



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA

CÂMPUS DE JABOTICABAL



**DESEMPENHO PRODUTIVO, HEMATOLOGIA  
E MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE RÃ-TOURO,  
*Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO  
CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E  
LIPÍDIOS**

**JAIME FENERICK JUNIOR**  
Biólogo

Julho / 2008  
Jaboticabal / SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA

CÂMPUS DE JABOTICABAL



**DESEMPENHO PRODUTIVO, HEMATOLOGIA  
E MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE RÃ-TOURO,  
*Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO  
CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E  
LIPÍDIOS**

**Jaime Fenerick Junior**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marta Verardino De  
Stéfani**

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

Julho/2008  
Jaboticabal/SP

F332d Fenerick Junior, Jaime  
Desempenho produtivo, hematologia e morfologia do tecido hepático de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios / Jaime Fenerick Junior. -- Jaboticabal, 2008  
xiii, 130 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2008

Orientador: Carlos Alberto Vicentini  
Banca examinadora: Margarida Maria Barros, Raquel Fantin Domeniconi, Maira Aparecida Stefanini, Marcos Lania de Araujo, Bibliografia

1. *Lithobates catesbeianus*. 2. Desempenho produtivo. 3. Morfologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 636.95

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** DESEMPENHO PRODUTIVO, HEMATOLOGIA E MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE RÁ-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS

**AUTOR:** JAIME FENERICK JUNIOR

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AQUICULTURA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru

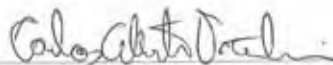
Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS  
Depto. de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, Campus de Botucatu

Profa. Dra. RAQUEL FANTIN DOMENICONI  
Depto. de Anatomia Humana/Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA

Profa. Dra. MAÍRA APARECIDA STEFANINI  
Departamento de Morfologia e Patologia / Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. MARCOS LANIA DE ARAUJO  
Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 10 de julho de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI

Dedico

A meu pai Jaime (*in memoriam*) com muitas saudades,  
a minha mãe Maria Zilda pelo carinho e dedicação,  
a minha irmã Lais, meu cunhado André  
e meu sobrinho Pedro.

## **Agradecimentos**

- Meu pai, minha mãe, minha irmã e meu sobrinho que apoiaram e incentivaram durante toda a minha vida.
- Ao Orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini, pela confiança depositada, pelo incentivo, orientação e amizade.
- À Co-orientadora Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani, pelo incentivo e companheirismo.
- Dra. Margarida Maria Barros, Dra. Raquel Fantin Domeniconi, Dra. Maira Aparecida Stefanini, Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, Dra. Patrícia Maria Contente Moraes Valenti, Dra. Maria Terezinha Siqueira Bombonato, Dr. Marcos Lania de Araujo, Dr. Bruno Cesar Schimming e Dr. Reginaldo José Donatelli por constituio e participaram na Banca Examinadora.
- A todos os professores que contribuíram para a minha formação na pós-graduação.
- Aos amigos do CAUNESP, pela amizade, convivência, pela ajudas recebidas nas coletas e no processamento do material utilizado neste experimento.
- Aos funcionários do CAUNESP, pelo convívio, pela ajuda e pela amizade.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido em forma de Bolsa de Doutorado
- A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REFERÊNCIAS.....	16

### CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DE RÃ-TOURO, <i>Lithobates catesbeianus</i> , ALIMENTADA COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Instalações e condições experimentais.....	32
Material biológico.....	33
Dietas experimentais.....	33
Delineamento experimental.....	35
Manejo experimental.....	35
Parâmetros analisados.....	36
Parâmetros de desempenho produtivo.....	36
Parâmetros metabólicos.....	37
Glicose sanguínea.....	37
Glicogênio hepático.....	37
Lipídios totais do fígado.....	39
Índice hepatossomático (IHS).....	40
Índice gordurassomático (IGOS).....	40
RESULTADOS.....	41
Temperatura.....	42
Parâmetros de desenvolvimento produtivo.....	43
Parâmetros metabólicos.....	47
DISCUSSÃO.....	50
Parâmetros de desenvolvimento.....	51

Parâmetros metabólicos.....	54
CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	58

### **CAPÍTULO III**

#### HEMATOLOGIA DE RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E

LIPÍDIOS.....	65
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
Instalações e condições experimentais.....	73
Delineamento Experimental.....	73
Manejo experimental.....	73
Parâmetros analisados.....	74
Contagem de Eritrócitos.....	74
Contagem Diferencial de Leucócitos.....	75
Determinação do Hematócrito.....	75
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	88

### **CAPÍTULO IV**

#### MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS.....

94	
RESUMO.....	95
ABSTRACT.....	96
INTRODUÇÃO.....	97
MATERIAL E MÉTODOS.....	103



Estudos Anatômicos.....	104
Estudos Histológicos.....	105
Estudos de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	105
RESULTADOS.....	107
DISCUSSÃO.....	119
CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS.....	125

## **CAPÍTULO V**

Considerações Finais.....	129
---------------------------	-----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

TABELA 1	Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.....	34
Tabela 2	Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para ganho de peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar, Taxa de eficiência protéica, Taxa de crescimento específico.....	45
TABELA 3	Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para glicemia (mg/100ml), glicogênio hepático (g/100g%), lipídio fígado (g%), IHS(%) e IGOS (%).....	46
TABELA 4	Valores médios do Índice gordurassomático (IGOS %) das rãs para rações e coletas.....	49

### CAPÍTULO III

TABELA 1	-Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas dos eritrócitos totais ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), monócito (%), basófilo (%), linfócito (%), neutrófilo (%), eosinófilo (%), hematócrito (%), leucócito ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) e trombócito ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ).....	80
----------	--	----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

FIGURA 1	Vista interna do galpão onde localizava-se as baias experimentais.....	32
FIGURA 2	Vista interna das baias experimentais A=abrigo; CA=canaleta de água e CV cocho vibratório.....	33
FIGURA 3	Cocho vibratório usado para a alimentação.....	35
FIGURA 4	Valores médios da temperatura no interior e fora do galpão.....	42
FIGURA 5	Peso Médio das rãs-touro (g) durante o período experimental.....	43
FIGURA 6	Consumo de ração das rãs-touro (g) durante o período experimental.....	44

### CAPÍTULO III

FIGURA 1	Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de rã-touro alimentadas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios; Er =eritrócito, Bs = basófilos, Es = eosinófilos, Nt = neutrófilos, Lf =linfócitos, Lfj =linfócitos jovem e Tb = trombócito. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.....	79
----------	---	----

