

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

**INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICOS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E
FISIOLÓGICO DE RÃ-TOURO *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**

Danielle de Carla Dias
Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Agosto de 2006

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

**INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICOS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E
FISIOLÓGICO DE RÃ-TOURO *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**

Danielle de Carla Dias
Bióloga

Orientadora: Dra Marta Verardino De Stéfani

Co-orientadora: Dra Cláudia Maris Ferreira

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Agosto de 2006

O homem não teria alcançado o possível se repetidas vezes não tivesse tentado o impossível.

(Max Weber)

*Não sabendo que era impossível,
foi lá e fez.*

(Jean Cocteau)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo meu amor e carinho

*Aos meus pais Carlos Roberto Dias e Marly Ap. da
Silva Dias e meu irmão Igor Roberto Dias pelo
incentivo, ensinamentos e carinho de uma vida
inteira.*

Ao

*Dr. Dorival Fontanello (In memorian)
grande mestre na ranicultura. Seus
ensinamentos ficarão para toda a
eternidade.*

*À minha tia Vera Lucia Libório
(In memorian) pelo amor e carinho
durante o tempo que esteve entre
nós.*

*A toda minha família, em especial, meus
avós Julião Dias, Durvalina de Moraes
Dias e Maria Flore da Silva e minhas
tias Magaly e Mara pela ajuda e
compreensão.*

Agradecimentos:

Quero expressar meu sincero agradecimento a todas aquelas pessoas que me ajudaram a realizar este trabalho. Como são muitas pessoas, se por um acaso esquecer de alguém, espero que me perdoem.

Primeiramente à Dr^a Marta Verardino de Stéfani, pela orientação, ensinamentos, amizade e por acreditar no meu trabalho. Espero um dia poder retribuir toda a ajuda e companheirismo que você me proporcionou durante o mestrado. Muito obrigada.

Á Dr^a. Cláudia Maris Ferreira, minha primeira mestra, que mais uma vez esteve ao meu lado fortalecendo nossa amizade, me incentivando, ajudando e acreditando que eu era capaz de realizar mais este trabalho. Valeu!!!! Adoro você.

À RANAJAX – Import Export. Ltda em nome de Dinis Lourenço da Silva pela doação dos animais para o teste preliminar.

Á CAAT Cooperativa Agropecuária de Atibaia em nome de Eng^o Agr. Joaquim Edwander pela doação de ração para o teste preliminar.

Á Kishimoto do Brasil Comercial Ltda / Calpis Co. Ltd em nome de Lílían Tiyomi Sato pela doação do probiótico utilizado no experimento

Ao Adriano Padiglione Gerente de Desenvolvimento de Produtos da M. Cassab pela doação do probiótico utilizado no teste preliminar.

Á Vetnil pela doação do probiótico

À Dr^a Maria José Tavares Ranzani Paiva, minha querida Masé, “a mãezona até dos seus pseudos orientados como eu”, pela amizade, pelos ensinamentos, incentivo e pela cumplicidade científica adquirida durante todos estes anos.

À Universidade Adventista de São Paulo - UNASP, em nome do MSc. Antenor Aguiar Santos por possibilitar que as análises imunológicas fossem realizadas no laboratório de Impacto Ambiental, pela amizade e colaboração neste trabalho. Ao estagiário Lucas Faustino pela ajuda durante as coletas do teste piloto.

Aos professores da Faculdade de Medicina da USP, Dr. Luiz Alberto Amador Perreira e Dra. Lourdes Conceição Martins por toda ajuda na análise estatística. Valeu!!!!!! Vocês são demais.

Ao querido Marcio, técnico responsável pelo Ranário experimental do CAUNESP, e ao funcionário Junior, que estiveram comigo durante toda a parte experimental não só ajudando mas também ensinando.

As minhas queridas colegas e hoje amigas de pós-graduação Marina Delbon e Vanessa Xavier Linhares, que estiveram comigo em todos os momentos e que me agüentaram todos esses meses.

Às minhas amigas de estágio Fernanda Menezes França Salgueiro e Patrícia Coelho Teixeira, que me ajudaram bastante na realização deste trabalho, principalmente nas coletas. Espero um dia poder retribuir toda a ajuda de vocês.

A amiga e Prof^a. Dr^a. Elisabeth Romagosa pela valiosa contribuição e sugestões neste trabalho.

Aos estagiários e Pós-graduandos do Instituto de Pesca, Fernanda F. Salgueiro, Patrícia C.Teixeira, Guilherme C. Rocha, Antonio Antonucci, Flávia Maziero, Natália Caruso, Robson Seriani, Rodrigo Tiba e Fillipe M. Alves pela convivência, amizade e toda ajuda.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, Dra Cláudia Maris Ferreira, Dra Maria José Tavares Ranzani Paiva, Dra. Elizabeth Romagosa, Dr. Júlio Vicente Lombardi, Dr. Hécio Luiz de Almeida Marques, Dr. Nilton Rojas, Dr. Carlos Ishikawa e Dra Nelza Takahashi com quem pude aprender muitas coisas durante todos estes anos de convivência.

Ao pessoal do Ranário de “Pinda”, Andréia Pimenta e João Simões pela ajuda no teste preliminar.

Ao Instituto de Pesca pela parceria neste projeto.

Aos motoristas do Instituto de Pesca (em especial ao João Batista) que me acompanharam em muitas viagens para Pindamonhangaba e Jaboticabal.

À galera da Pós-graduação do CAUNESP, em especial Perdido, Rachel, Bruno, Elis, Luiz Ayroza, André Camargo, Casaca, Nilson, Marina Delbon, Cristiane, Patrícia e Camilo pela amizade, convívio e troca de informações.

Ao colega de pós-graduação Camilo A. Prieto pelas fotos do ranário.

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

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo

A Veralice Capatto nosso anjo da guarda na secretaria da pós e Michele, pela amizade e toda ajuda.

Aos meus pais Carlos e Marli e meu irmão Igor, que são sem dúvida nenhuma, minha fortaleza, meu porto seguro e meus maiores incentivadores. Eu amo vocês.

Aos meus grandes amigos Walkiria e Tado, pelos longos anos de amizade e pelas maravilhosas viagens para Long Beach durante o estresse da pós.

As meninas da “República Sossego da Vovó”, Anna Paula, Elis, Gabriela, Marina e Melissa, que foram a minha família em Jaboticabal. Obrigada pela amizade, companheirismo e os momentos de diversão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Desempenho.....	5
2.2 Probiótico.....	7
2.2.1 Efeitos Biológicos.....	9
2.2.2 Seleção de Bactérias.....	10
2.2.3 Imunidade.....	10
2.3 Características Hematológicas.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Instalações e Condições Experimentais.....	22
3.2 Animais utilizados.....	23
3.3 Probióticos Utilizados.....	23
3.4 Alimentação e Manejo.....	25
3.5 Parâmetros Analisados.....	25
3.5.1 Ganho de Peso	25
3.5.2 Conversão Alimentar.....	26
3.5.3 Sobrevivência.....	27
3.5.4 Taxa de Crescimento Específico.....	27
3.5.5 Análises Hematológicas.....	27
a- Coleta de Sangue.....	28
b- Confecção das Extensões Sangüíneas.....	30
c- Contagem Total de Leucócitos e Contagem Total de Trombócitos.....	31
d- Contagem Diferencial de Leucócitos	32
e- Contagem de Eritrócitos.....	32
f- Determinação do Hematócrito.....	33

g- Determinação da Concentração de Hemoglobina.....	34
h- Índices Hematimétricos Absolutos.....	35
3.5.6 Análises Imunológicas.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Temperatura.....	40
4.2 Desempenho Produtivo.....	40
4.2.1 Ganho de Peso.....	40
4.2.2 Conversão Alimentar.....	44
4.2.3 Sobrevivência.....	46
4.2.4 Taxa de Crescimento Específico.....	47
4.3 Análises Hematológicas.....	48
4.4 Análises Imunológicas.....	60
5 CONCLUSÕES.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7 ANEXOS.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Vista interna das baias experimentais utilizadas no experimento com probióticos.....	22
FIGURA 2	Vista interna do galpão onde localizava-se as baias experimentais utilizadas no experimento com probióticos.....	23
FIGURA 3	Cocho vibratório usado para alimentação de rãs-touro durante o experimento com probióticos.....	25
FIGURA 4	Tubos de PVC utilizados no transporte de rãs-touro, <i>Rana catesbeiana</i>	28
FIGURA 5	Vista das caixas de manutenção de rãs-touro <i>Rana catesbeiana</i> no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca-SP.....	29
FIGURA 6	Exemplar de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> sendo anestesiado e retirada de sangue por punção da artéria ciática.....	29
FIGURA 7	Vista ventral de anuro evidenciando artérias e veias.....	30
FIGURA 8	Confecção das extensões sanguíneas de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i>	31
FIGURA 9	Esquema do procedimento da contagem diferencial e total e leucócitos e total de trombócitos.....	32
FIGURA 10	Câmara de Neubauer, esquema de retículo para contagem dos glóbulos vermelho e leucócitos e detalhe do retículo central.....	33
FIGURA 11	Tudo de ensaio com cianometahemoglobina onde foi adicionado 20 µL de sangue para determinar a taxa de hemoglobina.....	35
FIGURA 12	Valores médios da temperatura ambiente (máxima e mínima) durante o experimento com probióticos.....	40
FIGURA 13	Peso médio (g) das rãs-touro, <i>Rana catesbeiana</i> durante o período experimental.....	42
FIGURA 14	Exemplar de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> ao final do período experimental.....	44

FIGURA 15	Valores médios de hematócrito, taxa de hemoglobina e número de eritrócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> tratadas com diferentes probióticos e doses.....	50
FIGURA 16	Valores médios de VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular médio) de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> tratadas com diferentes probióticos e doses.....	51
FIGURA 17	Valores médios dos valores absolutos de trombócitos de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> tratados com os diferentes probióticos e doses.....	52
FIGURA 18	Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> alimentadas com diferentes probióticos e doses; Er = Eritrócito, Bs = basófilos, Es = Eosinófilos, Nt = Neutrófilos, Lf = Linfócitos, Mn = Monócitos e Tb = Trombócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000X.....	54
FIGURA 19	Valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> tratadas com diferentes probióticos e doses.....	55
FIGURA 20	Valores médios do número de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , tratadas com os diferentes probióticos e doses.....	59
FIGURA 21	Valores percentuais da capacidade fagocíticas de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> , tratadas com os diferentes probióticos e doses.....	61
FIGURA 22	Valores percentuais do Índice fagocítico de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> , tratadas com os diferentes probióticos e doses.....	61
FIGURA 23	Fotomicrografia de lavado abdominal de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> , evidenciando células fagocíticas com leveduras em seu interior.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Princípio ativo dos probióticos adicionados a ração de ra-touro, <i>Rana catesbeiana</i>	24
TABELA 2	Tratamentos, código, doses e unidades formadoras de colônias (UFC/g) utilizados no experimento com probióticos.....	24
TABELA 3	Ganho de peso (g), conversão alimentar (CA), sobrevivência e taxa de crescimento específico de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> , alimentadas com probióticos.....	41
TABELA 4	Peso médio(g) e desvio padrão de rãs-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , obtido durante o teste com probióticos.....	42
TABELA 5	Valores médios e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de rã-touro <i>Rana catesbeiana</i> , tratadas com probióticos.....	48
TABELA 6	Valores médios e erro padrão (EPM) dos números absolutos de trombócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> tratados com diferentes probióticos e doses.....	52
TABELA 7	Valores médios da porcentagem e erro padrão (EPM) da média de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> tratados com diferentes probióticos e doses.....	53
TABELA 8	Valores absolutos médios de cada leucócito e erro padrão da média (EPM) do sangue periférico de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> tratadas com diferentes probióticos e doses.....	58
TABELA 9	Valores médios e erro padrão da média (EPM) da frequência porcentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , tratadas com os diferentes probióticos e doses.....	60

RESUMO

DIAS, D. C. **Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.** Jaboticabal, 2006. 78p. Dissertação (Mestrado) Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Foi avaliado o efeito de dois probióticos adicionados à ração comercial (40%PB), no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro *Rana catesbeiana*. O teste foi conduzido com duas doses de cada probiótico (5g/kg e 10g/kg de alimento) mais um grupo controle com três réplicas simultâneas, totalizando 5 tratamentos. Foram avaliados o ganho de peso (GP), a conversão alimentar (CA), as análises hematológicas, como contagem diferencial de leucócitos, número de eritrócitos, contagem total de leucócitos e de trombócitos, determinação da porcentagem de hematócrito, determinação da taxa de hemoglobina, os índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM) e análises imunológicas como capacidade fagocítica e índice fagocítico. Os resultados mostraram que os probióticos produziram efeito no ganho de peso de *Rana catesbeiana* até atingirem 200g e também na conversão alimentar, influenciando somente nos números absolutos dos basófilos nos parâmetros hematológicos dos animais. As análises imunológicas mostraram que os probióticos apresentaram efeito imunoestimulador.

Palavras-chave: ranicultura, análises hematológicas, análises imunológicas.

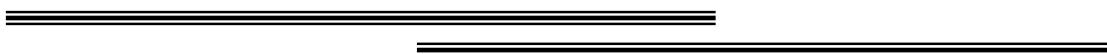
ABSTRACT

DIAS, D. C. **Influence of probiotics in the productive and physiological performance of bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.** Jaboticabal, 2006. 78p. Dissertação (MSc) Aquaculture Center, São Paulo State University.

It was evaluated the effect of two probiotics added in the commercial ration (40%CP), in the productive and physiological performance of bullfrog, *Rana catesbeiana*. The test was lead with two doses of each probiotic (5g/Kg and 10g/Kg of food) plus a control group with three repetitions totalizing 5 treatments. Was evaluated the weight gain, feed conversion, hematological analyses as differential counting of leucocytes, counting of erythrocyte's number, total counting of leucocytes and trombocytes, determination of the hematocryts, and haemoglobin tax, absolute hematimetrycs indices (MCV, MCH and MCHC) and imunological analyses as fagocytical capacity and fagocytic index. The results had shown that the probiotics produced effect in the weight gain of *Rana catesbeiana* until reaching 200g, and in the feed conversion, only influencing in the absolute numbers of the basophils in the hematological parameters of the animals. The imunological analyses had shown that the probiotics had presented imunostimulator effect.

Key-word: frogculture, hematological analyses, imunological analyses.

1 - INTRODUÇÃO



A ranicultura no Brasil é uma atividade que tem despertado grande interesse por parte de produtores, investidores e grandes empresas, por propiciar retorno econômico aos produtores em razão do elevado preço da carne de rã no mercado, que é o principal produto nessa atividade, com excelente sabor e qualidade nutricional (LIMA e AGOSTINHO, 1988).

A rã-touro, *Rana catesbeiana*, originária da América do Norte, tem sido a única espécie utilizada pelos ranicultores. Para esta espécie, o tempo para o desenvolvimento completo da fase larvária (girino) até a metamorfose é de 60 a 70 dias e para atingir a fase adulta, de três a quatro meses (LIMA e AGOSTINHO, 1992).

Segundo BRAGA (1997), na grande maioria das criações de rã-touro em cativeiro, observa-se descontinuidade de produção causada pelo uso de instalações inadequadas e pela execução de um manejo diferente do proposto pelo sistema de criação adotado, além da falta de um subsídio técnico pertinente à atividade. Esse panorama gera dificuldade para garantir o fornecimento do produto ao mercado e, também, elevação do preço final para o consumidor.

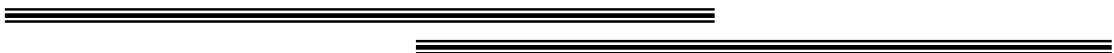
A produção de alimentos de origem animal, com o propósito de baixar os custos para o consumidor, têm levado os pesquisadores a estudarem diversos tipos e/ou melhores combinações de nutrientes conhecidos e de novas substâncias químicas, com o objetivo de aumentar a eficiência alimentar e a taxa de crescimento, um exemplo disso são os probióticos (CASTRO, 2003).

De acordo com CULLEY JR. *et al.* (1978), os principais problemas que têm atrasado o desenvolvimento da criação de rãs são: alimentação e nutrição, doenças e reprodução.

Baseando-se no exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do uso de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rãs-touro *Rana catesbeiana*, na fase pós-metamórfica bem como, verificar seu possível efeito

no sistema hematológico e imunológico, diminuindo a mortalidade e conseqüentemente aumentando a produtividade.

