G, Michaels NA, 1932. Absorption of colloidal carbon from the peritoneal cavity of the teleost, *Tautogolabrus adspersus*. *American Journal of Anatomy* **51**: 3-47.
- Pearse A.G.E, 1972. Histochemistry. *Theoretical and Applied*, 3rd edn. Churchill-Livingstone, London.
- Peters N., Kohler A., Kranz H., 1987. Liver pathology in fishes from the Lower Elbe as a consequence of pollution. *Diseases of aquatic organisms* **2**: 87-97.
- Roberts R.J, 1975. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease: *The Pathology of Fishes* (ed. By W.E. Ribelin i G. Migaki) : 399–428.
- Romão S., Donatti L., Freitas M., Teixeir J., Kusma J, 2006. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplais malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**: 441-448.

Sealy RC, Felix CC, Hyde JS, Swartz HM (1980) Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions pp. 209-254. U: Pryor WA (ed) Free Radicals in Biology IV, Academic Press, New York

Wolke E.R., Murchelano R. A., Dickstein D.C., George C.J, 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Environmental Contamination and Toxicology* **35**: 222-227.

Zuasti A., Jara J.R., Ferrer C., Solano F, 1989. Occurrence of melanin granules and melano synthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research* **2**: 93–99.

http://balwois.mpl.ird.fr/balwois/administration/full_paper/ffp-498.pdf

<http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab3/Lab3.htm>

<http://www.rat-hole.org/sub/staining.html>

7. SAŽETAK

U posljednjih stotinu godina došlo je do velikog povećanja zagađenja okoliša. RIBE kao stanovnici najugroženijih ekosustava dolaze u doticaj sa zagađivačima od kojih se veliki dio bioakumulira u njihovom organizmu pa se zato smatra da su ribe pogodne kao biološki indikatori onečišćenja. Melano-makrofagni centri su nakupine pigmentiranih stanica u tkivima koje normalno možemo pronaći kao dio strome hematopoetskog tkiva u slezeni i bubregu te u jetri riba. Izgled melano-makrofagnih centara može varirati među vrstama, organima i fiziološkim stanjima unutar iste vrste. U njima možemo naći tri osnovne vrste pigmenata: melanin, lipofuscin i hemosiderin, a porijeklo i biokemijska uloga tih pigmenata varira i nije još u potpunosti poznata. Pretpostavlja se da je primarna funkcija tih centara uništavanje, detoksifikacija i reciklaža endogenog i egzogenog staničnog materijala. Osim funkcije “skupljača smeća”, melano-makrofagni centri smatraju se i filogenetskim prekursorom zametnih centara limfnih čvorova. Eksperimentalno je dokazano da su melano-makrofagni centri u jetri pogodni kao histološki biomarkeri stresa, no potrebno je uzeti u obzir parametre poput starosti jedinke, spola, spolne zrelosti i okolišnih faktora.

8. SUMMARY

In the last hundred years there was a large increase in environmental pollution. Fish come in contact with pollutants, of which a large part bioaccumulate in their body and are therefore believed to be suitable as biological indicators of pollution. Melano-macrophage centers are clusters of pigmented cells that can normally be found as a part of hematopoietic tissue in spleen and kidney but also in the fish liver. The appearance of melano-macrophage centers can vary between species, organs and physiological conditions within the same species. There we can find three basic types of pigments: melanin, lipofuscin and haemosiderin, but the origin and biochemical role of those pigments varies and is not yet fully known. It is assumed that the primary function of those centers is destruction, detoxification and recycling of endogenous and exogenous cellular material. Apart from being "garbage collectors," melano-macrophage centers are considered as phylogenetic precursors of germ centers of lymphatic nodes. It is experimentally shown that melano-macrophage centers, found in liver, are biologically suitable to be used as indicators of stress, but it is necessary to take into consideration variable parameters such as age, sex, sexual maturity and environmental factors.