### CAPÍTULO IV

FIGURA 1	Vista ventral de exemplar adulto de rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ), com destaque para: coração (c), septo transverso (st) e fígado (f).....	112
FIGURA 2	Vista ventral do fígado de rã-touro, apresentando três lobos: lobo direito (ld), lobo médio (lm) e lobo esquerdo (le).....	112
FIGURA 3	Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, apresentando hepatócitos (h) arranjados na forma de túbulos, circundados por sinusóides (s). Azul de toluidina, 100X.....	114
FIGURA 4	Destaque para hepatócitos (h) apresentando núcleos arredondados de disposição basal e contendo nucléolos evidentes. Azul de toluidina, 200X.....	114
FIGURA 5	Fotomicrografia do parênquima hepático, com destaque para ducto biliar (db) revestido por epitélio simples cuboidal (e), próximo de um vaso sanguíneo (v). Azul de toluidina, 400X.....	114
FIGURA 6	Ducto biliar revestido por epitélio simples cuboidal (e) circundado por células musculares lisas (ml). Azul de toluidina, 400X.....	114
FIGURA 7	Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios (ração 1). Observar	

- hepatócitos (h) organizados na forma de túbulos, apresentando núcleo basal. Azul de toluidina, 400X..... 116
- FIGURA 8 Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios (ração 2). Observar vacuolização citoplasmática (v) nos hepatócitos. Destaque para centros de melanomacrófagos (cm). Azul de toluidina, 200X..... 116
- FIGURA 9 Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentadas com 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios (ração 3). Destaque para hepatócitos (h) organizados na forma de túbulos, apresentando núcleo basal. Azul de toluidina, 400X..... 116
- FIGURA 10 Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios (ração 4). Observar vacuolização citoplasmática (v) nos hepatócitos. Azul de toluidina, 400X..... 116
- FIGURA 11 Eletronmicrografia de hepatócito de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios. Observar núcleo (n) arredondado com áreas de heterocromatina, mitocôndrias arredondadas (m) e algumas vesículas lipídicas (vl) no citoplasma basal (7.750X)..... 118
- FIGURA 12 Eletronmicrografia de hepatócito de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios. Observar núcleos (n), vesículas lipídicas (vl) e retículo endoplasmático rugoso (re) (9.750X). ..... 118
- FIGURA 13 e 14 Eletronmicrografia de hepatócitos de rã-touro, alimentada com 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios. Observar grande quantidade de vesículas lipídicas (vl) no citoplasma basal e apical, e mitocôndrias arredondadas ou na forma de bastões. Devido ao acúmulo de vesículas lipídicas, o núcleo (n), encontra-se achatado na região basal do citoplasma (9.750X e

4.350X, respectivamente). ..... 118



**CAPÍTULO I**

**INTRODUÇÃO GERAL**

A criação de rãs em cativeiro é baseada praticamente em sua totalidade, na exploração da rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, originária da América do Norte e introduzida no Brasil em 1935. Hoje a ranicultura é uma atividade zootécnica intensiva que se apresenta como uma boa alternativa econômica, com produção média anual estimada em 450 toneladas de carne (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Apesar disso, nos ranários comerciais é comum a ocorrência de desenvolvimento anormal ou mortalidade de rãs que podem ser ocasionadas por enfermidades infecciosas, parasitárias ou problemas nutricionais.

Na década de 80 ocorreram modificações na ranicultura, com relação à alimentação, introdução da ração (LIMA & AGOSTINHO, 1984) consorciada com larvas de mosca doméstica (ALEIXO *et al.*, 1984) como atrativo. O número de trabalhos sobre nutrição de anfíbios, principalmente na fase pós-metamorfose é escasso, entre os quais destacam-se estudos sobre exigência protéica (MONTEIRO *et al.*, 1988; BARBALHO, 1991; MAZZONI *et al.*, 1992; STÉFANI, 1995), metabolismo de carboidratos (STÉFANI & URBINATI, 1997 a, b) e determinação do valor nutritivo de alimentos (BRAGA *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 1998; BRAGA & ALBINO, 2001; CASTRO *et al.*, 2001).

Várias questões relacionadas com a nutrição e alimentação das rãs, tanto na fase aquática quanto na fase pós-metamórfica foram detectadas por LIMA & AGOSTINHO (1984). A inexistência de dados sobre as exigências nutricionais de rã-touro levaram os produtores a utilizarem rações comerciais

para peixes carnívoros. Cabe destacar que as indústrias produzem ração em pequena escala, tornando-as mais caras e com fornecimento irregular.

Considerando que as rãs são animais heterotérmicos, o consumo alimentar varia com a temperatura da água e do ambiente, (LIMA & AGOSTINHO, 1992; BRAGA *et al*, 1997; LIMA *et al*, 2003), dificultando assim o manejo alimentar adequado.

Ainda, se o ranicultor fornece alimento em excesso, além de arcar com maior custo com a alimentação, ele prejudicará os animais poluindo o ambiente, devido à deterioração das sobras da ração. Por outro lado, quando se oferece pouca quantidade de alimento, haverá diminuição do peso corpóreo dos animais.

Atualmente para a alimentação de rãs utilizam-se rações comerciais, que na sua maioria, são formuladas e balanceadas a partir do conhecimento das exigências nutricionais de peixes carnívoros, com resultados satisfatórios de ganho de peso e conversão alimentar. Entretanto, vários produtores têm observado em seus ranários a ocorrência de mortalidade na fase pós-metamorfose.

Segundo HIPÓLITO (2001), houve súbito aumento da mortalidade de rãs decorrentes de falhas no manejo sanitário, instalações inadequadas, água de má qualidade e problemas relacionados com consangüinidade. Atualmente, o que chama mais a atenção são as graves alterações hepáticas, como textura, tamanho, cor e forma do órgão. Sugere-se ainda, que essas alterações possam estar relacionadas à alimentação.



Os índices zootécnicos observados para a rã-touro variam com o sistema de criação utilizado e também com a qualidade nutricional da ração (LIMA e AGOSTINHO, 1992; BRAGA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2003). Alterações no manejo, eficiência do cocho, qualidade das rações e variações climáticas podem dificultar uma comparação entre os valores de conversão alimentar dos diversos trabalhos (LIMA *et al.*, 1992).

Informações a respeito da atividade enzimática e metabolismo de carboidratos em anfíbios são escassas na literatura. STÉFANI *et al.* (2002), trabalhando com rações isoprotéicas (30% PB) e isoenergéticas (4.300 kcal kg<sup>-1</sup>) com porcentagens crescentes de inclusão de carboidratos (35%, 40% e 45%), concluíram que a rã-touro utiliza o carboidrato como fonte energética.

Os carboidratos são necessários ao organismo como fonte de energia, além de serem as fontes mais baratas para composição de rações (COELHO, 1992). De acordo com o mesmo autor, os carboidratos apresentam efeito suporte na utilização eficaz das proteínas, além de melhorar a estabilidade das rações na água por suas propriedades aglutinantes. A rã, por ser animal carnívoro, provavelmente necessite de dieta com altos teores de proteína, a qual é utilizada para produção de energia e para o crescimento do animal.