2 – REVISÃO DE LITERATURA



2.1 - Desempenho

A ranicultura é uma atividade zootécnica economicamente viável, que vem sendo implantada no meio rural brasileiro assim como em outros países. No Brasil, o crescimento da ranicultura tem sido observado de forma acelerada na última década, devido à evolução da tecnologia e, principalmente, ao gradativo aperfeiçoamento das instalações e das técnicas de manejo adotadas pelos técnicos e produtores (STÉFANI, 2001).

Esta atividade teve início no Brasil em 1935, quando foi implantado o primeiro ranário no Rio de Janeiro, a partir de matrizes trazidas do Canadá (HOFFMANN *et al.*, 1988). No estado de São Paulo, a criação começou a partir de 1940, por meio da Divisão de Caça e Pesca do antigo Departamento de Produção Animal, da Secretaria da Agricultura (FONTANELLO, 1994).

Apesar de ser uma espécie exótica, a rã-touro demonstrou boa adaptação ao clima subtropical brasileiro (FONTANELLO *et al.*, 1988). Suas características zootécnicas e a alta qualidade de sua carne fazem da rã um produto de grande interesse ao processamento industrial e boa aceitação pelo mercado consumidor (LIMA e AGOSTINHO, 1989). Dentre estes fatores, as pesquisas desenvolvidas na área de nutrição dentro da ranicultura têm grande importância para o desenvolvimento da atividade.

Durante muitos anos os dados estatísticos sobre o mercado nacional e internacional de carne de rã tem sido limitados, desatualizados e incompletos. Quase a totalidade da produção de rãs cultivadas é comercializada nos mercados locais ou regionais dos países produtores, enquanto que aproximadamente 95% da demanda mundial é suprida por produtos oriundos da caça (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Segundo LIMA *et al.* (1999) o Brasil tem capacidade para produzir 220 toneladas por ano levando em consideração as instalações já construídas, mas segundo o último levantamento, está produzindo aproximadamente 114 toneladas por ano.

Segundo SILVA (1988), a velocidade de crescimento em rãs-touro é mais acentuada a partir do final da metamorfose até aproximadamente 120 dias de idade, sendo que o maior ou menor período de metamorfose não interfere no referido crescimento.

A rã-touro, *Rana catesbeiana*, apresenta consumo alimentar, conversão alimentar e crescimento muito irregular e, portanto, para serem analisadas necessita-se períodos longos de observações diárias (CULLEY JR. e GRAVOIS JR., 1971).

De acordo com FONTANELLO (1983), a fase posterior a metamorfose é fundamental no processo de criação, pois a rã possui potencial de crescimento capaz de responder ao tratamento a ela dispensado; passada pela fase inicial, o consumo de alimento tende a aumentar, porém o ganho de peso não segue o mesmo ritmo, diminuindo.

LIMA *et al.* (1988) alimentaram rãs-touro com ração farelada durante todo o período de engorda (quatro meses) e obtiveram ganho de peso médio de 75,91g e uma conversão alimentar de 6,17:1. A conversão alimentar ruim foi conseqüência de uma grande perda de ração pela inadequação dos cochos utilizados no experimento, segundo os próprios autores.

FRANQUEIRA (1992) comparando ração peletizada com farelada, para rã-touro, observou conversão alimentar aos 140 dias de idade, que variou de 2,73:1 a 1,74:1, respectivamente.

LIMA e AGOSTINHO (1992) obtiveram resultados de 1,50 a 2,00:1 para conversão alimentar de rãs-touro alimentadas com ração de truta peletizada.

BRAGA *et al.* (1995) trabalhando com baias-teste com temperatura e fotoperíodo controlados, constataram que a rã-touro apresentou resultados de conversão alimentar de 1,22 e 1,55:1, nas temperaturas de 25 e 30 °C respectivamente, quando alimentadas com ração de truta extrusada.

LIMA, *et al.* (2003) observou variação na conversão alimentar de 1,3 a 1,6:1 em três ranários em diferentes região, no município de Anchieta (ES), Coimbra (MG) e Visconde de Rio Branco (MG).

2.2 - Probiótico

Determinados tipos de alimentos têm efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro. O estudo desses alimentos, denominados de funcionais, e seus componentes responsáveis por esse efeito, tornou-se intenso apenas nos últimos anos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). São considerados alimentos funcionais aqueles que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado, que esses efeitos restringem-se à melhora da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

O conceito de probiótico tem mudado através do tempo. Para FULLER (1989), são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. SCHREZENMEIR e DE VRESE (2001) consideraram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microorganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram, por colonização, a microbiota própria das mucosas do sistema do hospedeiro, produzindo efeitos

benéficos em sua saúde. Os probióticos, em sua maioria são produtos preparados com *Lactobaccillus acidophillus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e em alguns casos leveduras (GUZMÁN, 1992).

Os probióticos são ingredientes não digeríveis incorporado aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como substrato seletivo no cólon (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação dos probióticos ainda não está inteiramente elucidado. A ação deste composto ocorre pela exclusão competitiva (OZAWA *et al.*, 1978), competição por locais de adesão no aparelho digestivo (WATKINS e MILLER, 1983), por estímulo da imunidade (INOOKA *et al.*, 1986), por maior produção de ácido láctico (FULLER, 1977), pela diminuição da produção de aminas tóxicas e aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (KOZASA, 1989), por economia de energia e por aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (FULLER, 1989). A ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: uma determinando melhores índices zootécnicos com maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar; outra, a redução da colonização intestinal por alguns patógenos, como por exemplo, as salmonelas.

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. Essa composição é capaz de induzir à possíveis variações físicas e químicas no intestino (LEE *et al.*, 1999). Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microorganismos, nela encontrados, potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER e GIBSON, 1998).

Segundo CASTRO (2003), é atribuído aos probióticos várias ações benéficas como o auxílio na digestão e absorção de nutrientes (envolvimento na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares), ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas), produção de lactato e acetato que reduzem o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano, produção de metabólitos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas, produção de vitaminas do grupo B, estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos, ativação do sistema imune contra células malignas, restauração da microbiota intestinal após tratamento com antibiótico.

O uso de probiótico na aquicultura é um tema muito recente, mas tem-se observado resultados promissores, principalmente no cultivo de larvas de peixes e moluscos (PLANAS e CUNHA, 1999).

2.2.1 – Efeitos Biológicos

Os mecanismos de ação dos probióticos, segundo FULLER (1989) podem ser enumerados em três, a supressão do número de células bacterianas viáveis mediante produção de compostos com atividades antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; o segundo seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; e o terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Por exemplo, em humanos, o número de *Lactobacillus rhamnosus* para

reduzir significativamente a ocorrência da chamada diarreia dos viajantes é de 10^9 UFC/g (OKSANEN *et al.*, 1990).

2.2.2 – Seleção de Bactérias

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: o gênero ao qual pertence a bactéria, a estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente o trato gastrointestinal, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos a ser metabolicamente ativo no intestino (COLLINS *et al.*, 1998 e SAARELA *et al.*, 2000).

Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*) e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

KLEIN *et al.* (1998) relataram que o gênero *Bifidobacterium* também é considerado como bactérias lácticas devido a propriedades bioquímicas e fisiológicas no trato gastrointestinal, em comum com os outros gêneros de bactérias lácticas. Dentre esses microrganismos, as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais frequentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras. Por outro lado, certas bactérias do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* são patógenos oportunistas (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999).

2.2.3 Imunidade

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido um grande número de pesquisas, sendo a maioria realizada em mamíferos (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido como estes atuam (CROSS, 2002). Este efeito pode estar relacionado à capacidade de os microorganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando linfócitos B produtores de IgA e a migração de linfócitos T do intestino (PERDIGÓN e HOLGADO, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002). MAASSEN *et al.* (2000) comprovaram, no entanto, que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal depende da cepa de *Lactobacillus* utilizada, salientando a necessidade de realizar cuidadosa seleção das cepas candidatas a probiótico. *Lactobacillus casei* apresentou efeito imunomodulador similar ao de *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Corynebacterium parvum* e *Streptococcus pyogenes* (PERDIGÓN e ALVAREZ, 1992).

O efeito de outros lactobacilos sobre a imunidade também tem sido estudado. ÁVILA *et al.* (1998) compararam a eficiência de uma vacina específica e *Lactobacillus acidophilus*, e da associação destes dois produtos no controle da diarreia por *Escherichia coli* enterotoxigênica em leitões, e demonstraram que os melhores resultados foram obtidos com a combinação de vacina e probiótico. VITINI *et al.* (2000) testaram a influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas tais como *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* sub. sp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, e verificaram que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve

correlacionado com o aumento no número de linfócitos T CD₄⁺ (células produtoras de linfocinas que ativam outras células do sistema imune), indicando que algumas bactérias testadas somente induziram ativação dos linfócitos B produtores de IgA. Também foi observado que não houve influência sobre os linfócitos T CD₈⁺ (células citotóxicas que matam outras células pelo contato), indicando que essas bactérias não foram capazes de induzir citotoxicidade.

Com relação a bactérias não ácido-láticas, pode-se citar, entre outros, o trabalho de COPPOLA *et al.* (2005), que estudaram o efeito de probióticos preparados com *Bacillus cereus* var. *toyoi* e com *Saccharomyces boulardii*, na resposta imune de camundongos à vacinação simultânea com uma bacterina tetravalente de *Escherichia coli* patogênica para suínos e uma vacina replicante contra a *Parvovirose canina*. Comprovaram que o probiótico de *S. boulardii* induziu resposta humoral significativamente mais eficiente à bactéria, enquanto o probiótico de *B. cereus* var. *toyoi* induziu resposta significativamente mais elevada à vacina de *Parvovirus canino*.

Segundo COPOLLA e GIL-TURNES (2004), os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, tem efeito imunomodulador, embora a forma de ação seja pouco conhecida. Segundo os autores, as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam o aprofundamento destes estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos, promotores de crescimento e imunoestimulante.

O *Lactobacillus casei* induziu resposta celular tipo 1 em camundongos, aumentando a produção *in vitro* de células peritoniais e de células esplênicas

(NEUMAN, 2000). Sua administração imunizou camundongos contra patógenos intestinais pela indução do aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (KATO *et al.*, 1983; PERDIGÓN e ALVAREZ, 1992), da atividade das células *natural killer* (KATO *et al.*, 1984), da produção de fator citotóxico pelas células de Kupfer e macrófagos peritoniais (HASHIMOTO, 1985), e da secreção de IgA no lúmen intestinal (PERDIGÓN *et al.*, 1991). A cepa Shiota estimulou a resposta imune celular, provocando uma redução nos títulos de vírus da Influenza no trato respiratório quando administrada por via nasal (HORI *et al.*, 2001) e oral (HORI *et al.*, 2002). *L. rhamnosus* reduziu a morbidade de *E. coli* em camundongos infectados experimentalmente, estimulando o aumento da atividade fagocítica e dos títulos de anticorpos específicos na Imunoglobulina A (IgA) (SHU e GILL, 2002).

Na aquicultura, há interesse especial em aumentar a resistência às doenças e incrementar a atividade fagocítica de células de defesa. O aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos é induzida pela liberação de patógenos mortos ou de seus produtos como descrito por ROITT *et al* (1998) e pela aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes. Esses imunoestimulantes aumentam a mobilização enzimática de neutrófilos (SIWICKI *et al.*, 1998), que possuem grandes quantidades de peroxidase (ELLIS, 1997), uma enzima lisossômica presente nas células fagocíticas e que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio, no processo de fagocitose (OLIVEIRA *et al.*, 1997)

2.3 – Características Hematológicas

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

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

O plasma, líquido amarelo, semitransparente é formado por cerca de 90% de água e 10% de substâncias sólidas, entre as quais encontram-se proteínas, sais minerais, glicose, uréia, aminoácidos, colesterol, gorduras, gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico), hormônios, enzimas, anticorpos, etc (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Em relação aos anfíbios, DIAS (1992) relatou a carência de informações sobre a composição celular do sangue. NAOUM *et al.* (1986) e CANNON *et al.* (1987) enfatizaram esse fato e que este quadro se agrava quando se referem aos elementos celulares sangüíneos das formas pré-metamórficas de anuros. É importante salientar que esta carência de informações ocorre até os dias atuais.

Os glóbulos vermelhos, também chamados de hemácias ou eritrócitos, na maioria dos vertebrados formam-se e amadurecem na medula óssea pelo processo denominado eritropoiese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). SCHMIDT-NIELSEN (1996), ressaltou que, nos mamíferos, os glóbulos vermelhos são anucleados, têm

forma de disco esférico e são ligeiramente bicôncavos; nas aves, répteis, anfíbios e peixes, são nucleados e se apresentam quase que universalmente ovais. Os eritrócitos dos anfíbios são células geralmente elípticas com núcleo central, variando muito de tamanho entre as espécies. Nos anuros, como nos outros vertebrados, o citoplasma dos eritrócitos é homogêneo e carrega em seu interior a hemoglobina (TURNER, 1988). Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue, cuja função consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico, desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986) existe diferenças morfológicas entre os glóbulos vermelhos nas 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. Os eritrócitos são elípticos, achatados e nucleados. Cada eritrócito mede aproximadamente 14 por 23 μm e ocorrem aproximadamente 400.000 por mm^3 de sangue. TURNER (1988) descreve a seqüência de amadurecimento dos eritrócitos nos vertebrados como sendo: eritróide precursor ou rubrócito • eritroblasto • eritroblasto policromático • reticulócito • eritrócito normocromático.

Nos anfíbios, os glóbulos brancos ou leucócitos apresentam-se em número próximo de 7.000 por mm^3 e são de dois tipos: os agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, que são os linfócitos e os monócitos, e os granulócitos, que se classificam em neutrófilo, basófilo e eosinófilos, cujos citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelos corantes de Romanowsky¹ (STORER e USINGER, 1979). A principal função dos glóbulos brancos é a defesa

¹ Corante de Romanowsky – Corante utilizado em hematologia para visualização microscópica, composta basicamente por: azul-de-metileno, eosina e azures.

do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

DUELLMAN e TRUEB (1986), TURNER (1988) e DIAS (1992) afirmaram que os linfócitos são os leucócitos mais freqüentes no sangue periférico de anuros larvais. Apresentam núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico, algumas vezes apresentando microvilosidades (pseudopoidia). Os linfócitos produzem anticorpos e estão relacionados ao processo de rejeição e participam do processo inflamatório (FINN e NIELSON, 1971; MacARTHUR *et al.*, 1984; TURNER, 1988).

Os neutrófilos possuem freqüentemente núcleo segmentado. A cromatina nuclear é compacta e não são evidenciados nucléolos. São chamados de polimorfonucleares, devido à grande variação de formas de seu núcleo excêntrico, que pode apresentar-se em bastonete ou com várias segmentações. O citoplasma dos neutrófilos dos anfíbios apresenta grânulos pequenos quando comparados aos dos outros vertebrados. Variam de tamanho, de forma e sub-estruturas, dentro e entre as espécies (TURNER, 1988). Estas células representam a primeira defesa contra os microorganismos, sendo células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções (THUVANDER *et al.*, 1987; TURNER, 1988) e possuem um sistema de agentes microbicidas. Estudos em diversas espécies de peixes demonstraram a capacidade fagocítica dos neutrófilos sangüíneos ou teciduais ao englobar partículas antigênicas (JORGENSEN *et al.*, 1993) e bactérias (Do VALE *et al.*, 2002).

Os basófilos são figuras sangüíneas comuns e abundantes no sangue periférico de anuros larvais, particularmente em girinos de *R. catesbeiana* (FERREIRA, 2002). São células menores que os neutrófilos, com forma arredondada e contorno regular. O núcleo acompanha o formato da célula, apresenta cromatina

compactada e não têm nucléolos. O citoplasma apresenta granulações grosseiras, basofílicas, que recobrem o núcleo na maioria das vezes (TURNER, 1988; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Ultraestruturalmente, os basófilos apresentam citoplasma irregular, com grandes projeções citoplasmáticas, granulações esféricas, discreta formação de retículo endoplasmático granular e elevada quantidade de mitocôndrias e ribossomos livres (RIBEIRO, 1978; LÓPEZ-RUIZ *et al.*, 1992). O núcleo apresenta cromatina pouco densa e raramente observa-se nucléolo (RIBEIRO, 1978; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Embora exerçam função fagocítica não o fazem com a mesma avidez dos neutrófilos. Nos mamíferos, são células derivadas da medula óssea e participam de processos alérgicos e resposta imunológica (LORENZI, 1999). Em peixes, RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004) sugerem que tal granulócito é mais freqüente em portadores de parasitoses, enquanto que ROBERTS (1981) relaciona os mesmos a processos alérgicos, por possuírem histamina em seus grânulos.

Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilas no citoplasma. São células menos freqüentes que os neutrófilos. O núcleo tende a ser pouco lobulado e apresenta-se basofílico, com cromatina densa (TURNER, 1988; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Suas principais funções são fagocitar e destruir complexos de antígenos com anticorpos, limitar e circunscrever o processo inflamatório, sendo as últimas a surgir durante o processo inflamatório (SUZUKI, 1986).

Os monócitos são raros em anuros e podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolado e basofílico. São considerados verdadeiras células em trânsito no sangue periférico (LORENZI, 1999).). Sob condições apropriadas,

estas células deixam o sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (BOOMKER, 1981; FULOP e McMILLAN, 1984; MATUSHIMA e MARIANO, 1996; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Segundo THUVANDER *et al.* (1987); DOGGET *et al.* (1987), os monócitos são células parcialmente diferenciadas e apresentam moderada propriedade fagocítica. Sumarizando, o critério para definir monócito e macrófago é a ávida fagocitose e suas localizações teciduais. O termo monócito, de acordo com a definição de fagócito mononuclear de Van FURTH *et al.* (1972) é considerado quando está circulando no sangue e macrófago é aplicado para células teciduais.

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de anfíbios são células completas, predominantemente elípticas, arredondadas ou fusiformes, com núcleo fusiforme (PENHA *et al.*, 1996). Ultraestruturalmente, os trombócitos apresentam formas variadas. Raramente observa-se complexo de Golgi definido mas sem vacuolização, o que o difere dos linfócitos (RIBEIRO, 1978). A atividade fagocitária em trombócitos foi descrita em anfíbios por DIAS e SINHORINI (1991) e PENHA *et al.* (1996). Um aspecto distinto dos trombócitos de anfíbios é a presença de grânulos uniformes, esféricos e azurófilos dentro do citoplasma, que podem assumir distribuição bipolar ou difusa (PENHA *et al.*, 1996). A função e a ocorrência de trombócitos ainda permanece controversa. Os trombócitos têm sido geralmente considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (GARDNER e YEVICH, 1969; CASILLAS e SMITH, 1977), desempenhando papel análogo às plaquetas (PENHA *et al.*, 1996). Em anfíbios, estas células possivelmente têm papel na fagocitose de corpos estranhos. Em girinos de *Rana catesbeiana*, os trombócitos podem ser as maiores células inflamatórias (DIAS e SENHORINI, 1991).

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL), é um método que permite ao pesquisador ter um panorama da porcentagem dos tipos de células existentes no sangue (RANZANI-PAIVA, 1995).

Atualmente, o método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971) é o mais utilizado em laboratórios clínicos de medicina humana, para medir o volume dos eritrócitos sedimentados. Este teste é de simples realização, utilizando-se apenas uma centrífuga de alta velocidade, tubos capilares e cartão de leitura. É também bastante utilizado em organismos aquáticos por requerer pequenas quantidades de sangue e ser de fácil realização em campo. O princípio deste método é compactar os eritrócitos na parte inferior do tubo e o volume por eles ocupado em relação ao sangue total.

A determinação da concentração de hemoglobina é um dos meios mais simples e usuais como indicador de anemias. O método empregado para organismos aquáticos é o cianometahemoglobina. Este método consiste em adicionar sangue em uma solução contendo ferricianeto de potássio e cianeto de potássio (COLLIER, 1944).

Outra análise realizada em hematologia é a contagem de eritrócitos. O número de eritrócitos, bastante usados em pesquisas hematológicas de mamíferos, é dificilmente feito sem erros em peixes, pela presença do núcleo tanto em leucócitos como em eritrócitos. Os diluentes comumente usados na contagem total dos glóbulos brancos rompem as células, restando apenas os núcleos dos glóbulos brancos, que são contados, uma vez que os eritrócitos são anucleados. Para obter o número total de eritrócitos, subtrai-se o número de leucócitos da contagem total de células. Em organismos aquáticos, este método impossibilita a contagem, pois

restariam a contagem, também, após o rompimento das células, os núcleos dos eritrócitos. Neste caso, o método utilizado para a contagem de eritrócitos é o visual na câmara hematimétrica de Neubauer (RANZANI-PAIVA, 2005).

Em hematologia são utilizados três índices hematimétricos calculados a partir do número de eritrócitos por mm^3 de sangue, da taxa de hemoglobina e da relação glóbulo-plasmático (hematócrito). São eles: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Esses índices são utilizados na caracterização morfológica do sangue dos animais e das anemias.

O VCM, que expressa o volume médio dos eritrócitos em fentolitro (fL, anteriormente usado μ^3), é maior em peixes, anfíbios, répteis e aves do que em mamíferos, devido à presença de núcleo nas células desses animais (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

O HCM indica o peso médio de hemoglobina por eritrócito, em picograma (pg/cel). WINTROBE (1934) comparou valores hematológicos de vários vertebrados e observou variações de HCM, sendo que as células maiores apresentavam maior quantidade de hemoglobina. Por outro lado, as variações dos valores de HCM eram inversas às do número de eritrócitos/ mm^3 de sangue, mantendo a concentração de Hb no sangue total relativamente constante.

CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), indica o valor médio da porcentagem em peso da hemoglobina por eritrócito e varia pouco entre as espécies.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações e Condições Experimentais

O experimento foi realizado no Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, localizado no Campus de Jaboticabal, no período de março a julho de 2005, totalizando 104 dias.

Foram utilizadas 15 baias de 3 m² (Figura 1) localizadas dentro de um galpão coberto por telhas de amianto, com ventilação lateral (Figura 2).

A temperatura ambiente do galpão foi aferida diariamente, com termômetro de máxima e mínima.



Figura 1 - Vista interna das baias experimentais utilizadas no experimento com probióticos (A = abrigo; Co = cocho vibratório e Ca = canaleta de água)



Figura 2 - Vista interna do galpão onde localizava-se as baias experimentais utilizadas no experimento com probióticos

3.2 – Animais Utilizados

Foram utilizados 900 imagos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, recém metamorfoseados, com peso médio inicial de $11,74g \pm 1,04g$, provenientes do Setor de Ranicultura do CAUNESP, distribuídos em 15 baias experimentais na densidade de 20 rãs/m².

3.3 Probióticos Utilizados

Foram utilizados dois probióticos comerciais (P₁ e P₂) que mostraram os melhores resultados em um ensaio preliminar realizado no Ranário Experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária do Vale do

Paraíba – APTA, localizado em Pindamonhangaba – SP. A composição de cada probiótico encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Princípio ativo dos probióticos adicionados a ração de Rã-touro *Rana catesbeiana*

Probióticos	Princípio Ativo
P1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> e <i>Enterococcus faecium</i>
P2	<i>Bacillus subtilis</i>

Os probióticos (em pó) foram adicionados diretamente à ração comercial extrusada – Polinutri (40% PB, 12% FB, 8% EE) oferecida aos animais *ad libitum*. As doses utilizadas foram 5g/kg de ração (metade da dose utilizada no ensaio preliminar) e 10g/kg de ração (dose comercial). Os probióticos foram codificados (Tabela 2) e as provas foram realizadas com três réplicas simultâneas mais um grupo controle, onde os animais receberam apenas ração comercial, sem adição de probiótico.

Tabela 2 - Tratamentos, código, doses e unidades formadoras de colônias (UFC/g) utilizados no experimento com probióticos

Tratamento	Código	Dose	UFC/g
Controle	Tratamento 1 (T ₁)	-----	-----
Probiótico 1 Dose 1	Tratamento 2 (T ₂)	5g/kg ração	3 X 10 ⁶
Probiótico 1 Dose 2	Tratamento 3 (T ₃)	10g/kg ração	3 X 10 ⁶
Probiótico 2 Dose 1	Tratamento 4 (T ₄)	5g/kg ração	10 ⁹
Probiótico 2 Dose 2	Tratamento 5 (T ₅)	10g/kg ração	10 ⁹

3.4 – Alimentação e Manejo

A ração foi fornecida *ad libitum* em cochos vibratórios (Figura 3), os quais permaneciam ligados das 7:00 às 19:00 horas, com intervalos de 15 em 15 minutos.

Diariamente as baias experimentais eram limpas, a canaleta de água esvaziada e a água repostada. Por ocasião das biometrias realizava-se lavagem total.



Figura 3 – Cocho vibratório usado para a alimentação de rã-touro durante o experimento com probiótico.

3.5 – Parâmetros Analisados

3.5.1 – Ganho de Peso

No início do experimento, todos os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente nas baias. A cada 28 dias eram feitas biometrias com amostragem de 15 animais (amostragem de 20%) de cada baia pesados individualmente. Foram calculadas as médias por tratamento para curva de crescimento.

Para determinar o desempenho de produção, foi observado ao final do experimento, o ganho de peso através da fórmula: $GP = \text{peso final} - \text{peso inicial}$.

Para verificar a diferença entre as médias do ganho de peso entre os tratamentos, foi realizada análise descritiva de todas as variáveis em termos de seus

valores de tendência central e de dispersão (BERQUÓ *et al.*, 1981). Foram realizados os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov para se verificar a homocedasticidade e a normalidade dos dados, respectivamente (MORETTIN e BUSSAB, 1982; KLEINBAUM *et al.*, 1998). Como as variáveis não apresentaram estes dois princípios satisfatórios mesmo após realizar a transformação dos valores (logaritimização) foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis para se comparar grupos e o teste de Friedman para se comparar tempos dentro de cada um dos grupos (SPIEGEL, 1981). O nível de significância foi de 5%.

3.5.2 - Conversão Alimentar (CA)

Para quantificar o consumo de ração, toda a sobra de ração do dia anterior, de cada baia, foi recolhida e armazenada em potes plásticos para posterior congelamento. A cada 28 dias esta sobra de ração era seca em estufa com recirculação de ar com temperatura de 50° C por 24h.

Com os valores de consumo de ração em matéria natural e do ganho de peso, foi calculado a conversão alimentar através da fórmula:

$$CA = \frac{\text{consumo de ração}}{\text{ganho de peso}} \text{ g}$$

Para verificar diferenças entre os resultados de conversão alimentar entre os diferentes tratamentos, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (ZAR, 1996). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

3.5.3 – Sobrevivência (S)

Ao final do experimento foi avaliada a sobrevivência através da fórmula:

$$S = \frac{\text{total de rãs final}}{\text{total de rãs inicial}} \times 100$$

Para verificar diferenças entre os resultados de sobrevivência entre os diferentes tratamentos, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (ZAR, 1996). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

3.5.4 – Taxa de Crescimento Específico (TCE)

Outro parâmetro utilizado para verificar o desempenho zootécnico foi a taxa de crescimento específico através da equação:

$$TCE = \frac{\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}}{\text{dias de experimento}} \times 100$$

Onde: ln = Log natural

Para verificar diferenças entre os resultados da taxa de crescimento específico dos diferentes tratamentos, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (ZAR, 1996). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

3.5.5 - Análises Hematológicas

No final do período experimental (104 dias), 18 rãs de cada tratamento foram transportadas para o Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto

de Pesca – SP, onde foram realizadas as análises hematológicas. Para o transporte dos animais, utilizou-se tubos de PVC de quatro polegadas, com as extremidades teladas (Figura 4).



Figura 4 Tubos de PVC utilizados no transporte de rãs-touro *Rana catesbeiana*

a - Coleta de Sangue

Foram retiradas amostras de sangue de seis animais de cada tratamento, para contagem diferencial de leucócitos (CDL), contagem de eritrócitos (Er), contagem total de leucócitos (CTL), contagem de trombócitos (CTT), determinação da taxa de hematócrito (Ht), determinação da taxa de hemoglobina (Hb) e calculo dos índices hematimétricos absolutos. Os animais eram retirados das caixas (Figura 5), anestesiados com anestésico local (Lidial[®] Pomada) (Figura 6A) e coletados cerca de 2,0 a 3,0 mL de sangue (Figura 6B) retirados por meio de punção da artéria ciática (Figura 7), utilizando-se agulhas e seringas heparinizadas (Anexo1).



Figura 5 Vista das caixas de manutenção de rãs-touro, *Rana catesbeiana*, no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca – SP

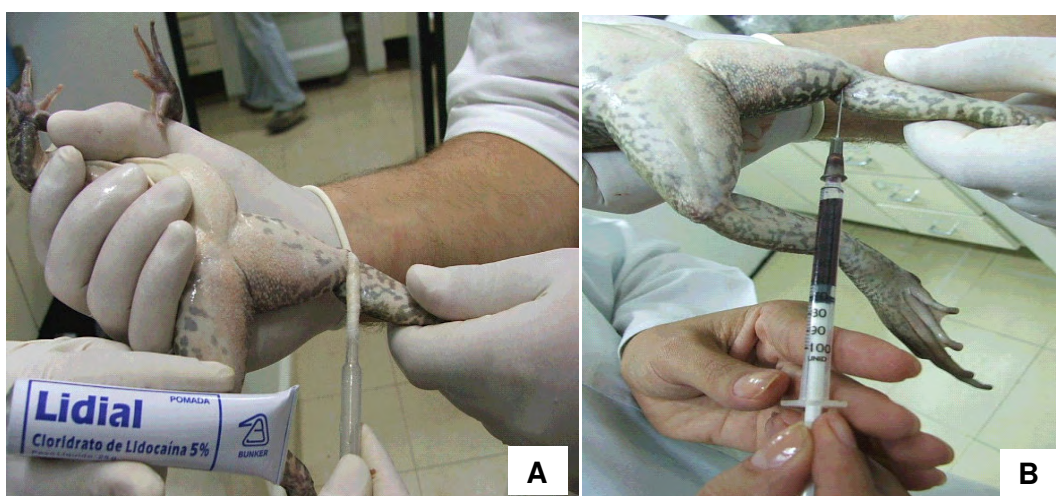


Figura 6 Exemplar de rã-touro *Rana catesbeiana* sendo anestesiado (anestesia local) (A) e retirada de sangue por punção da artéria ciática (B)

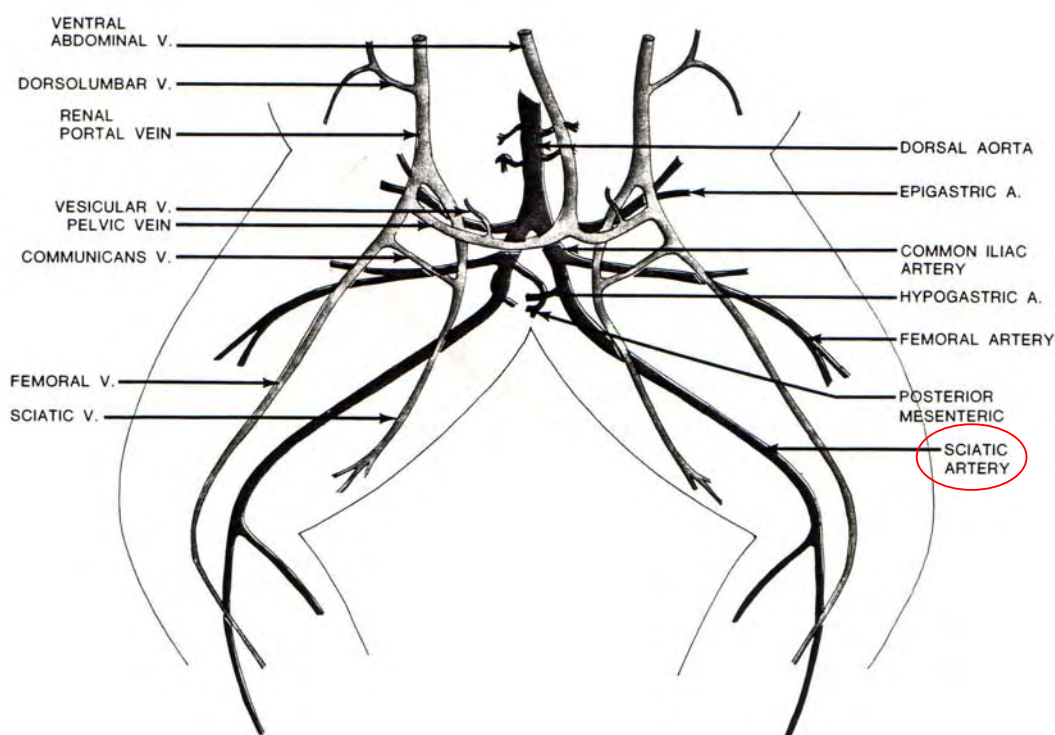


Figura 7 - Vista ventral de anuro evidenciando artérias e veias

Fonte: UNDERHILL (1980)

b – Confecção das extensões sangüíneas

Para cada animal foram feitas duas lâminas de extensões sangüíneas para posterior contagem total e diferencial de leucócitos e total de trombócitos.