Dentre as fontes de energia utilizadas pelos peixes, os lipídios se destacam por seu elevado valor energético e por sua aplicabilidade na confecção de rações comerciais. Os lipídios de acordo com HARPER (1973) representam um grupo heterogêneo de compostos mais relacionados por suas

propriedades, físicas do que químicas. São substâncias insolúveis na água e solúveis em solventes não polares. Fazem parte dessa classe de compostos as gorduras, os óleos, os esteróides e as ceras.

Os lipídios são componentes importantes da dieta, tanto como fonte de energia como também de ácidos graxos essenciais (WATANABE, 1987), utilizado eficientemente pela grande maioria das espécies de peixes (SARGENT et al., 1989). Muitos estudos demonstram que o aumento da concentração de lipídios nas dietas resultam em maior aproveitamento da proteína pelos peixes. Entretanto, um aumento na deposição de gordura corporal também é verificado (LEE & PUTNAM, 1973; NEMATIPOUR et al., 1992; STOWELL & GATLIN, 1992; SHIAU & LAN, 1996; VAN DER MEER et al., 1997; 2000; MARTINO et al. 2002). Por outro lado, algumas espécies, como o robalo asiático, *Lates calcarifer*, apresentam capacidade limitada de utilização dos lipídios para gerar energia (CATACUTAN & COLOSO, 1995; WILLIAMS et al., 2003), sendo que em outras espécies até mesmo redução no crescimento é verificada com o aumento da concentração lipídica da dieta, como é o caso da carpa indiana, *Catla catla* (SEENAPA & DEVARAJ, 1995).

Análise dos padrões sangüíneos fornece subsídios importantes para o auxílio do diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes ou animais em geral (HINES & YASHOUV, 1970; ANDERSON, 1974; ACHUTHAN NAIR & BALAKRISHNAN NAIR, 1983; SILVEIRA & RIGORES, 1989; RANZANI-PAIVA, 1991; MOISEENKO, 1998; PRAVDA, 1998; SERPUNIN & LIKHATCHYOVA, 1998; RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999). Os hemogramas contribuem para caracterizar estados de saúde

ou de doença em animais, pois a alteração na morfologia e na frequência normal de distribuição de determinadas células pode, em vários casos, revelar processo patológico específico (RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1983).

A grande maioria dos estudos realizados com sangue de anuros refere-se aos glóbulos vermelhos, taxa de hemoglobina e proteína do sangue. Assim, os critérios adotados pelos hematologistas para estabelecimento da nomenclatura dos elementos figurados do sangue de anfíbios na fase larval e adulto estão baseados em estudos comparativos, particularmente com peixes teleósteos (SAUNDERS, 1968; ELLIS, 1977).

NAOUM et al. (1986) e CANNON *et al.* (1987) enfatizaram esse fato, afirmando que a literatura a respeito é escassa, e este quadro se agrava na pesquisa dos elementos celulares sangüíneos das formas pré-metamórficas de anuros. DIAS (1992) relatou a carência de informações sobre a composição celular do sangue dos anfíbios.

O sangue dos anfíbios, assim como de outros vertebrados não mamíferos, é composto por eritrócitos nucleados, leucócitos e trombócitos (DUELLMAN & TRUEB, 1986; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Os glóbulos vermelhos, também chamados hemácias ou eritrócitos na maioria dos vertebrados, formam-se e amadurecem na medula óssea pelo processo que se denomina eritropoiese. Segundo MAPLES (1985) e TURNER (1988), os principais órgãos eritropoéticos nos girinos são o fígado e os rins.

O sangue dos vertebrados é um tecido líquido e móvel, onde estão presentes categorias de células livres do tecido conjuntivo e, que está em

equilíbrio com, praticamente, todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (KALASHNIKOVA, 1976).

O fígado é um órgão vital, cujas funções principais são: produção de bile, armazenamento de glicogênio, de lipídios e vitaminas, síntese de proteínas (fibrinogênio, protrombina e albumina) e metabolização de drogas (GEORGE & CASTRO, 1998).

HIPOLITO *et al.*, (2004) relataram que todo o desempenho da rã-touro está baseado na alimentação e qualquer alteração na função hepática, decorrente da falta de alimento, proteínas de boa qualidade, balanço adequado de aminoácidos, disfunções orgânicas provocadas por estresse e agentes infecciosos ou parasitas, podem causar sérias lesões neste órgão e desta forma faz-se necessários estudos mais aprofundados dos parâmetros bioquímicos de rãs-touro para o bom desempenho das funções hepáticas.

O manejo sanitário e nutricional visa dinamizar as criações por meio do uso de rações para que ocorra obtenção dos nutrientes em quantidades e qualidades desejadas. Contudo o desbalanceamento na relação de carboidratos e de proteínas nas rações, devido à matéria-prima utilizada, ou seus eventuais substitutos, pode comprometer todo o processo nutricional do animal, podendo resultar em disfunção hepática.

Diante do exposto, considerando a escassez de trabalhos que enfoquem aspectos morfofuncionais do fígado de *Lithobates catesbeianus*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar em animais alimentados com

rações contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios, os seguintes aspectos:

- avaliação do desempenho produtivo;
- análise de parâmetros hematológicos e
- análise histológica e ultraestrutural do tecido hepático.

***REFERÊNCIAS***

ACHUTHAN NAIR, G.; BALAKRISHNAN NAIR, N. Effect of infestation with the isopod, *Alitropus typus* M. Edwards (Crustacea:Flabellifera:Aegidae) on the haematological parameters of the host fish, *Channa striatus* (Bloch). *Aquaculture*, v.30, p.11-19 1983.

ALEIXO, R. C. *et al.* Criação de mosca domésticas para suplementação alimentar de rãs. Viçosa, MG: UFV: 12. Informe Agropecuário, 46 p. 1984.

ANDERSON, D.P. *Fish immunology*. New Jersey: TFH Publications, Neptune, 239 p., 1974.

BARBALHO, O. J. M. *Exigências de proteína bruta de rã-touro (Rana catesbeiana, Shaw 1802) na fase de terminação* 1991. 55f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

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.

BRAGA, L.G.T. *et al.* Consumo de alimento em função do peso da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) na fase de recria. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 9, TECNOFROG 97, 2., 1997, Santos. **Anais...** Santos 1997. p. 190.

BRAGA, L.G.T. *et al.* Valor nutritivo de alguns alimentos para rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) na fase de recria. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 203-209, 1998.

BRAGA, L. G. T.; ALBINO, C. F. T. Digestibilidade do fubá de milho pela rã-touro *Rana catesbeiana*. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 11., 2001. Anais... Bragança Paulista, 2001. p. 58.

CANNON, M. S. *et al.* The blood leukocytes of *Bufo marinus*: a light, phase contrast and histochemical study. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v. 65, p. 1445-1453, 1987.

CASTRO, J. C. *et al.* Energia metabolizável de alguns alimentos usados em rações de rãs. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1051-1056, 1998.

CASTRO, J. C. *et al.* Valor nutritivo de alguns alimentos para rãs. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 605-610, 2001.

CATACUTAN, M.R., COLOSO, R.M. Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival, and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 131, 125-133, 1995.

COELHO, S. R. Desenvolvimento de rações comerciais para ranicultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 2, Rio de Janeiro, 1992. *Anais e Coletânea...*Rio de Janeiro, ARERJ, p.163-174, 1992.

DIAS, J. L. C. Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* Shaw ,1802). 1992. Tese (Doutorado) –



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1992.

DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. *Biology of amphibians*. New York-NY: McGraw-Hill Book Company. 670p, 1986.

ELLIS, A. E. The leukocytes of fish: review. *J. Fish Biol.*, London, v. 11, p. 453-492, 1977.

GEORGE, L. L.; CASTRO, R. R. L. *Histologia comparada*. 2. ed. São Paulo: Roca, 286 p., 1998.

HARPER, H. A. Review of physiological chemistry. California, Lange medical publications. 618 p., 1973.

HINES, R.S.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for same normal Israel mirror carp. *Israel J. Aquacult. Bamidgeh*, Rehovor, v. 22, p. 106-113, 1970.

HIPOLITO, M. Alteração hepática: problemas nutricionais. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 11., 2001, Bragança Paulista. Anais, 2001. p. 49-50.

HIPOLITO, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; BACH, E. E. Aspectos bioquímicos em fígado de rãs -touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, n. 2, p.147-153, 2004.

LEE, D.J., PUTNAM, G.B. The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *J. Nutr.* 103, 916-922, 1973.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. Ranicultura:Técnicas e propostas para alimentação de rãs. U.F.V., Viçosa-MG. *Informe Técnico* v. 5, n. 50, 11 p., 1984.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. *A tecnologia de criação de rãs*. Viçosa, MG, UFV, Impr. Univ., 1992.

LIMA, S. L. et al. Desempenho zootécnico e percentual de alimento de rã-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de recria (pós-metamorfose) do sistema anfigranja. *Rev. Bras. de Zoot.*, v. 32, n.3, p. 505-511, 2003.

MAPLES, P.B. In vivo regulation of hemoglobin phenotypes during the development of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. 1985.Dissert. (Ph.D.), - Oklahoma University (Abstract), 1985.

MARTINO, R.C., CYRINO, J.E.P., PORTZ, L., TRUGO, L.C., 2002. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquaculture* 209, 209-218.

MAZZONI, R. et al. Estudio del porcentaje de proteína y la energia en el alimento peleteado para engorde de rana toro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 7, 1992, e SEMINÁRIO DE RANICULTURA, 2, 1992, Rio de Janeiro, 1992. Anais ... 1992 p. 185-190.

MOISEENKO, T.I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with reference to *Coregonus lavaretus*. *J. Ichtyol.*, Silver Spring, v. 38, n. 4, p. 315- 324, 1998.

MONTEIRO, E. S. et al. Avaliação de desenvolvimento de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw) alimentadas com diferentes níveis de proteína. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25., 1988, Viçosa. Anais... 1988. p.77.

NAOUM, P. C. et al. Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em Bufo paracnemis (Amphibia-Anura). *Cienc. Cult.*, v. 38, p. 883-892, 1986.

NEMATIPOUR, G.R., BROWN, M.L., GATLIN, D.M. III, 1992. Effects of dietary energy:protein ratio on growth characteristics and body composition of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis* ♂. *Aquaculture* 107, 359-368.

PRAVDA, D. The present european ichthyohaematology and prospects towards the 21<sup>st</sup> century. *Acta Vet. Brno.*, Tchecoslováquia, v. 67, p. 205-206, 1998.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Características sangüíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp, sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 28, n. 2, p. 141-153,1991.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; GODINHO, H.M. Sobre células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae)-*Rev. Bras. Biol.*, São Carlos, v. 43, n. 4, p. 331-338, 1983.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES F.A.; EIRAS, J.C.; et al. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de

piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1998/1999.

SAUNDERS, D. C. Variations in the trombocytes and small lymphocytes found in the circulation blood of marine fishes. *Trans. Am. Micros. Soc.*, v. 87, p. 39-43, 1968.

SARGENT, J., HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. The lipids. In: Fish Nutrition. 2ed. Academic Press Inc., San Diego, p. 153-217, 1989.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal, Adaptação e Meio Ambiental*. 5a.Ed., São Paulo, livraria Santos, 1996.

SEENAPPA, D., DEVARAJ, K.V., 1995. Effect of different levels of protein, fat and carbohydrate on growth, feed utilization and body carcass composition of fingerlings in *Catla catla* (Ham.). *Aquaculture* 129, 243-249.

SERPUNIN, G.G.; LIKHATCHYOVA, O. A. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs. *Acta Vet. Brno*, Tchecoslováquia, v. 67, p. 339-345, 1998.

SHIAU, S.Y., LAN, C.W. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture* 145, 259-266, 1996.

SILVEIRA, R.; RIGORES, C. Características hematológicas normais de *Oreochromis aureus* em cultivo. *Rev. Latinoam. de Aquic.*, v. 39, p. 54-56, 1989.

STÉFANI, M. V. Níveis de proteína adequada ao crescimento da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). In: INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, 1<sup>st.</sup>, ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8., Viçosa, 1995. *Resumos...* p. 65, 1995.

STÉFANI, M. V.; URBINATI, E. C. Metabolic studies em utilization of carbohydrate in bullfrog (*Rana catesbeiana*, Shaw,1802) diets. In : WORLD AQUACULTURE 97. THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE & EXPOSITION OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, Seattle, 1997, Proceedings... 1997a. p. 111.

STÉFANI, M. V.; URBINATI, E. C. Effect of different levels of carbohydrate in diet of bullfrog on body composition. In: WORLD AQUACULTURE 97. THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE & EXPOSITION OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, Seattle, 1997. Proceedings p. 112, 1997b.

STÉFANI, M.V.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C. Alterações estruturais do fígado da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) submetida a deitas com níveis crescentes de carboidratos. *Arquivos de Veterinária*, v.18, p.78-82, 2002.

STOWELL, S.L., GATLIN, D.M. III, 1992. Effects of dietary pantethine and lipid levels on growth and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 108,177-188.

TEIXEIRA, R. D. et al. The world market frog legs, *FAO/Globefish Research Programme*. Rome, FAO. 68: 44p. 2001.