Previamente, as lâminas foram lavadas com água e sabão e depois de enxaguadas com água foram colocadas em álcool/éter (1:1). Depois procedeu-se a secagem dessas lâminas com papel absorvente.

As primeiras gotas de sangue da agulha 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 8). Depois de prontas, as extensões foram coradas com o corante de ROSENFELD

(1947) (Anexo 2). A extensão foi coberta 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 para posterior contagem total e diferencial de leucócitos sob microscopia de luz comum.

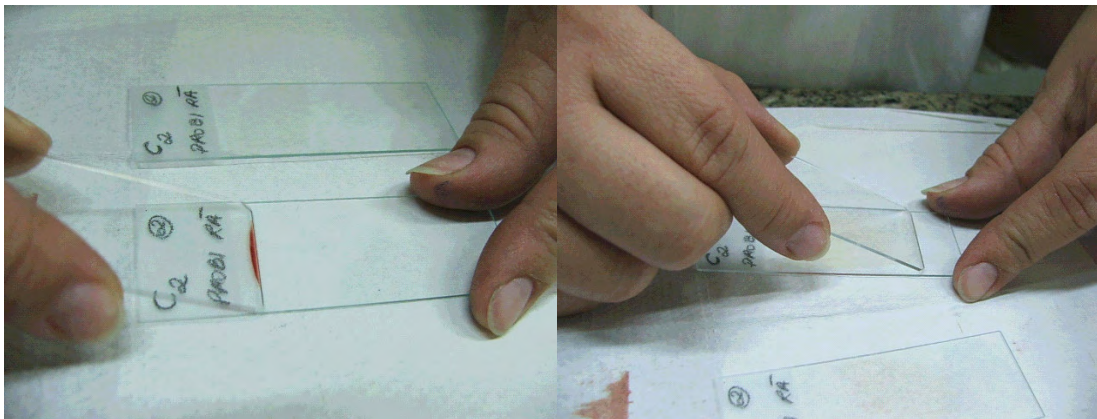


Figura 8 – Confecção das extensões sangüíneas de rã-touro, *Rana catesbeiana*

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

A contagem Total de Leucócitos (CTL) e a Contagem Total de Trombócitos (CTT) foram realizadas nas extensões sangüíneas onde foram contadas 2.000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) das quais marcaram-se a quantidade de leucócitos e trombócitos. 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, 1998).

d- Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL)

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) consiste em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) foram contados 200 leucócitos. A contagem foi feita no corpo da extensão, percorrendo-se todo o material, movimentando-se a Lâmina em “zig-zag” (Figura 9). 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.

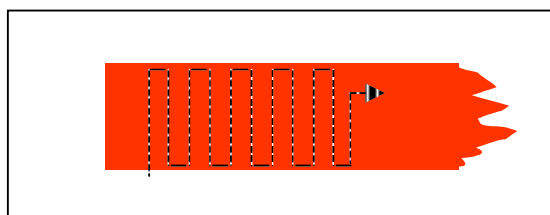


Figura 9 - Esquema do procedimento da Contagem Diferencial e Total de Leucócitos e Total de Trombócitos

e – Contagem de Eritrócitos (Er)

O método mais usado para a contagem dos eritrócitos, é o visual em câmara hematimétrica de Neubauer. Esta câmara consiste em uma lâmina retangular de vidro espesso contendo dois retículos na porção central, separado longitudinalmente por suco profundo sobre a lâmina (Figura 10 A). 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 9mm^2 de superfície, dividido em 9 áreas de 1mm^2 , exceto quatro laterais e o da área central, está dividida em 25 quadrados de $1/25\text{mm}^2$, sendo cada um destes subdividido em dezesseis quadrinhos de $1/400\text{mm}^2$ totalizando 400 quadrinhos e $0,1\text{mm}^3$ na área central (Figura 10 B e C).

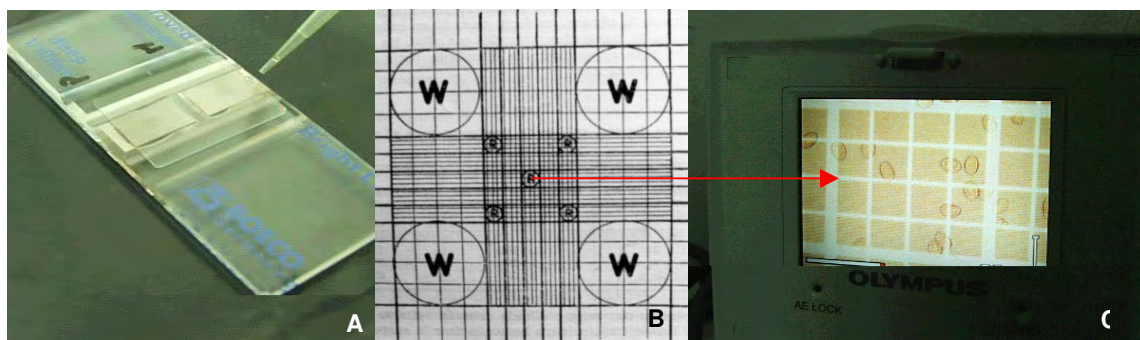


Figura 10 - Câmara de Neubauer (A), esquema do retículo (B) para a contagem de glóbulos vermelhos (R) e leucócitos (W) e detalhe do retículo central (C)

Inicialmente foram colocados $400\ \mu\text{L}$ do diluente Hayen (Anexo 3) em eppendorf. A este conteúdo foram adicionados $2\ \mu\text{L}$ 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 n° células $\times 10^4/\text{mm}^3$ de sangue.

f – Determinação do Hematócrito (Ht)

A determinação do hematócrito (Ht) foi feita através da técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971). Foram preenchidos dois tubos capilares vedados em uma das extremidades com massa de modelar e levados à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram compactados na parte inferior do tubo e mostrado o volume por eles

ocupado em relação ao sangue total. A seguir, foi feita a leitura com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem de células.

g – Determinação da Concentração de Hemoglobina (Hb)

A determinação da concentração 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 (Anexo 4) em tubo de ensaio e em seguida adicionou-se 20 µL de sangue (Figura 11). 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:

$2 - \log X \times \text{fator de correção}$, 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



Figura 11 – Tubo de ensaio com cianometahemoglobina onde foi adicionado 20µL de sangue para determinar a taxa de hemoglobina

h – 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):** que permite avaliar o volume dos eritrócitos;

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{n}^{\circ} \text{ Eritrócitos}} \times 1000 = \text{fL}$$

- **Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):** que mede a quantidade de hemoglobina existente nos eritrócitos;

$$\text{HCM} = \frac{\text{taxa de hemoglobina} \times 1000}{\text{n}^{\circ} \text{ Eritrócitos}} = \text{pg/célula}$$

- **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):** está relacionada à concentração do pigmento nos eritrócitos.

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

Para verificar diferenças entre os resultados dos parâmetros hematológicos entre os grupos tratados com os diferentes tratamentos, foi realizado a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (ZAR, 1996). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

3.5.6 Análises Imunológicas

As análises imunológicas foram realizadas no Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Adventista de São Paulo / UNASP localizado em São Paulo.

Foram utilizados 6 animais de cada tratamento, os quais receberam uma injeção na cavidade abdominal de 5 mL de solução de levedura (Anexo 5). A concentração de levedura foi de aproximadamente 11.000 células / mm³. Em testes preliminares, foi observado que a capacidade fagocítica da rã-touro foi de 2 horas de inoculação.

Os animais foram inoculados com a solução de levedura e colocados em aquários (20 x 40 x 20 cm), por 2 horas. Após o período de incubação os animais foram anestesiados (sedação profunda) com benzocaína (1:10) e eram feitas sangrias para que não ocorresse contaminação por sangue da cavidade abdominal. Após o sacrifício foi feito um corte na lateral do abdome por onde era feita a lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico específico para anfíbios (Ringer) (Anexo 6). As alíquotas de líquido aspirado da cavidade abdominal foram centrifugadas a 1.500 rpm, por 5 minutos, em tubos falcon, para evitar a aderência das células. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a solução restante ressuspendida e colocada em lâmina e lamínula e levadas ao microscópio de contraste de fase, para contagem de fagócitos. Com os resultados da contagem de fagócitos ativos e do total de leveduras no interior das células fagocíticas foram calculados a Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo metodologia descrita por SILVA *et al.* (2002) e SILVA *et al.* (2005). Os índices foram calculados conforme as fórmulas:

Capacidade Fagocítica (CF): porcentagem de um determinado tipo celular que esta fagocitando.

$$CF = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de fagócitos fagocitando}}{100 \text{ fagócitos}} = \%$$

Índice Fagocítico (IF): é o número médio de leveduras no interior das células fagocíticas onde são contadas 100 células.

$$IF = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de leveduras no interior dos fagócitos}}{\text{número de fagócitos ativos}}$$

Para verificar a diferenças entre as médias da capacidade fagocítica e do índice fagocítico entre os grupos tratados com os diferentes probióticos e o controle, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (ZAR, 1996). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO



4.1 Temperatura

Os valores médios da temperatura ambiente durante o experimento variou de $28,0^{\circ}\text{C} \pm 3,9$ a $16,0^{\circ}\text{C} \pm 3,9$ (Figura 12) não apresentando alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando dentro dos níveis de conforto térmico recomendados por FIGUEIREDO (1996) e BRAGA e LIMA (2001).

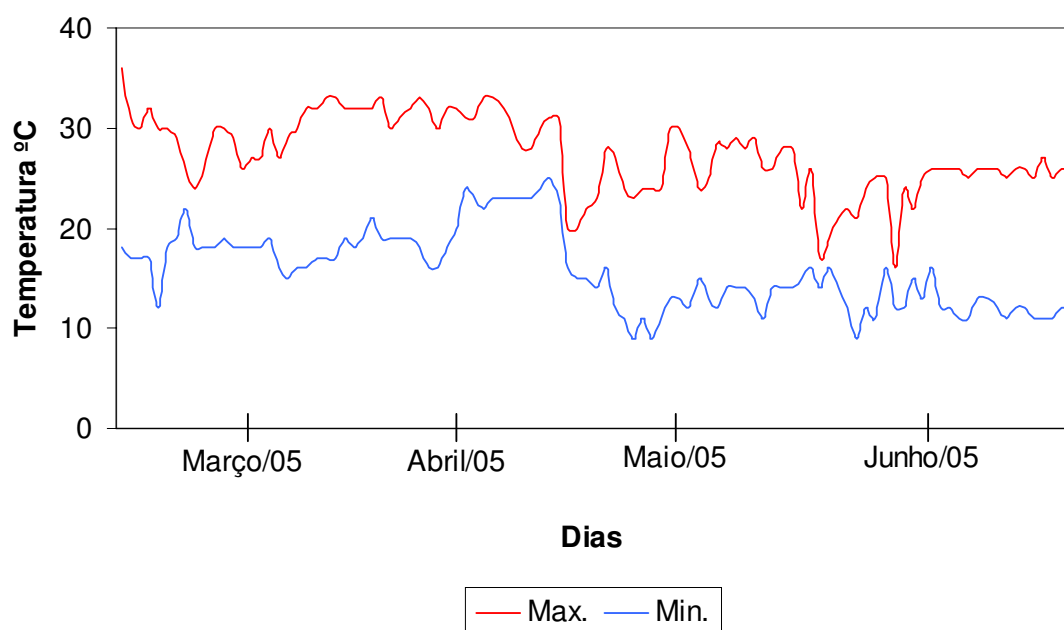


Figura 12 – Valores médios da temperatura ambiente (máxima e mínima) durante o experimento com probióticos

4.2 Desempenho Produtivo

4.2.1 Ganho de Peso

Os valores de ganho de peso obtidos durante o experimento estão apresentados na Tabela 3. Apesar do ganho de peso dos animais submetidos a diferentes tratamentos não apresentarem diferença significativa ($P>0,05$), segundo teste de comparações múltiplas HSD-Tukey, pôde-se verificar que a partir da 2ª

biometria os animais tratados com probióticos (T₂, T₃, T₄ e T₅) apresentaram peso médio superior comparado ao grupo controle (Tabela 4 e Figura 13).

Tabela 3 – Valores médios de ganho de peso (g), conversão alimentar (CA), sobrevivência (S) e taxa de crescimento específico (TCE) de rãs-touro *Rana catesbeiana* alimentadas com probióticos.

Tratamento	Ganho de Peso (g)	CA	Sobrevivência (%)	TCE
T ₁	194,46	1,41 ^a	95,00± 1,67	1,22 ± 0,11 ^{ac}
T ₂	209,20	1,32 ^a	97,78± 2,55	1,26± 0,08 ^a
T ₃	193,73	1,68 ^{ab}	97,22± 2,55	1,16± 0,13 ^b
T ₄	200,36	1,41 ^a	92,78± 4,19	1,16± 0,10 ^b
T ₅	182,97	1,84 ^b	94,44± 2,55	1,17± 0,12 ^{bc}
F para tratamentos	—	7,90*	1,59 ^{NS}	7,66*
CV (%)	4,91	7,70	2,83	9,05

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

T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

OBS. Ganho de peso – não paramétrico

NS = Não significativo

* significativo a 5%

No final do experimento não ocorreu diferença de peso das rãs-touro entre os tratamentos devido ao fato de que os animais que receberam probióticos (T₂, T₃, T₄ e T₅) atingiram peso médio de abate (200g), na 3ª biometria, enquanto os animais do grupo controle (T₁) atingiram peso médio de 137,31g (Tabela 4). Pode-se observar, que na 3ª biometria, a média de peso dos animais do T₁ estavam próximos do peso médio dos animais dos outros tratamentos (T₂, T₃, T₄ e T₅) na 2ª biometria, ou seja, os animais do grupo controle apresentaram-se defasados em 28 dias comparados aos animais que receberam os probióticos. Esta defasagem no peso na 3ª biometria apresentou diferença significativa (P<0,05), segundo teste de Newman-Keuls, quando comparados o T₁ com os grupos que receberam probióticos (T₂, T₃, T₄ e T₅).

Tabela 4 – Peso médio (g) e desvio padrão de rãs-touro, *Rana catesbeiana*, obtido durante o teste com probióticos

Tratamento	1ª Biometria	2ª Biometria	3ª Biometria	4ª Biometria
T ₁	51,98 ± 3,25	105,92 ± 2,69	137,91 ± 9,61	205,14 ± 8,85
T ₂	58,67 ± 5,46	134,68 ± 18,39	199,57 ± 15,17	219,99 ± 25,57
T ₃	62,30 ± 4,67	129,21 ± 5,19	205,90 ± 10,06	206,23 ± 15,32
T ₄	63,64 ± 5,77	136,91 ± 3,78	191,91 ± 19,09	213,41 ± 11,62
T ₅	61,92 ± 6,66	133,08 ± 16,27	195,70 ± 15,48	194,66 ± 18,50
CV (%)	5,61	6,47	8,00	4,18

T₁ = grupo controle, T₂ = probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃ = probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄ = probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

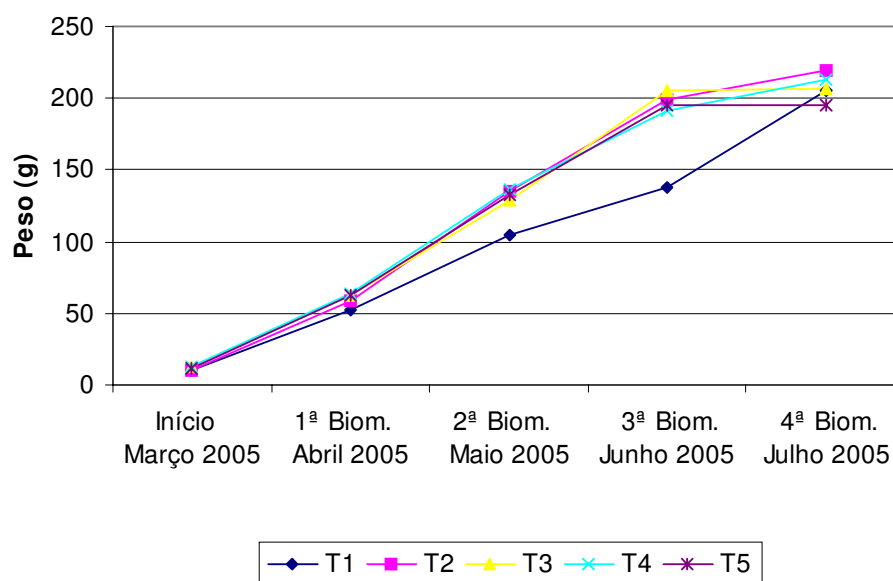


Figura 13 – Peso médio (g) das rãs-touro, *Rana catesbeiana* durante o período experimental (T₁ = Grupo controle, T₂ = probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃ = probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄ = probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração)

Segundo FONTANELLO *et al.* (1987) as rãs recém-metamorfoseadas possuem um ótimo potencial de crescimento e após esta fase inicial (>50g), há tendência do consumo de alimento aumentar e o ganho de peso diminuir. Os animais após atingirem 200g (Figura 14), convertem pouco em peso, o que fez com que os animais do T₁ apresentassem peso médio próximo dos T₂, T₃, T₄ e T₅ no final do período experimental.