TURNER, R. J. Amphibians. In: ROWLEY, A. F; RATCLIFFE, N. N.A. (Editor), *Vertebrate Blood Cells*, New York, Cambridge University Press, 1988. p. 129–209.

VAN DER MEER, M.B., ZAMORA, J.E., VERDEGEN, M.C.J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research* 28, 405-417, 1997.

WATANABE, W.O., ELLIS, S.C., CHAVES, J. Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *J. World Aquacult. Soc.* 32, 30-40, 2001.

WILLIAMS, K.C., BARLOW, C.G., RODGERS, L., HOCKINGS, I., AGCOPRA, C., RUSCOE, I. Asian seabass *Lates calcarifer* perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. *Aquaculture* 225, 191-206, 2003.



**CAPÍTULO II**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO  
DE RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA  
COM RAÇÃO CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS  
DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS**

## **RESUMO**

O presente trabalho visou estudar o desempenho produtivo da rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos (35% e 40%) e lipídios (4,5% e 8,5%), com teor de proteína bruta de 31,0% e energia bruta entre 3888 a 4135 kcal/kg. Seiscentas rãs com peso médio inicial de 31,0g foram utilizadas para avaliação do desempenho zootécnico, glicemia, glicogênio hepático, lipídio do fígado, índice hepatossomático (IHS) e índice gordurassomático (IGOS), em cinco coletas mensais. Apesar dos parâmetros metabólicos não terem sido influenciados pelos diferentes níveis de carboidratos e lipídios utilizados nas rações, pode-se concluir que nas condições em que foi realizado o trabalho, não houve alterações no desempenho produtivo das rãs. O aumento do índice gordurassomático (IGOS) observado nas rãs alimentadas com a Ração R<sub>2(35/8,5)</sub> e Ração R<sub>4(40/8,5)</sub> nas duas últimas coletas, ocorreu porque o teor de lipídios nas rações era maior, e parte deste foi depositado nos corpos adiposos dos animais. A utilização da ração (R3) com 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios reduziu os níveis de proteínas na dieta e diminuiu o índice gordurassomático, e conseqüentemente permitira a redução do custo da ração.



## **ABSTRACT**

The present work sought to study the productive acting of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, fed with ration containing different carbohydrate levels (35% and 40%) and lipids (4,5% and 8,5%), with tenor of crude protein of 31,0% and crude energy among 3888 to 4135 kcal/kg. Six hundred frogs with weight medium initial of 31,0g were used for evaluation of growth, lipid of the liver, hepatosomatic index (IHS) and fatty somatic index (IGOS), in five monthly collections. In spite of the metabolic parameters they have not been influenced by the different carbohydrate levels and lipids used in the rations, it can be ended that in the conditions in that the work was accomplished, there were not alterations in the productive acting of the frogs. The increase of the index gordurassomático (IGOS) observed in the frogs fed with the ration R2(35/8,5) and ration R4(40/8,5) in the last two collections, it happened because the tenor of lipids in the rations was larger, and part of this was deposited in the bodies fatty of the animals. The use of the ration (R3) with 40% of carbohydrate and 4,5% of lipids it reduced the levels of proteins in the diet and it reduced the index gordurassomático, and consequently it had allowed the reduction of the cost of the ration.

## ***INTRODUÇÃO***

A ranicultura é uma atividade econômica passível de ser realizada em pequenas propriedades rurais. No Brasil, é baseada em sua totalidade, na exploração da rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, originária da América do Norte e aqui introduzida em 1935, demonstrando boa adaptação ao clima subtropical brasileiro (FONTANELLO et al., 1988). Somente na década de 80, é que a ranicultura nacional começou a se firmar como atividade zootécnica devido ao interesse de alguns pesquisadores em racionalizar os sistemas de criação existentes, tais como a introdução de ração (LIMA e AGOSTINHO, 1984) e uso de larvas de mosca doméstica como atrativo (ALEIXO et al. 1984).

Os trabalhos sobre nutrição de anfíbios são escassos, entre os quais podemos destacar trabalhos sobre exigência protéica (MONTEIRO et al. 1988; BARBALHO, 1991; MAZZONI et al., 1992; STÉFANI, 1995; WIRZ et al., 1992), metabolismo de carboidratos (STÉFANI e URBINATI, 1997 a, b) e determinação do valor nutritivo de alimentos (BRAGA et al. 1998; CASTRO et al. 1998; BRAGA e ALBINOS 2001; CASTRO et al., 2001).

STÉFANI (1996), estudando dietas ricas em carboidratos para rã-touro, concluiu pela viabilidade de seu uso, propiciando a redução dos níveis de proteína. STÉFANI e URBINATI (1997) apontaram para o fato de que a rã-touro metaboliza o carboidrato em fonte de energia, enquanto que a proteína é utilizada principalmente no crescimento corporal.

STÉFANI et al. (2002) trabalharam com rações isoprotéicas (30% PB) e isoenergéticas (4.300 kcal kg<sup>-1</sup>) com porcentagens crescentes de

inclusão de carboidratos (35%, 40% e 45%), e concluíram que a rã-touro utiliza o carboidrato, proveniente da dieta, como fonte energética, o que demonstra a atividade da amilase desse animal na fase pós-metamórfica, e demonstra efeito economizador da proteína para obtenção de energia, que é destinada para o crescimento corporal.

Dentre as fontes de energia utilizadas pelos peixes, os lipídios se destacam por seu elevado valor energético e por sua aplicabilidade na confecção de rações comerciais. Os lipídios, de acordo com HARPER (1973), representam um grupo heterogêneo de compostos mais relacionados por suas propriedades físicas do que químicas. São substâncias insolúveis na água e solúveis em solventes não polares. Fazem parte desta classe de compostos as gorduras, os óleos, os esteróides e as ceras.

Os lipídios constituem importante classe dos nutrientes, por serem fornecedores de energia metabólica e por conterem altos valores de energia bruta (9,5 Kcal/kg). Além disso, os lipídios são fontes de ácidos graxos essenciais, são os principais componentes das membranas celulares, agem como precursores de hormônios esteróides, atuam na osmorregulação, servem de carreadores biológicos para absorção de vitaminas A, E e K (TACOM, 1987; LEGER e SORGELOOS, 1992).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi observar o efeito das rações com diferentes níveis de carboidratos e lipídios no desempenho produtivo e metabolismo da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* em diferentes períodos.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### ***Instalações e condições experimentais***

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal, no Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, no período de fevereiro a junho de 2006. Foram utilizadas 12 baias experimentais do galpão de engorda medindo 3 m<sup>2</sup> (Figura 01), as quais apresentavam cochos vibratórios, abrigos e canaletas de água dispostos linearmente (Figura 02).



*Figura 01 - Vista interna do galpão onde localizava-se as baias experimentais*

A água utilizada era proveniente de poço artesiano, com fluxo contínuo. Diariamente, as baias foram limpas, esvaziando-se as canaletas de água, retirando-se a ração não consumida e a água repostas. As temperaturas interna e externa do galpão foram aferidas diariamente com auxílio de termômetro de bulbo de mercúrio.



Figura 02-Vista interna das baias experimentais A=abrigo; CA=canaleta de água e CV cocho vibratório.

### **Material biológico**

Foram utilizadas 600 rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, com peso médio inicial de 31,0 g na fase inicial de crescimento, oriundas do Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, as quais foram distribuídas nas 12 baias experimentais, sendo 50 animais por baia.

### **Dietas experimentais**

Foram formuladas quatro dietas experimentais isoprotéicas (31,0% de proteína bruta) com níveis de carboidratos (35,0 e 40,0%) e lipídios (4,5 e 8,5%). As análises químicas bromatológicas dos ingredientes utilizados nas dietas foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da FCAVJ – UNESP, seguindo o esquema de WEENDE,

A.O.A.C. (1995). A energia bruta dos ingredientes foi determinada em bomba calorimétrica. A formulação e composição centesimal das dietas experimentais encontram-se na tabela 01.

Tabela 01 – Formulação e composição percentual das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Rações			
	R <sub>1</sub> (35/4,5)	R <sub>2</sub> (35/8,5)	R <sub>3</sub> (40/4,5)	R <sub>4</sub> (40/8,5)
Farelo de Milho	23,50	25,75	20,60	17,70
Farelo de Trigo	8,00	2,75	1,90	3,00
Farelo de Arroz	9,50	2,50	1,50	0,00
Farelo de Soja	27,50	28,50	29,50	28,50
Farinha de Peixe	29,00	29,00	28,90	29,00
Óleo de Soja	0,00	5,00	1,10	5,20
Amido de Milho	1,00	5,00	15,00	15,10
Suplemento vitamínico	0,50	0,50	0,50	0,50
Aglutinantes	1,00	1,00	1,00	1,00
Proteína bruta (%) <sup>1</sup>	31,07	31,10	30,89	30,62
Carboidratos (%) <sup>2</sup>	34,98	35,10	40,03	39,96
Extrato etéreo (%) <sup>3</sup>	4,52	8,47	4,46	8,48
Energia bruta (Kcal/kg) <sup>4</sup>	3913	4135	3888	4097

<sup>1</sup>-Valores calculados a partir de dados obtidos por análise de proteína dos ingredientes, pelo método de Weende (A.O.A.C., 1995).

<sup>2</sup>-Valores calculados pela diferença:  $ENN = \%MS - (\%PB + \%MM + \%EE + \%FB)$

<sup>3</sup>-Valores calculados a partir de dados obtidos por análise de extrato etéreo, pelo método de Weende (A.O.A.C., 1995).

<sup>4</sup>-Valores calculados a partir dos dados e energia bruta dos ingredientes obtidos em bomba calorimétrica (em kcal/kg)

Todos os ingredientes foram pesados, moídos em moinho (peneira malha 1 mm), posteriormente cada dieta experimental foi homogeneizada em misturador tipo “Y”, por 15 minutos. Após esse procedimento, as mesmas foram peletizadas e secas em estufa com circulação de ar forçada à 40°C.

Para a alimentação das rãs, as dietas foram fornecidas em cochos vibratórios (Figura 03), que eram ligados de trinta em trinta minutos durante doze horas. No dia seguinte, as sobras de rações foram retiradas e armazenadas em freezer e, posteriormente, secas em estufa com circulação de



ar forçada , à 70°C por 12 horas, para o cálculo da quantidade de alimento ingerido.



Figura 03 – Cocho vibratório usado para a alimentação

### ***Delineamento experimental***

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições em esquema fatorial 2 x 2, constituídos por dois níveis de carboidratos (35,0 e 40,0%) e dois níveis de lipídios (4,5 e 8,5%).

### ***Manejo experimental***

Para a obtenção dos dados foram realizadas coletas mensais, totalizando cinco amostragens (23/02/2006, 24/03, 24/04, 25/05 e 28/06). No dia anterior à coleta das amostras, as rãs foram submetidas ao jejum para que houvesse padronização dos dados.

Em cada coleta, para obtenção dos dados metabólicos, três rãs foram coletadas ao acaso de cada baia experimental, descerebradas, logo após pesadas em balança digital e a cavidade abdominal aberta com auxílio de

tesoura. Em seguida, os corpos adiposos foram retirados e pesados para o cálculo de índice gordurassomático (IGOS); o fígado também foi retirado, pesado para o cálculo do índice hepatossomático (IHS), um pequeno fragmento foi retirado e armazenado em frasco com fixador Karnoviski, para posterior análise histológica. O restante do material foi embalado em papel alumínio e armazenado em freezer à -20°C, para posterior análise de lipídio hepático e glicogênio hepático.

Todas as rãs foram pesadas no início do experimento, e depois mensalmente, um dia após a coleta, em balança digital para avaliação do desempenho produtivo.

## **Parâmetros analisados**

### ***Parâmetros de desempenho produtivo***

Foram avaliados o ganho em peso (GP), conversão alimentar (CA) e consumo de ração (CR). A taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência protéica (TEP) foram determinadas por meio das seguintes fórmulas:

$$T.C.E. = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})}{\text{dias de experimento}} \times 100$$

$$T.E.P. = \frac{\text{ganho em peso}}{\text{proteína bruta consumida}}$$

sendo: ln= log natural

proteína bruta consumida=% PB na dieta x consumo de alimento (g)

### **Parâmetros metabólicos:**

#### ***Glicose sangüínea***

Na primeira (23/02/2006) e segunda (24/03/2006) coleta, três rãs foram capturadas ao acaso de cada baia experimental, foram descerebradas por espinhalamento, pesadas, sua cavidade abdominal aberta e uma alíquota de sangue de aproximadamente 2 ml foi coletada diretamente do coração (Figura 1), com agulha e seringa plástica contendo anticoagulante (EDTA a 10%). Na terceira (24/04/2006), quarta (25/05/2006) e quinta (28/06/2006) coleta cerca de 2,0 a 3,0 mL de sangue foram retirados por meio de punção da artéria isquiática, utilizando-se agulhas e seringa plástica contendo anticoagulante (EDTA a 10%).

A glicose sangüínea (mg/100ml) foi determinada utilizando-se o método colorimétrico de KING e GARNER (1947), o qual consiste em adicionar 0,1 ml de solução de tungstato de sódio 10% em 1,8 ml de solução isotônica. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer à -20°C até a realização das análises, as quais foram feitas adicionando-se 1,0 ml de reagente cúprico e 3,0 ml de arsenomolibdico, sendo analisadas em espectrofotômetro (540 nm).