BRAGA e LIMA, (2001) observaram diferentes ganhos de peso de rãs-touro, variando conforme a temperatura ambiente. Os valores de ganho de peso encontrado por estes autores foram de 32,48g na temperatura de 20 °C, 52,62g na temperatura de 25 °C e 52,54g na temperatura de 30 °C. Estes valores são bem inferiores aos encontrados no presente trabalho, cuja média dos tratamentos foi de 196,14g.

Segundo FLORES *et al.* (2002) utilizando um antibiótico considerado um promotor de crescimento convencional (Terramicina[®]) e um probiótico comercial (*Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus faecium* - 10⁸ UFC/g) em tilápias, verificaram que os animais que receberam probióticos apresentaram maior ganho de peso, enquanto que os animais tratados com antibiótico e os do grupo controle apresentaram menores valores no ganho de peso.

Em experimentos com carpa, *Cyprinus carpio*, observou-se crescimento superior nos animais tratados com probióticos, comparando-os ao grupo controle e animais tratados com antibióticos utilizados como promotores de crescimento (BOGUT *et al.* 1998).



Figura 14 – Exemplar de rã-touro, *Rana catesbeiana* ao final do período experimental

Ao comparar os resultados obtidos neste experimento com rãs (*Rana catesbeiana*) aos trabalhos citados acima com organismos aquáticos, pode-se observar uma similaridade nos resultados se for levado em consideração o período em que as rãs (*Rana catesbeiana*) atingiram o peso de abate (200g) que ocorreu na 3ª biometria (Tabela 4).

4.2.2 - Conversão Alimentar (CA)

A conversão alimentar é a relação da quantidade de alimento que as rãs consomem para obter um incremento no peso (LIMA e AGOSTINHO, 1992).

Na Tabela 3, encontram-se os valores médios de conversão alimentar observada durante o experimento. Pode-se observar que a pior conversão alimentar

(1,84:1) foi obtida no T₅, não diferindo significativamente ($P > 0,05$) do T₃ (1,68:1). Entre os demais tratamentos (T₁, T₂ e T₄) não houve diferença significativa. Para o probiótico 2 (T₄ e T₅) observa-se a conversão alimentar piorou significativamente, apresentando valores de 1,41 e 1,84:1 respectivamente para as doses de 5 e 10g.

Segundo LIMA *et al.* (1988) e FONTANELLO (1983) os valores médios de conversão alimentar para rãs, *Rana catesbeiana*, durante o período de engorda, variaram de 1,65 a 6,17 para os animais tratados com diferentes tipos de dietas. Já BARBALHO (1991), observou valores médios de conversão alimentar de 1,5 a 2:1 no campo e 1,26:1 em laboratório. Esta diferença nos valores médios de conversão alimentar, deve-se ao fato de não haver uma padronização durante a coleta das rações para o cálculo de conversão, e também que a mesma varia com o tipo de instalação utilizada, a eficiência do cocho, bem como a qualidade da ração.

BRAGA e LIMA (2001) observaram uma variação na conversão alimentar em rãs-touro de 1,40 a 1,46:1 variando conforme a temperatura ambiente, onde pôde-se observar que houve uma melhor conversão alimentar na temperatura de 25 °C. Já LIMA *et al.* (2003), observaram em rã-touro, conversão alimentar de 1,4:1. Estes valores estão próximos aos valores de conversão alimentar do presente trabalho.

Devido à escassez de literatura, não foi possível observar dados de conversão alimentar em rãs-touro tratadas com probióticos, sendo este trabalho o primeiro a ser desenvolvido.

FLORES *et al.* (2002) observaram melhor taxa de conversão alimentar em tilápias tratadas com probióticos a base de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus faecium* na concentração de 10⁸ UFC/g. A melhor taxa de conversão alimentar em peixes que foram tratados com probióticos está relacionada com a capacidade das bactérias ácido lácticas de degradar o macro nutriente em moléculas

mais simples (NAIDU *et al.* 1999). SHOLZ *et al.*, (1999) ao administrarem dietas que continham leveduras *Sacharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* e *S. cerevisiae* experimental a camarões *Penaeus vannamei* obtiveram taxas de conversão alimentar similares ao longo de todo o período experimental e na última semana de administração das dietas com probióticos obtiveram diferenças significativas, nas quais os probióticos apresentaram uma taxa de conversão alimentar melhor.

Os resultados encontrados neste experimento com *Rana catesbeiana* não coincidem com os resultados obtidos em outros organismos aquáticos, pois os probióticos não melhoraram a conversão alimentar de *Rana catesbeiana*. Provavelmente as bactérias presentes nos probióticos utilizados não tenham sido eficazes para a espécie estudada.

4.2.3 – Sobrevivência

A sobrevivência de rã-touro durante o experimento variou de 92,78 a 97,78% não apresentando diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Segundo FONTANELLO *et al.* (1987) é comum altas taxas de sobrevivência para rãs-touro com peso superior a 12g, pois estes animais já passaram pela fase crítica que seria na metamorfose.

BRAGA e LIMA (2001), observaram taxa de sobrevivência variando de 86 a 90% e LIMA *et al.*, (2003) de 88%. Estes valores são próximos aos valores encontrados no presente trabalho, com taxa de sobrevivência superior a 92,78%.

RENGPIPAT *et al.* (1998) testaram em *Penaeus monodon* (camarão black tiger) o probiótico *Bacillus* S11, por 100 dias, durante as estações de verão e inverno na Tailândia e puderam observar que no verão os camarões alimentados com

probiótico apresentaram maior desempenho em relação ao controle e no inverno apresentaram taxa de sobrevivência maior comparada ao controle.

Em experimentos com tilápias, *Oreochromis niloticus* de três semanas, FLORES *et al.* (2002) verificaram que os animais tratados com probióticos e antibióticos apresentaram maiores taxas de sobrevivência comparadas aos do grupo controle, entretanto, os peixes tratados somente com probiótico alcançaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar comparado aos demais tratamentos (controle e antibiótico).

HUYS *et al.* (2001) selecionando bactérias potencialmente benéficas para larvas de *Scophthalmus maximus* observaram sobrevivência de 35% em 11 dias de experimentação. Para essa mesma espécie de peixe, GATESOUBE (1994) verificou aumento nos valores de sobrevivência ao administrar bactérias que produzem ácido láctico cuja substância que age como um bactericida para algumas bactérias patogênicas. DOUILLT e LANGDO (1994) utilizaram levedura na alimentação da ostra, *Crassostrea gigas*, obtendo também altas taxas de sobrevivência na fase larval.

NIKOSKELAINEN *et al.* (2001) testaram em truta arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* *Lactobacillus rhamnosus* nas concentrações de 10^9 e 10^{12} UFC / g de alimento durante 51 dias e observaram que a mortalidade no grupo controle foi de 52,6% enquanto que nos grupos tratados com probióticos foi de 46,3% na dose de 10^{12} UFC/g e 18,9% na dose de 10^9 UFC/g.

4.2.4 – Taxa de Crescimento Específico (TCE)

A taxa de crescimento específico mostra a porcentagem de crescimento de uma determinada espécie durante o período experimental. Os resultados da TCE

estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que houve porcentagem maior de crescimento no T₂ (1,26), não diferindo significativamente do grupo controle (T₁;1,22). Entre os tratamentos T₃, T₄ e T₅ não houve diferença significativa. Pode-se observar também que o aumento da dose para o probiótico 1 diminuiu significativamente a TCE, apresentando valores de 1,26 e 1,16, respectivamente para T₂ e T₃.

4.3 - Análises Hematológicas

Avaliando-se os dados obtidos através da análise estatística para as diferentes características hematológicas foi observado que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos, segundo teste de Tukey (Tabela 5 e Figura 15 e 16).

Pode-se notar que em todos os parâmetros analisados não houve diferença significativa entre os tratamentos. Estes resultados encontram-se próximos dos valores encontrados por COPPO (2003), que analisou os parâmetros sangüíneos de *Rana catesbeiana* criadas em cativeiro na região nordeste da Argentina, com média de peso variando entre 200 a 350 g, e obteve valores de hematócrito de 30,1%, hemoglobina 6,80g/dL, número de eritrócitos $42 \times 10^4/\text{mm}^3$, VCM de 709 fL, HCM de 157 pg/cel e CHCM de 23,3%.

Tabela 5 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses

	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$\bar{X} \pm \text{EPM}$
T₁	30,17 ± 1,92	9,73 ± 0,34	47,67 ± 8,96	71359 ± 9,46	234,77 ± 0,33	32,72 ± 1,72
T₂	28,92 ± 2,13	9,64 ± 0,72	38,92 ± 5,80	803,92 ± 9,44	265,33 ± 0,30	33,42 ± 1,48
T₃	27,25 ± 2,05	8,93 ± 0,78	38,50 ± 3,95	728,75 ± 5,94	237,33 ± 0,19	32,63 ± 0,85
T₄	28,75 ± 1,02	9,28 ± 0,37	31,67 ± 2,36	947,62 ± 11,07	307,06 ± 0,40	32,35 ± 0,97
T₅	29,17 ± 2,49	9,90 ± 0,86	33,08 ± 3,12	896,59 ± 6,71	302,54 ± 0,19	33,96 ± 0,91
F Trat.	0,28 ^{NS}	0,35 ^{NS}	1,37 ^{NS}	1,38 ^{NS}	1,39 ^{NS}	0,28 ^{NS}
CV (%)	3,64	4,10	16,60	12,53	12,81	2,00

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 (%); T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração
NS = Não significativo

A variação da concentração de hemoglobina está relacionada a fatores, como a atividade do animal, altitude, temperatura da região e sazonalidade (HARRIS, 1972). Este mesmo autor observou uma variação da taxa de hemoglobina em *Rana pipiens* (rã leopardo) de 7,30 – 17,27 g/100mL, valores estes próximos do presente trabalho.

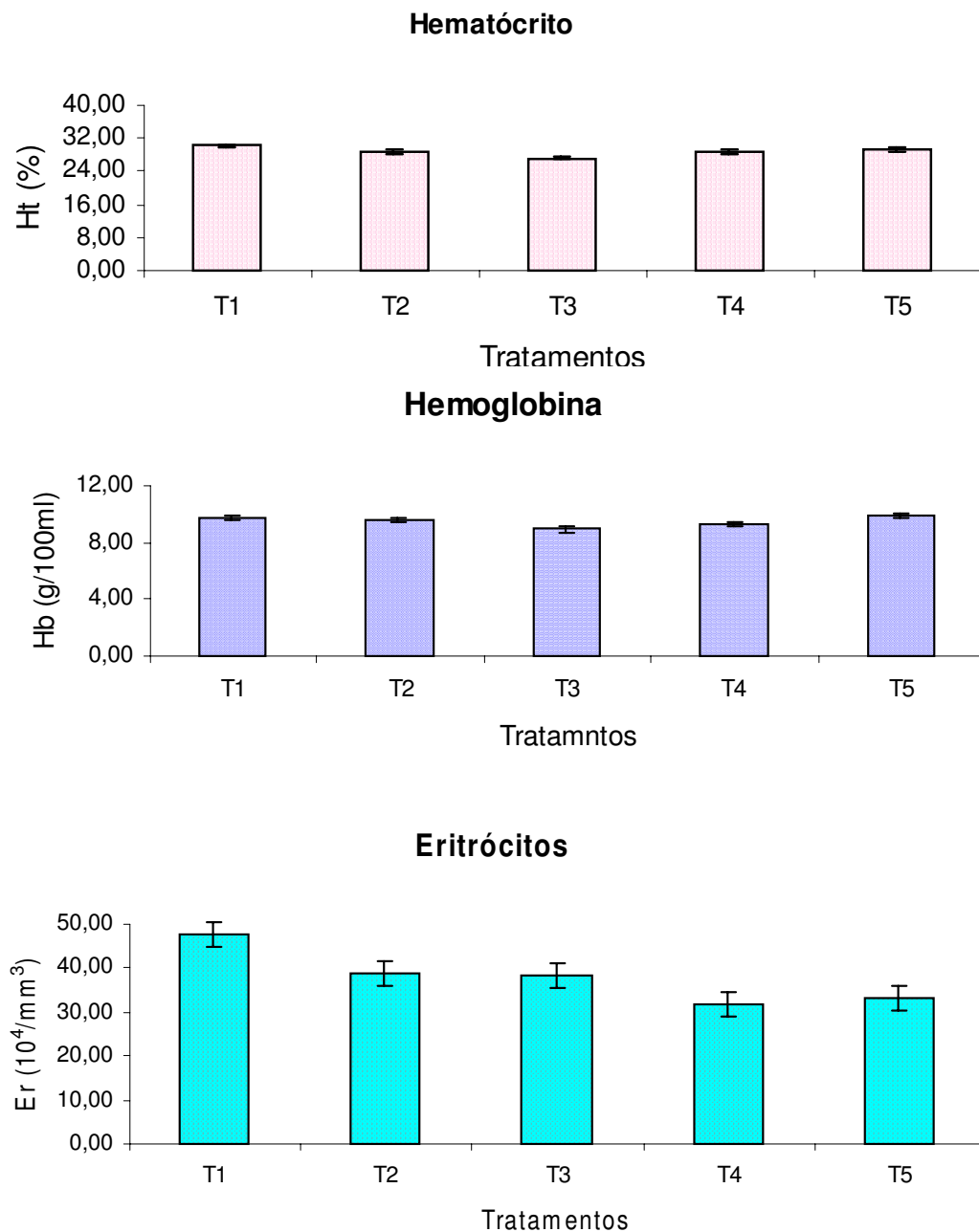


Figura 15 - Valores médios de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (Er) de rã-touro, *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses (T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração)

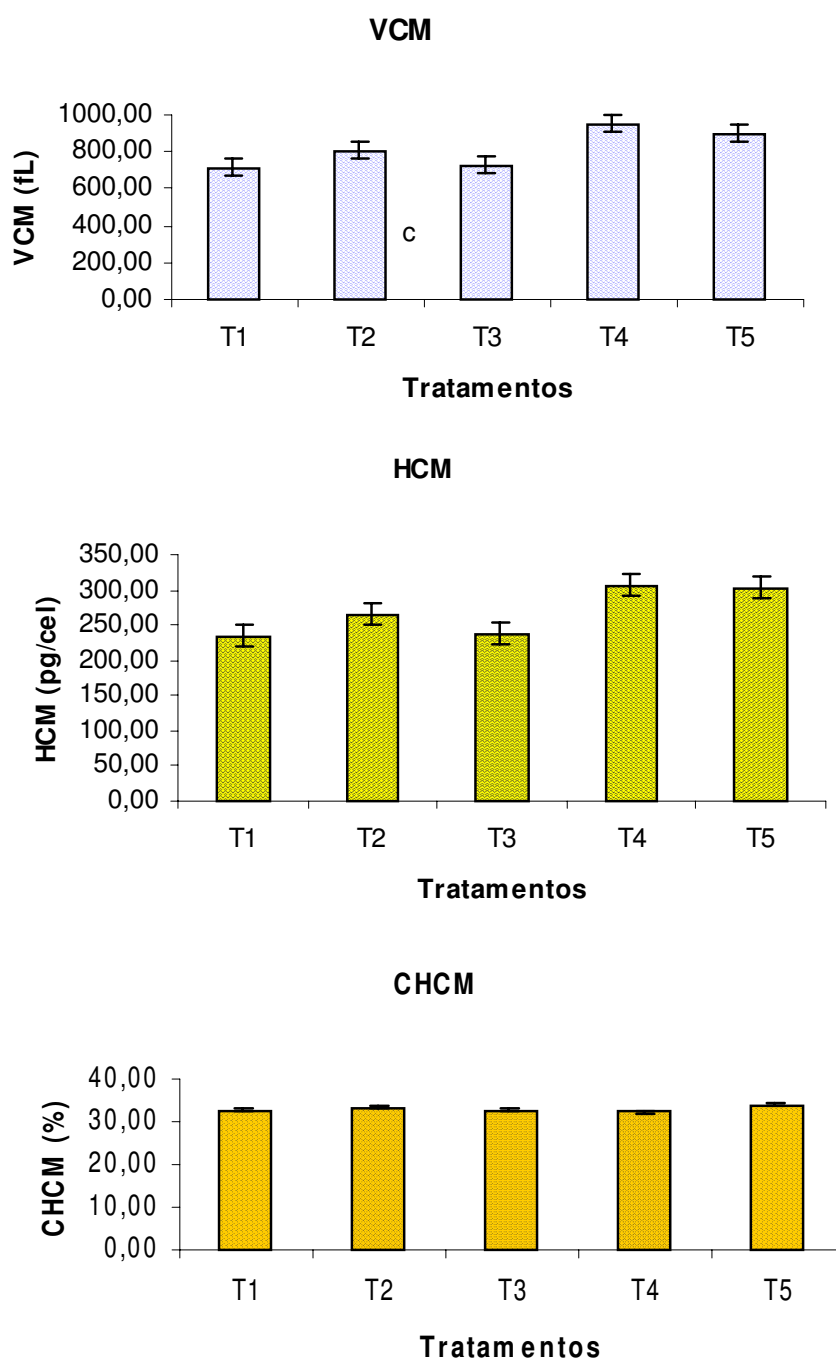


Figura 16 - Valores médios de VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular médio) de rã-touro, *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses (T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração)

Os valores médios de trombócitos para *Rana catesbeiana* durante o experimento encontram-se na Tabela 6 e Figura 17.