#### ***Glicogênio hepático***

O glicogênio hepático foi determinado utilizando-se o método de MOON *et al.*, (1989). No procedimento, 50 a 100 mg de tecido hepático foi pesado e colocado em frasco sobre gelo, anotando-se o peso. Foi adicionado 1,0ml de solução de ácido perclórico 6,0% no frasco sobre gelo,

homogeneizando imediatamente, assegurando-se que todo tecido foi rompido. O frasco foi mantido em gelo na homogeneização e depois neutralizado pela adição do volume de  $K_2CO_3$  3M. Para permitir a evolução de  $CO_2$  e remoção da espuma das paredes do frasco o mesmo foi agitado e após centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos a  $10^\circ C$ . O sobrenadante foi retirado entornado em tubos graduado de 3 ml e armazenado por 48 horas na geladeira a  $8^\circ C$ . Após, o tubo foi agitado e retirou-se 0,1ml (100 $\mu$ l) do homogenado neutralizado. O mesmo procedimento foi realizado com o branco (tampão citrato) e com os padrões (P75, P150, P300 e P600). Colocou-se em pequenos tubos de vidro, acrescentou-se 0,2ml (200 $\mu$ l) de amiloglicosidase e incubou-se à temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação adicionou-se 0,3ml de ácido perclórico 6,0%. O tubo foi agitado e neutralizado pela adição do volume de  $K_2CO_3$  2,25M, agitado novamente e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a  $10^\circ C$ . Foi pipetado 20 $\mu$ l do sobrenadante neutralizado (amostras e padrões) em tubos limpos e adicionado 1ml do meio de análise de glicose (Kit Glicose LABTEST). Foram incubados por 15 min a  $37^\circ C$  (banho-maria). As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

O cálculo foi realizado pela seguinte fórmula:

$$\% = \frac{\sum [P](mg/ml)}{\sum LeitP} \times \frac{LeitAmostra}{PesoFígado(mg)} \times 1,XXX(mg) \times 100$$

XXX = volume de  $K_2CO_3$  3M utilizado para neutralização.

***Lipídios totais do fígado***

A extração dos lipídios totais (g/100g) foi feita por meio da técnica de BLIGH e DYER (1959). Para isto, foi utilizado 500mg de tecido hepático homogeneizado em 5,0 ml de mistura extrativa clorofórmio-metanol (2:1). Após filtragem do homogenado e centrifugação com H<sub>2</sub>O na proporção de 5:1, ocorreu a separação da camada de clorofórmio (que contém a fração lipídica) da camada de metanol (não lipídica), a qual foi desprezada. Cada amostra foi colocada em uma placa de Petri previamente pesada e em seguida, levada a estufa à 100°C por 1 hora para evaporação. Após este período as placas foram pesadas, permitindo a realização dos cálculos para obtenção da quantidade de lipídios em cada amostra.

***Índice hepatossomático (IHS)***

O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{IHS(\%)} = \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

***Índice gordurassomático (IGOS)***

O índice gordurassomático (IGOS) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{IGOS(\%)} = \frac{\text{peso dos corpos adiposos}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

**RESULTADOS**

## Temperatura

Os valores das temperaturas no interior e fora do galpão de engorda estão representados na Figura 04. As temperaturas no interior variaram entre 18,8 a 27,8 °C e as temperaturas externas variaram entre 16,3 a 26,3°C; mostrando a eficiência do galpão para o aumento da temperatura interna, beneficiando o desempenho dos anfíbios principalmente durante o inverno.

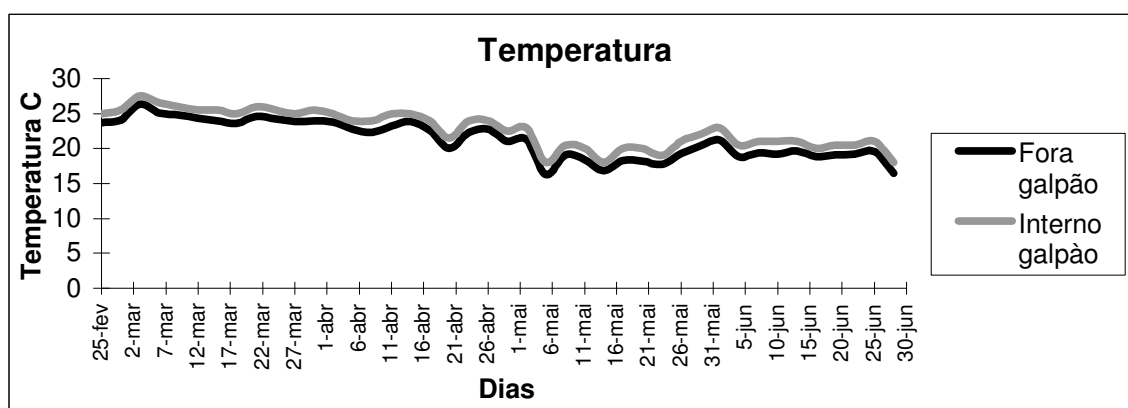


Figura 04 - Valores médios da temperatura no interior e fora do galpão



### **Parâmetros de desempenho produtivo**

Os valores médios do ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração, taxa de eficiência protéica e taxa de crescimento específico encontram-se na Tabela 2.

Observou-se que as rações formuladas com níveis de carboidratos e lipídios não influenciaram o ganho de peso das rãs, que variou de 44,24 a 53,61g. Entretanto, as diferentes coletas no tempo influenciaram significativamente o ganho de peso ( $P<0,01$ ). As rãs apresentaram menor ganho de peso (35,91g) na última coleta experimental ( $C_4$ ), diferindo significativamente das demais (Tabela 2 e Figura 5).

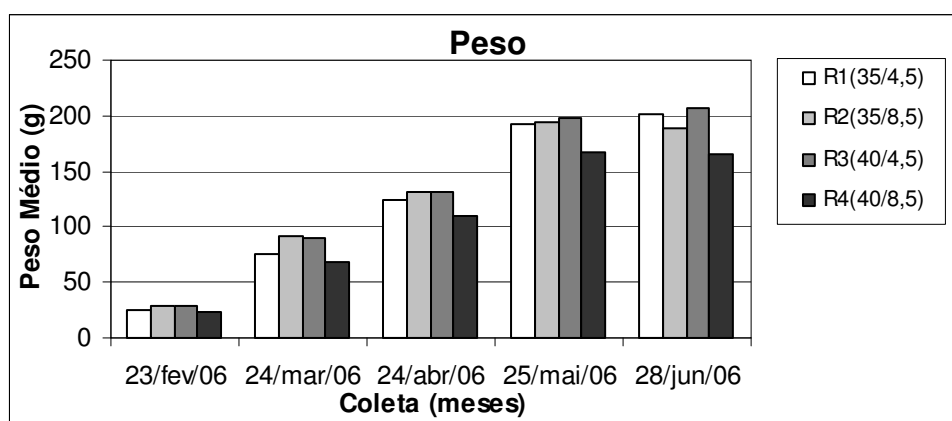


Figura 05 – Peso Médio das rãs-touro (g) durante o período experimental

Os valores médios do consumo de ração encontram-se na Tabela 2.