Tabela 6 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) do número absoluto de trombócitos de rã-touro, *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses

Tratamentos	Trombócitos Média $\pm$ EPM
T ₁	9.654,46 $\pm$ 3.740
T ₂	19.852,16 $\pm$ 12.444,14
T ₃	6.289,74 $\pm$ 2.096,78
T ₄	8.609,15 $\pm$ 1.374,55
T ₅	3.655,03 $\pm$ 1.212,98
F para tratamento	1,08 ^{NS}
CV (%)	57,43

T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração
NS = Não significativo

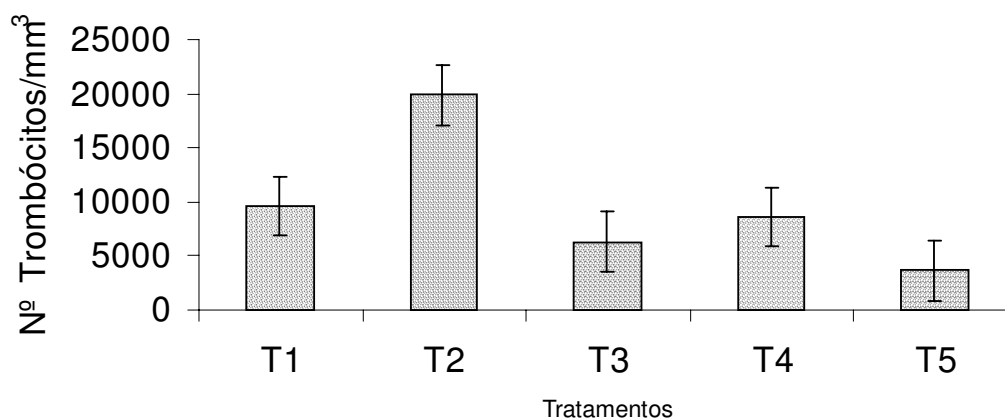


Figura 17 - Valores médios dos valores absolutos de trombócitos de rã-touro *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses (T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração)

Pode-se observar ligeiro aumento no número de trombócitos nos animais do Tratamento 2 (T_2) mas estatisticamente não apresentaram diferença significativa ($P=0,38$). A função dos trombócitos em sangue de anfíbios é ainda pouco conhecida, uma vez que nesses animais é uma célula que talvez participe do processo de defesa do organismo, como ocorre em peixes, segundo MATUSHIMA e MARIANO (1996). Entretanto, em mamíferos, o aumento de plaquetas pode ser verificado em certos processos fisiológicos associado a hemorragias (JANINI e JANINI FILHO, 1990), mas no caso dos anfíbios, não há informações a respeito dessas células.

Os tipos celulares encontrados no sangue periférico de *Rana catesbeiana* encontram-se na Figura 18. Os tipos leucocitários foram aqueles descritos pela literatura, ou seja: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos (TURNER, 1988). Na Tabela 7 e Figura 19 estão apresentados os valores médios da contagem diferencial de leucócitos (CDL) de *Rana catesbeiana*.

Tabela 7 – Valores médios da porcentagem e erro padrão da média (EPM) de leucócitos de rã-touro, *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses

Tratamento	Lf % $\pm$ EPM	Nt % $\pm$ EPM	Bs % $\pm$ EPM	Es % $\pm$ EPM	Mn % $\pm$ EPM
T₁	66,91 $\pm$ 3,21	16,83 $\pm$ 2,27	14,14 $\pm$ 2,70	1,09 $\pm$ 0,37	1,03 $\pm$ 0,44
T₂	62,47 $\pm$ 3,69	23,09 $\pm$ 3,27	11,87 $\pm$ 0,95	1,21 $\pm$ 0,31	1,37 $\pm$ 0,41
T₃	59,38 $\pm$ 2,27	22,18 $\pm$ 1,94	16,20 $\pm$ 1,91	1,68 $\pm$ 0,50	1,17 $\pm$ 0,60
T₄	57,14 $\pm$ 7,23	26,76 $\pm$ 6,53	13,94 $\pm$ 2,42	1,76 $\pm$ 0,47	0,83 $\pm$ 0,31
T₅	54,38 $\pm$ 6,49	31,81 $\pm$ 7,21	12,12 $\pm$ 2,53	1,13 $\pm$ 0,24	1,17 $\pm$ 0,65
F trat.	1,28 ^{NS}	1,21 ^{NS}	0,60 ^{NS}	0,66 ^{NS}	1,45 ^{NS}
CV (%)	8,07	23,08	12,86	23,29	51,49

Lc = leucócitos / Lf = linfócitos / Nt = neutrófilos / Bs = basófilos / Es = eosinófilos / Mn = monócitos

T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

NS = Não significativo

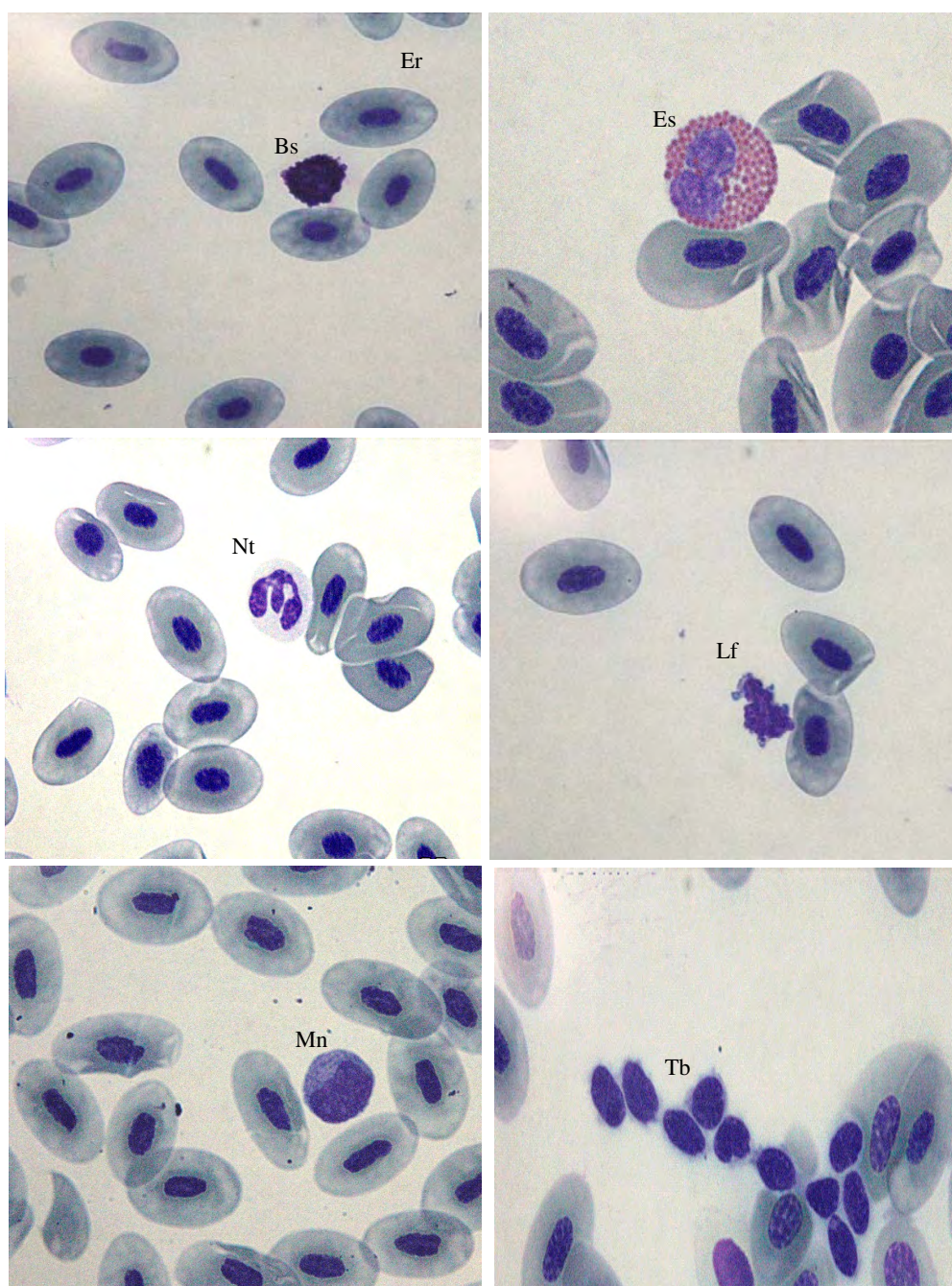


Figura 18 - Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de rã-touro *Rana catesbeiana* alimentadas com probióticos; Er = eritrócito, Bs = basófilos, Es = eosinófilos, Nt = neutrófilos, Lf = linfócitos, Mn = monócitos e Tb = trombócito. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X

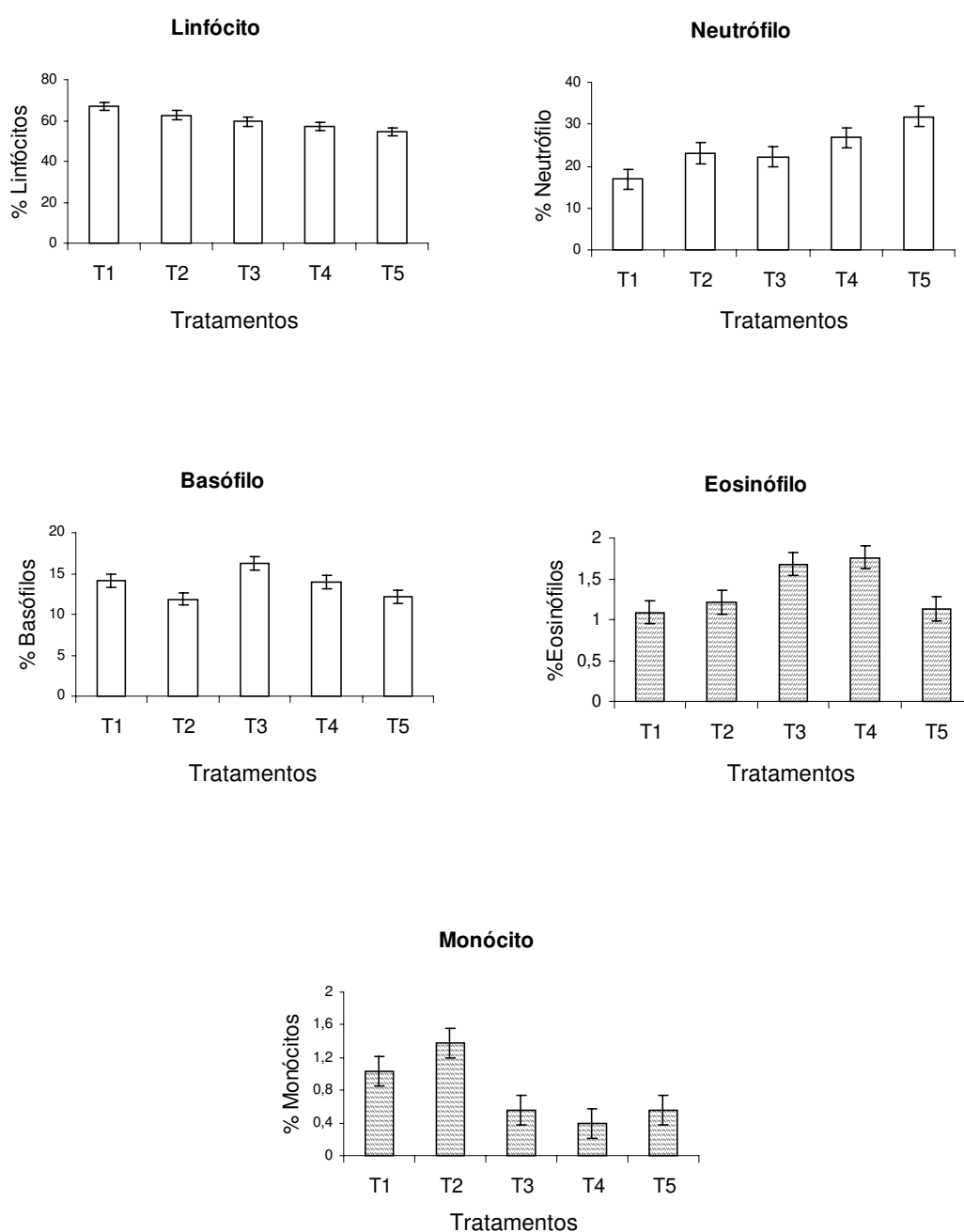


Figura 19 - Valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de rã-touro *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

Os valores médios da porcentagem de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos do sangue periférico de rãs-touro *Rana catesbeiana* não receberam influência ($P>0,05$) pelos diferentes probióticos e doses. A média de linfócitos no sangue de rãs-touro variou de 54,38 à 66,91% (Tabela 7). Os resultados obtidos assemelham-se aos de WANG e CHANG (1994) que obtiveram para a mesma espécie criadas em cativeiro média de 52,77% de linfócitos. Entretanto, os resultados encontrados indicam que a porcentagem de linfócitos diferiram de FIORANELLI *et al.* (2003) que encontraram 26,8% e COPPO (2003) entre 16,3 à 39,8% para a mesma espécie.

A porcentagem de neutrófilos no sangue dos animais, nos diferentes tratamentos variou de 16,83 à 31,81% (Tabela 7). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por WANG e CHANG (1994) que observaram uma porcentagem de 29,87 de neutrófilos. Entretanto, COPPO (2003) e FIORANELLI *et al.* (2003) observaram uma variação de 40,0 à 86,1% e 60,9% de neutrófilos respectivamente, mostrando valores mais elevados quando comparados ao presente trabalho. FENERICK Jr. (2004) observou uma variação na porcentagem de neutrófilos de 11,62 a 13,13%.

A porcentagem de basófilos do sangue de rãs-touro variou de 11,87 à 16,20% (Tabela 7). Estes resultados foram superiores aqueles encontrados por WANG e CHANG (1994) que observaram uma porcentagem de 2,66%, de FIORANELLI *et al.* (2003) de 3,5% e de COPPO (2003) que observou valores percentuais de basófilos de 3,5%. FENERICK Jr. (2004) observou valores de 14,29 a 16%, semelhantes ao do presente trabalho.

Os eosinófilos apresentaram uma variação de 1,09 à 1,76 % (Tabela 7). Estes valores foram inferiores aos encontrados por WANG e CHANG (1994) de 4,03%, de

FIORANELLI *et al.* (2003) e COPPO (2003) valores próximos de 5,8%. Já FENERICK Jr. (2004) obteve valores próximos a este trabalho, variando de 1,16 a 1,85%.

WANG e CHANG (1994) obtiveram 10,67% de monócitos e COPPO (2003) e FIORANELLI *et al.* (2003) valores percentuais de 2,9%, valores estes superiores aos do presente trabalho que apresentou uma variação de 0,83 à 1,37% (Tabela 7). Pode-se observar, que houve um leve aumento na porcentagem de monócitos nos animais do T₂ e uma diminuição dos mesmos nos demais tratamentos (Figura 19). Esta diferença não foi significativa segundo teste de Tukey. Através destes resultados pode-se observar que a adição de probióticos na dieta dos animais não influenciou a porcentagem de leucócitos.

Os valores absolutos dos leucócitos presentes no sangue periférico de *Rana catesbeiana* encontram-se na Tabela 8 e na Figura 20. Estes valores não diferiram significativamente entre os tratamentos.

HARRIS (1972) estudando as características hematológicas em rã-leopardo (*Rana pipiens*), em diferentes sazonalidades, observou variação dos valores de leucócitos em determinadas épocas do ano, variando de 4000 – 10.200 / mm³ para machos e 3950 – 16000 mm³ para fêmeas. Segundo o autor, a variação do número absoluto de leucócitos em anfíbios são atribuídos a três fatores: estado nutricional, doenças e variação sazonal. Como se pode observar, os resultados obtidos neste estudo estão próximos dos valores encontrados por HARRIS (1972). Segundo este mesmo autor, a variação nos parâmetros hematológicos em anfíbios está relacionado com o sexo, idade, temperatura e altitude.

Tabela 8 – Valores absolutos médios de cada leucócito e erro padrão da média (EPM) do sangue periférico de rã-touro *Rana catesbeiana* tratadas com diferentes probióticos e doses

	Lc Totais Média ± EPM	Lf Média ± EPM	Nt Média ± EPM	Bs Média ± EPM	Es Média ± EPM	Mn Média ± EPM
T₁	11.222,99 ± 4.063,78	7.238,41 ± 2.366,31	1.818,77 ± 701,42	2.089,56 ^a ± 1.061,08	127,76 ± 64,04	193,94 ± 128,39
T₂	9.470,97 ± 3.264,33	5.651,73 ± 1.803,52	2.440,83 ± 1.019,31	1.081,92 ^b ± 354,79	146,03 ± 90,28	150,46 ± 89,35
T₃	8.026,97 ± 1.195,08	4.738,49 ± 701,56	1.843,72 ± 384,82	1.258,66 ^b ± 215,32	134,95 ± 36,74	51,15 ± 30,15
T₄	8.483,10 ± 2.214,42	5.386,57 ± 1.790,22	1.822,57 ± 421,76	1.109,19 ^b ± 315,08	135,48 ± 30,55	29,30 ± 10,79
T₅	8.417,91 ± 1.580,11	4.998,72 ± 1.345,70	2.242,75 ± 369,20	1.034,41 ^b ± 332,40	84,99 ± 21,94	57,05 ± 35,61
F trat.	0,23 ^{NS}	0,33 ^{NS}	0,21 ^{NS}	6,26 ^{**}	0,19 ^{NS}	0,96 ^{NS}
CV (%)	12,63	15,63	12,75	30,01	16,88	66,49

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 0,1% de probabilidade; Lc = leucócitos totais/mm³; Lf = linfócitos/mm³; Mn = monócitos/mm³; Nt = neutrófilos/mm³; Bs = basófilos/mm³; Es = eosinófilos/mm³; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

NS = Não significativo

** = Significativo a 0,1%

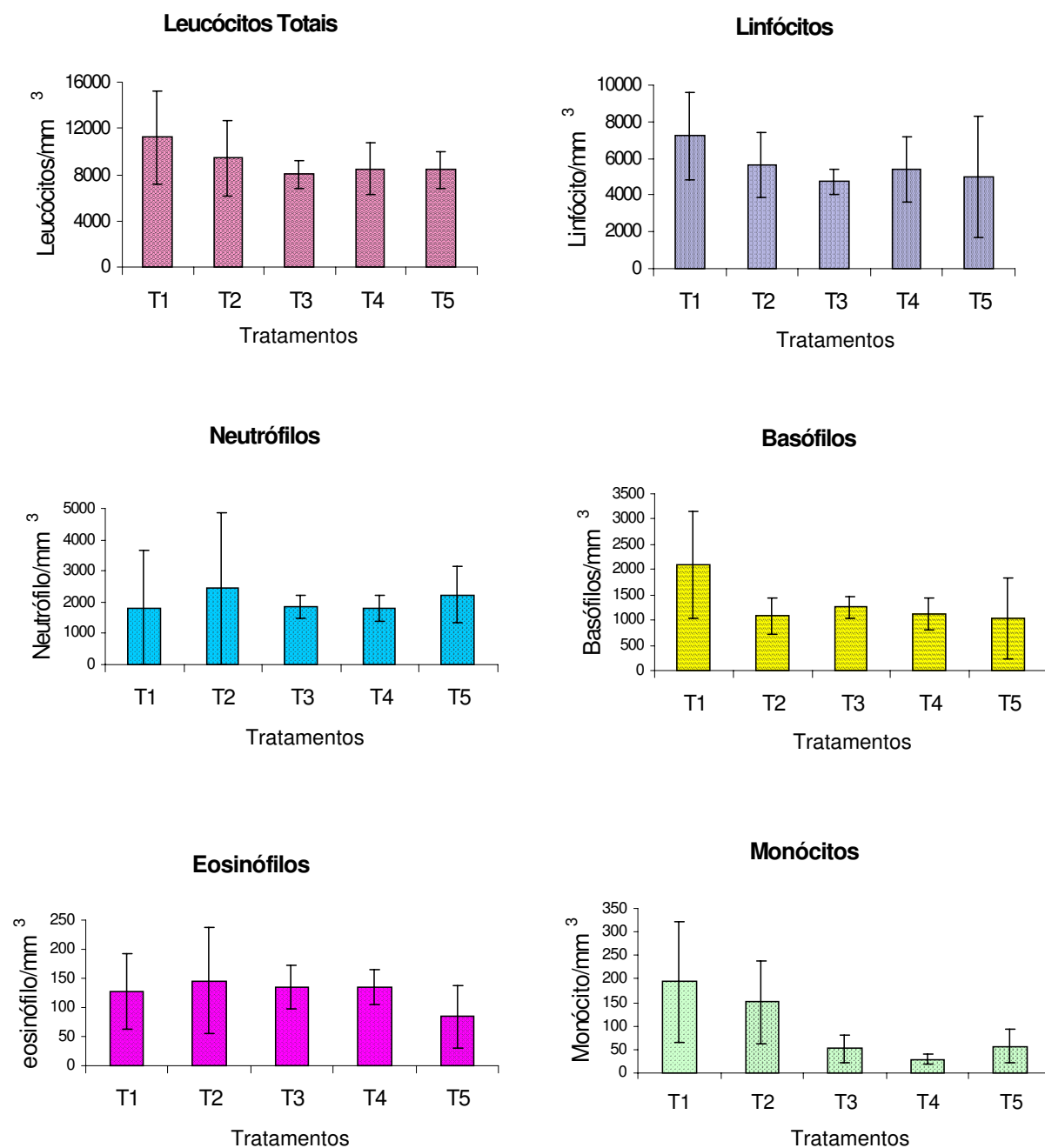


Figura 20 – Valores médios do número de leucócitos de rã-touro *Rana catesbeiana*, tratadas com os diferentes probióticos e doses; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

4.4 - Análises Imunológicas

Os resultados encontrados em relação à resposta imune de rãs-touro, *Rana catesbeiana*, estão apresentadas na Tabela 9 e nas Figuras 21 e 22.

Tabela 9 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) da capacidade fagocítica (%) e Índice Fagocítico de rã-touro *Rana catesbeiana* tratadas com os diferentes probióticos e doses

Tratamentos	Capacidade Fagocítica	Índice Fagocítico
	Média ± EPM	Média ± EPM
T ₁	48,2 ± 4,19 ^c	3,93 ± 0,33
T ₂	66,8 ± 4,81 ^b	3,65 ± 0,26
T ₃	93,60 ± 1,36 ^a	3,39 ± 0,09
T ₄	85,60 ± 4,65 ^a	3,73 ± 0,12
T ₅	77,33 ± 4,38 ^{ab}	3,79 ± 0,10
F para Tratamento	18,31 ^{**}	1,00 ^{NS}
CV (%)	23,76	5,42

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 0,5% de probabilidade; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

** Significativo a 1%

NS = Não significativo

Pode-se observar que a capacidade fagocítica das rãs-touro foi significativamente influenciada ($P=0,0001$) pela adição de probióticos (Tabela 9). Os animais do grupo controle (T₁) apresentaram a pior capacidade fagocítica (48,2%) quando comparados aos animais que receberam probiótico. Com relação ao probiótico 1 (T₂ e T₃), quando os animais receberam a dose mais alta (T₃) a capacidade fagocítica dos animais aumentou significativamente quando comparado com o T₂. Para o probiótico 2 (T₄ e T₅), a dose não interferiu significativamente nos resultados. Portanto, os probióticos utilizados neste experimento, demonstraram ser um potente imunoestimulador da atividade fagocítica, aumentando a ativação e fagocitose dos macrófagos.

O índice fagocítico não foi influenciado significativamente ($P=0,43$) pelos probióticos e doses (Tabela 9) variando de 3,39 a 3,93 nos diferentes tratamentos.

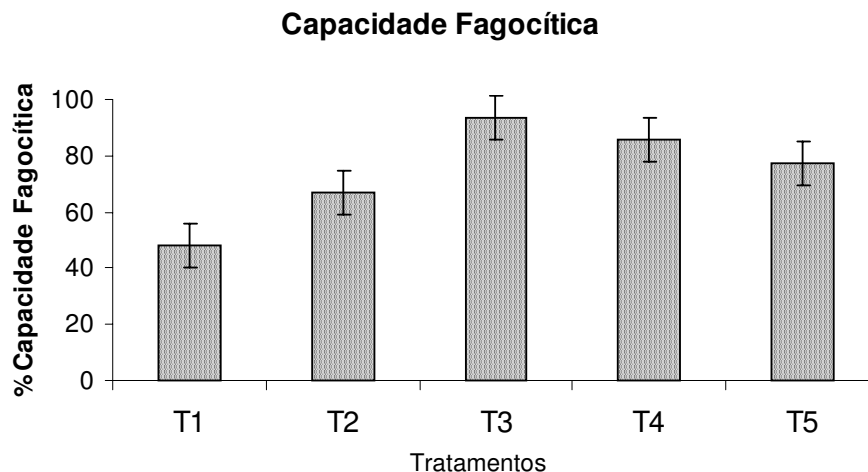


Figura 21 – Valores percentuais da capacidade fagocítica de rã-touro *Rana catesbeiana*, tratadas com os diferentes probióticos e doses; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

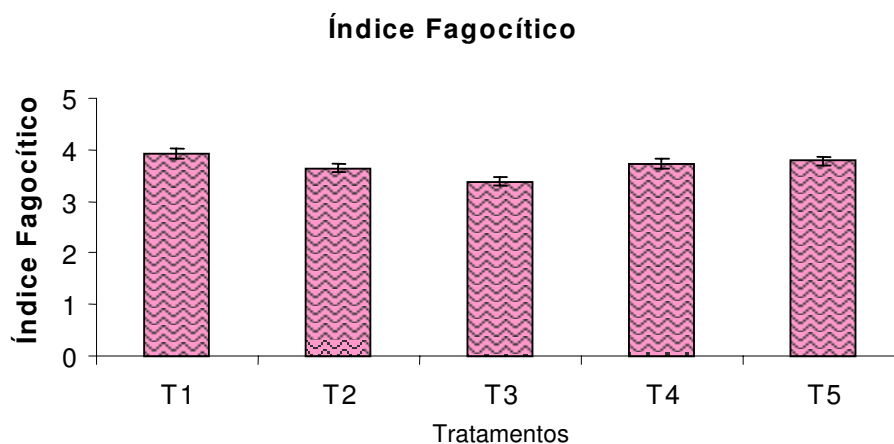


Figura 22 – Valores do índice fagocítico de rã-touro *Rana catesbeiana*, tratadas com os diferentes probióticos e doses; T₁= grupo controle, T₂= probiótico 1 dose de 5g/Kg ração, T₃= probiótico 1 dose de 10g/Kg ração, T₄= probiótico 2 dose de 5g/Kg ração, T₅ = probiótico 2 dose de 10g/Kg ração

Durante as contagens de fagócitos foi possível visualizar células fagocíticas de *Rana catesbeiana* que apresentavam leveduras em seu interior, como mostra a Figura 23. Através desta visualização foi possível contar quantos fagócitos estavam ativos (leveduras em seu interior) e quanto cada fagócito havia fagocitado (quantidades de leveduras presentes no interior de cada célula).

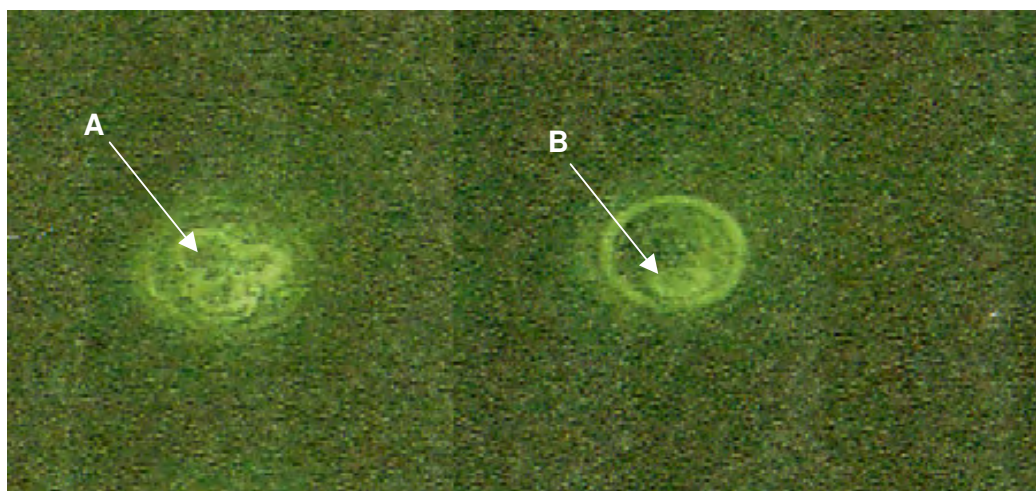


Figura 23- Fotomicrografia de lavado abdominal de rã-touro *Rana catesbeiana* evidenciando células fagocíticas com leveduras em seu interior (A – três leveduras e B – 1 levedura). Microscópio de contraste de fases. Aumento 400X

PENHA *et al.* (1996) observaram a interferência da temperatura ambiental na atividade fagocítica de trombócitos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), e concluíram que quanto maior a temperatura do ar maior é a capacidade fagocítica do animal. No presente trabalho, não houve interferência da temperatura do ar na atividade fagocítica pois, os animais foram mantidos em laboratório em temperatura ambiente de 23º C.

5 - CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

os probióticos produziram efeito no ganho de peso de *Rana catesbeiana* até atingirem 200g, independente dos tipos e doses, diminuindo o tempo de produtividade em 28 dias e influenciaram a sua conversão alimentar;

a utilização destes probióticos não alterou significativamente as células sangüíneas e apresentaram efeito imunomodulador.

As evidências acumuladas sobre os benefícios dos probióticos em rãs-touro, *Rana catesbeiana*, justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de melhorar sua utilização na aquicultura.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, F.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUINTANA, J. L.; BASSO, A.; AMBROSIM, J. A. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.50, n.5, p.505-511, 1998.
- BARBALHO, O. J. M. **Exigência de proteína bruta de rã-touro na fase de terminação** 1991. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística** São Paulo: EPU, 1981. 185p.
- BOGUT, I.; MILAKOVIC, Z.; BRKIC, S.; ZIMMER, R. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*) **Czech. J. Anm. Sci.**, Londres, v.43, p.231-235, 1998.
- BOOMKER, J. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south Africa freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, Pretoria, v.48, n.4, p. 185-193, 1981.
- BRAGA, L. G. T. **Valor nutritivo de alguns alimentos determinados com rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) na fase de recria.** 1997. 28f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BRAGA, L. G. T.; LIMA, S.L. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na Fase de Recria **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1659-1663, 2001.
- BRAGA, L. G. T.; LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. Desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) submetida a diferentes temperaturas em baias teste do sistema anfigranja. In: INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY 1; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8; 1995, Viçosa, MG. **Anais...**Viçosa, 1995, p. 87.
- CANNON, M. S.; SAMPSOM, H. W.; KAPES, E. D. The blood leukocytes of *Bufo marinus*: a lighth, phase contrast and histochemical study. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.65, n. 2, p.1445-1453, 1987.
- CASILLAS, E.; SMITH, L.S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish Biol.**, London, v. 10, n. 5, p. 481-491, 1977.
- CASTRO, J. C. Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. **Bol. Tec. Inst. Pesca**, São Paulo, v.34, p.12-18, 2003.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotics strains for human applications **Int. Dairy J. Amsterdam**, Amsterdam, v. 8, p.487-490, 1998.

- COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Assoc. J.**, Ottawa, v. 50, n. p. 550-552, 1944.
- COPPO, J. A. El médio interno de la “rana toro” (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). Revisión bibliográfica. **Rev. Vet.**, Corrientes, v. 14, n. 1, p.25-41, 2003.
- COPPOLA, M .M.; GIL-TURNES, C. Efeito de probiótico na resposta imune **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.
- COPPOLA, M.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food Agric. Immunol.**, Abindon, v.16, n. 1, p. 213-219, 2005.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Immunol. Medic. Microbiol.**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p.245-253, 2002.
- CULLEY JR, D. D. ; GRAVOIS JR, C. T. Recent development in frog culture In: Anuual Conference southern Association to Game and Fish Cimissioners, 1971, Charleston. Proceidings... Charleston: Southern Association to Game and Fish Comissioners, 1971. p. 583-596.
- CULLEY JR., D. D.; HORSEMAN, N. D., AMBORSKI, R. L. Current status of amphibian culture with emphasis on nutrition, diseases and reproduction of the bulfrog, *Rana catesbeiana*. In: ANNUAL MEETING OF THE WORLD MARICULTURE SOCIETY, 9; 1978, Atlanta. **Proceeding**...Baton Rouge: Los Angeles, Word Mariculture Society, 1978. p. 653-659.
- DIAS, J. L. C. **Influencia da temperatura ambiente sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802).** 1992.117f. Tese (Doutorado em veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP.
- DIAS, J.L.C.; SENHORINI, I.L. Qualitative evaluation of the inflammatory response modulated by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. **Cienc. Cult.**, Campinas, v. 43, p.304-306, 1991.
- DOGGETT, T.A.; WRATHMELL, A.B.; HARRIS, J.E. A cytochemical and light microscopial study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. **J. Fish Biol.**, London, v.31, n.2, p. 147-153. 1987.
- DOUILLET, P. A.; LANGDON, J., Use of a probiotic for culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 119, p. 25-40, 1994.
- DUELLMAN, W.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1986. 613p.
- DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Selfish Immunol.**, Groton, v. 13, n. 3, p. 1-16, 2002.

ELLIS, A. E. The leukocytes of fish of fish: Review. . **J. Fish Biol.**, London, n.11, p. 453-491, 1997.

FENERICK Jr., J. **Efeito de diferentes níveis de rações comerciais sobre o desempenho e parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana***. 2004, 59f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas**. São Paulo, 2002. 117p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

FIGUEIREDO, M. R. C. **Influência dos fatores ambientais sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em gaiolas**. Viçosa 1996 151p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG.

FINN, J.P.; NIELSON, N.O. The inflammatory response of rainbow trout. **J. Fish Biol.**, London, n. 3, p. 463-478, 1971.

FIORANELLI, S. A.; COPPO, N. B.; COPPO, J. A. Los glóbulos blanco de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae) Variación según sexo edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste. 2003 Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.pdf> . Acesso em 20/03/2006.

FLORES, M. L; BRIONES, L. E.; NOVOA, M. A. O. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R., SALAZAR, M. T., CORTÉS, M. G. G. e SIMOES, N. **Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola**, Cancún, Quintana Roo, México, 314-335, 2002.

FONTANELLO, D. Manejo alimentar da rã. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 2, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 1983. p. 91-100.

FONTANELLO, D. Histórico da ranicultura no Brasil In: LIMA, S. L., FIGUEIREDO, M. R. C. e MOURA, O. M. Diagnóstico da Ranicultura: problemas, propostas de soluções e pesquisas prioritárias, 1994, Viçosa, Editora Folha de Viçosa 170p.

FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI JR., J.; PENTEADO, L. A.; RODRIGUES, A. L.; JUSTO, C. L.; CAMPOS, B. E. S. Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva **Rev. Fac. Méd. Vet. Zootec.**, São Paulo, v.24, n.2, p. 213-216, 1987.

FONTANELLO, D.; WIRS, R. R., PENTEADO, L. A.; CAMPOS, B. E. S.; MANDELLI JR., J.; SOARES, H. A. Ganho de peso de rãs-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW) criadas em gaiolas individuais de diferentes tamanhos. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 15, n.1, p. 45-49, 1988.

FRANQUEIRA, J. M. Comportamento de *Rana catesbeiana* Shaw alimentadas com rações na forma peletizada e farelada, considerando conversão alimentar como

- parâmetro avaliado. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 7; 1992, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, 1992 p. 254.
- FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **Br. Poult. Sci.**, Abingdonv. 18, p. 85-94, 1977.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals: A review. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, 66, p. 365-378, 1989.
- FULOP, G.M.I.; McMILLAN, D.B. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. **J. Morphol.**, New York, v. 179, p. 175-195, 1984.
- GARDNER, R.G.; YEVICH, P.P. Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. **J. Fish Res.**, Bangladesh, v. 26, p. 433-447, 1969.
- GATESOUBE, F. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. **Aquat. Living Resour.**, Amsterdam, v. 7, p. 277-282, 1994.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **Am. J. Clin. Pathol.**, Hagerstawn, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.
- GUZMÁN, G. A. Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R.; ALFARO, R. M. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey, Noevo León, México, 332-337, 1992.
- HARRIS, J. A. Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 43, n. A, p.975-989, 1972.
- HASHIMOTO, S. Cytotoxic factor production by Kupfer cells elicited with *Lactobacillus casei* and *Corynebacterium parvum*. **Cancer Immunol. Immunother.** Heidelberg, v. 20, n. 2, p.117-121, 1985.
- HOFFMANN, D.F.; LEBOUTE, E.M.; SOUZA, S. M. G. Efeito da temperatura no ganho de peso de girinos de rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE AQUICULTURA, 6, e SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5; 1988, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, 1988. p.799-803.
- HORI, T.; KIYOSHIMA, J.; SHIDA, K.; YASUI, H. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on Influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. **Clinic. Diag. Lab. Immun.**, New York, v. 8, n. 3, p.593-597, 2001.
- HORI, T.; KIYOSHIMA, J.; SHIDA, K.; YASUI, H. Augmentation of cellular immunity and reduction of Influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clinic. Diag. Lab. Immun.**, New York, v. 9, n. 1, p.105-108, 2002.
- HRUEB, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 5^a ed., 1998, 1120-1125 p.

- HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; OLLEVIER, F.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 193, p. 25-37, 2001.
- INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 65, p. 1217-1219, 1986.
- JANINI, P.; JANINI FILHO., P. **Interpretação clínica do Hemograma**. 10^a ed., São Paulo: Sarvier, 1990, 625 p.
- JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Pheritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 16, p.313-325, 1993.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2004, 433p.
- KALASHNIKOVA, E. T. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **J. Ichthyol**, Bethesda, v. 3, n. 16, p.459-472, 1976.
- KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 27, n. 7, p. 611-618, 1983.
- KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Argumentation of mouse *natural killer* cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 28n. 2, p.209-217, 1984.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 41, p. 103-125, 1998.
- KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; MULLER, K. E.; NIZAM, A. **Applied regression analysis and other multivariable methods**. Belmont, Duxbury Press, 1998, 123p.
- KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Vet. Sci. Tech. off Int. Epiz.**, v. 8, v. 2, p.517-531, 1989.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999, 211p.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C. A. **A Criação de Rãs**. 2ed. São Paulo: Globo, 1989 187p.
- LIMA, S.L; AGOSTINHO, C. A. **A Tecnologia de Criação de Rãs**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1992. 168p.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO; C. A.; PIRES, J. S. R. Ganho de peso e conversão alimentar de rã-touro *Rana catesbeiana*, com ração (ensaios preliminares) *In*: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 6; 1988, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...**Rio de Janeiro, 1988. p. 35-40.

- LIMA, S. L.; CRUZ, T. A.; MOURA, O. M. **Ranicultura: Análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1999. 172p.
- LIMA, S. L.; CASALI, A. P.; AGOSTINHO, C. A. Desempenho zootécnico e percentual de consumo de alimento de rã-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de recria (pós-metamorfose) do sistema anfigranja. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.32, n.3, p. 505-511, 2003.
- LÓPEZ-RUIZ, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. **Anat. Rec.**, New York, v. 234, p. 161-171, 1992.
- LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. São Paulo, MDSI, 1999, 641p.
- MAASSEN, C.B.M.; HOLTEN-NEELEN C.; BALK, F.; BAK-GLASHOUWER, M.J.; LEER, R.J.; LAMAN, JD; BOERSMA, W.J.; CLAASSEN, E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. **Vaccine**, London, v. 18, n. 23, p.2613-2623, 2000.
- MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.I.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **J. Fish Biol.**, London, v. 25, n. 1, p. 69-81, 1984.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Veter. Anim. Scienc.**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.
- MORETTIN, P.; BUSSAB, W. **Estatística básica**. São Paulo: Atual ED, 1982, 145p.
- NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit. Rev. Food Scie. Nutrit.**, Boca Ration, v. 38, n.1, p. 13:126, 1999.
- NAOUM, P. C.; NAGEL, A. A.; SILVA, F. S. Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em *Bufo paracnemis* (Amphibia-Anura). **Cien. Cult.**, Campinas, v. 38, p. 883-892, 1986.
- NEUMAN, E. *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 induces type 1 responses by cells of gnotobiotic mice. In : THE PROSPECTS OF PROBIOTICS AND THERAPY OF DISEASES OF YOUNG, 2000, High Tatras. **Proceedings...** High Tatras, Slovak Republic : Department of Gnotobiology and Diseases of Young-Research Institute of Veterinary Medicine, Kosice, 2000. p. 85.
- NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 198, p. 229– 236, 2001.
- OKSANEN, P.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; HAMALAINEN, P.; IHANTOLA-VORMISTO, A.; MUURASNIEMI-ISOVIIITA, L.; NIKKARA, S.; OKSANEN, T.; PORSTI, T.; SALMINEN, E.; SIITONEN, S.; STUCKEY, H.; TOPPILA, A.; VAPAATALO, H. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG **Annals of Medicine**, v. 22, p. 53-56, 1990.

- OLIVEIRA, L. W.; MOURA, W. L.; MATUSHIMA, E. R.; EGAMI, M. I. 1997 Detecção citoquímica da mieloperoxidase em eosinófilos e mononucleares azurófilos do sangue de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Reptilia, Crocodilia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49; 1997, Belo Horizonte, MG. **Anais...**Belo Horizonte: SBPC, 1997. p.878.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.
- OZAWA, K.; YABU-UCHI, K.; YAMANAK, K. Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 23, n. 12, p. 1147-1156, 1978.
- PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Braz. J. Vet.**. São Paulo, v. 33, n. 1, p. 15-18, 1996.
- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London : Chapman & Hall, 1992, 145-180p.
- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; HOLGADO, A.P.R. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*-influence of dose on the secretory immune-response and protective capacity in intestinal infections. **J. Dairy. Res.**, Cambridge, v. 58, n.4, p. 485-496, 1991.
- PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. **Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics**. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000, 213-233p.
- PLANAS, M.; CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 171-190, 1999.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarina-lagunar de Cananéia – SP. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 23-40, 1995.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Técnicas hematológicas e pesquisa de hematologia **Apostila curso hematologia aplicada à piscicultura**, CAUNESP – UNESP, 2005, 12p.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. Hematologia de peixes Brasileiros In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Varela, São Paulo, 2004, p. 89-120.
- RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 167, p. 301–313, 1998.

- RIBEIRO, W.R. **Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803.** 1978. 137f. Tese (Doutorado em ciências, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces.** Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunology.** 5ed. London: Mosby, 1998 423p.
- ROSENFELD, G. Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILI-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 84, 2000, p. 197-215.
- SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria **Inst. Dairy J.**, Amsterdam, v. 8, p. 341-347, 1998.
- SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 84, p. 319-331, 2001.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente.** 5ª ed., São Paulo, Livraria Santos, 1996. 600p.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, erbiotics and symbyotics-approaching a definition. **Amer. J. Clin. Nutr.**, Baltimore, v. 73, p. 361-364, 2001.
- SHOLZ, U.; GARCÍA, G.; RICQUE, D.; CRUZ, L. E.; VARGAS, F.; LATCHFORD, J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 176, p. 271-283, 1999.
- SHU, Q.; GILL, H.S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20ã) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p.59-64, 2002.
- SILVA, N. R. Alimentação e Nutrição de rã *In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA*, 6; 1988, Rio de Janeiro. RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, 1988. p. 103-119.
- SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES J.C.S.; JENSCH-JUNIOR B.E. Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0° C. **Polar Biology**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 326-328, 2005.
- SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES J.C.S. Phagocytosis and giant cell formation at 0° C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. **J. Fish Biol.**, Scotland, v. 60, p. 466-478, 2002.

- SIWICKI, A. K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of non-specific defence mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Vet.**, Czech Republic, v. 67, p. 328, 1998.
- SPIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo:ED. McGraw-Hill do Brasil, 1981. 165p.
- STÉFANI, M. V. Alimentação e nutrição. In: FERREIRA, C.M. **I Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca**. Bol. Tec., n. 31, p. 18-20, 2001.
- STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. São Paulo Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.
- SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristic of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **J. Fish Biol.**, London, v. 29, n. 3, p. 349-364, 1986.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144p.
- TEIXEIRA, R. D.; MELLO, S. C. R. P.; SANTOS, C. A. M. L. Produção e comércio de rã nas Américas e Europa . In: FERREIRA, C.M. **I Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca**, Bol. Tec., n. 31, p. 1-2, 2001.
- THUVANDER, A.; NORRGREN, L.; FOSSUM, C. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. **J. Fish Biol.**, London, v. 31, p. 197-208, 1987.
- TURNER, R. J. Amphibians In: ROWLEY, A. F., RATCLIFFE, N. N. A. **Vertebrate blood cells**. New York, Cambridge University Press, 1988, 129-209p.
- UNDERHILL, R. A. **Laboratory Anatomy of the Frog**. Iowa USA Wm. C. Brown Company Publishers, 1980, 49p.
- Van FURTH, R.; COHN, Z. A.; HIRSCH, J. G.; HUMPHREY, J. H.; SPECTOR, W. G.; LANGEVOORT, H. L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. **Bull. W. H. O.**, Geneva, v. 46, n. 6, 1972, p. 845-852.
- VITINI, E.; ALVAREZ S.; MEDINA M.; MEDICI M.; DE BUDEGUER M. V.; PERDIGÓN G. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. **Biocell**, Mendoza, v.24, n. 3, p. 223-232, 2000.
- WANG, J. H.; CHANG, M. H. Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Coa fisheries**, Jaipai, 46, p. 69-87, 1994.
- WATKINS, B.A.; MILLER, B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. **Poultry Sci.**, v. 61, p. 1772-1779, 1983.
- WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematol.**, Leipzig, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA. 1996, 662 p.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Inst. Dairy J.**, Amsterdam, v. 8, p. 473-479, 1998.

7 - ANEXOS

Anexo 1

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 4º C

Anexo 2

Corante Rosenfeld

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

0,97g Giemsa em pó

0,53g May-Grünwald em pó

1.000 mL Metanol

Anexo 3

Solução de Hayen

0,5g de bicloreto de mercúrio

5,0g de sulfato de sódio

1,0g de cloreto de sódio

200,0 mL de água destilada

Conservar em geladeira a 4º C

Anexo 4

Solução de Cianometahemoglobina

100,0mg de fericianeto de potássio

2,0mg de bicarbonato de sódio

50,0mg de cloreto de potássio

1000,0 mL de água destilada

Conservar em geladeira a 4º C

Anexo 5

Solução de levedura

200,0mL de solução salina para anfíbios (RINGER) (anexo 5).

0,5g de levedura (fermento biológico)

OBS. Concentração de 11.000 células/mm³ (contagem na câmara de Neubauer).

Conservar em geladeira a 4º C

Anexo 6

Solução fisiológica para anfíbios (RINGER)

100,0mg de bicarbonato de sódio (NaHCO₃)

100,0mg de cloreto de cálcio (CaCl₂)

75,0mg de cloreto de potássio (KCl)

6.000,0 de cloreto de sódio (NaCl)

1.028,0mL de água destilada

OBS.: O soluto de concentração próximo ao meio interno dos anfíbios foi idealizado por Ringer. Deve ser usado em temperatura ambiente

Conservar em geladeira a 4º C