As rações formuladas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios não influenciaram o consumo de ração, que variou de 2794,50 a 4130,58g. Entretanto, as diferentes coletas no decorrer do experimento influenciaram significativamente o consumo de ração ( $P<0,01$ ). As rãs apresentaram menor consumo de ração (1720,42) na última coleta

experimental (C<sub>4</sub>), diferindo significativamente das demais coletas (Tabela 2 e Figura 6).

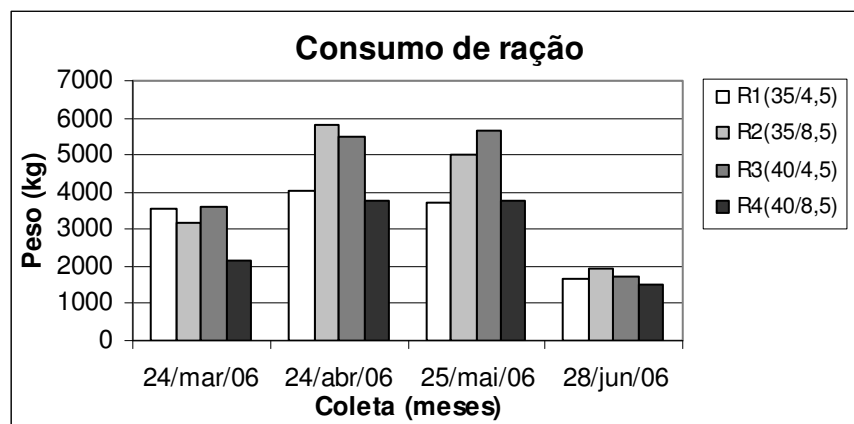


Figura 06 – Consumo de ração das rãs-touro (g) durante o período experimental

As rações formuladas com níveis de carboidratos e lipídios não influenciaram a conversão alimentar das rãs (Tabela 2) que variou de 1,63 a 2,08. Nas diferentes coletas durante o experimento observou-se que houve diferença significativa na conversão alimentar ( $P < 0,01$ ). As rãs na segunda coleta apresentaram a melhor conversão alimentar (2,28) não diferindo significativamente daquela observada em C<sub>3</sub>.

Tabela 2–Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para ganho de peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar, taxa de eficiência protéica, taxa de crescimento específico.

	Variável				
	Ganho Peso (g)	Consumo Ração (g)	Conversão Alimentar	Taxa de eficiência protéica	Taxa de crescimento específico
F para Ração (R)	1,64 <sup>ns</sup>	4,36 <sup>ns</sup>	2,21 <sup>ns</sup>	1,23 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>
F para Coleta (C)	5,96 <sup>**</sup>	26,44 <sup>**</sup>	9,77 <sup>**</sup>	9,01 <sup>**</sup>	58,80 <sup>**</sup>
F para inter. R. x C	1,19 <sup>ns</sup>	1,94 <sup>ns</sup>	2,41 <sup>ns</sup>	1,99 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>
CV(%) - Parcela	23,4	34,19	25,44	35,60	23,88
CV(%) - Sub parcela	29,77	28,64	25,56	28,15	29,34
Medias R <sub>1(35/4,5)</sub>	51,09	3245,33	1,76	1,94	0,72
R <sub>2(35/8,5)</sub>	53,61	3984,00	1,97	1,85	0,73
R <sub>3(40/4,5)</sub>	53,40	4130,58	2,08	1,76	0,75
R <sub>4(40/8,5)</sub>	44,24	2794,50	1,63	2,27	0,77
Média C <sub>1</sub> (24/03/2006)	53,04 a	3116,00 ab	1,34 b	2,53 a	1,41 a
C <sub>2</sub> (24/04/2006)	52,12 a	4785,83 a	2,28 a	1,46 b	0,74 b
C <sub>3</sub> (25/05/2006)	61,27 a	4532,17 a	2,13 ab	1,68 ab	0,55 b
C <sub>4</sub> (28/06/2006)	35,91 b	1720,42 b	1,69 b	2,13 a	0,27 c

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

<sup>ns</sup> não significativo

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade

R<sub>1(35/4,5)</sub> = 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios; R<sub>2</sub> = 35% de carboidratos e 8,5 lipídios; R<sub>3</sub> = 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios; R<sub>4(40/8,5)</sub> = 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios.

R=Ração; C=Coleta

Para a taxa de eficiência protéica (TEP) as rações formuladas com níveis de carboidratos e lipídios também não influenciaram este parâmetro. Entre as diferentes coletas observou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ) na TEP (Tabela 2). As rãs na segunda coleta (C<sub>2</sub>) apresentaram a menor TEP (1,46); diferindo significativamente daquelas observadas na C<sub>1</sub> e C<sub>4</sub>, sendo 2,53 e 2,13 respectivamente.

A taxa de crescimento específico (TCE) representa a porcentagem de crescimento de determinada espécie durante o período experimental. Observou-se que as diferentes rações utilizadas não afetaram os valores neste parâmetro, que variou entre 0,72 a 0,77 (Tabela 2). Entretanto, ocorreu diferença significativa ( $P < 0,01$ ) nos valores da TCE nos diferentes períodos de coletas. A maior TCE ocorre na  $C_1$  (1,41) diferindo significativamente das demais coletas. A menor TCE (0,27) ocorreu na última coleta ( $C_4$ ).

## Parâmetros metabólicos

Na Tabela 3 encontram-se os valores médios dos parâmetros metabólicos.

Tabela 3—Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para glicemia (mg/100ml), glicogênio hepático (g/100g%), lipídio do fígado (g%), IHS(%) e IGOS (%).

	Glicogênio				
	Glicemia (mg/100ml)	Hepático (g/100g)	Lipídio fígado (g%)	IHS(%)	IGOS (%)
F para Ração (R)	0,22 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	0,99 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	16,75 <sup>**</sup>
F para Coleta (C)	280,33 <sup>**</sup>	4,32 <sup>ns</sup>	3,05 <sup>ns</sup>	7,79 <sup>ns</sup>	152,23 <sup>**</sup>
F para inter. R. x C	0,95 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	2,37 <sup>ns</sup>	6,74 <sup>**</sup>
CV(%) – Parcela	3,67	13,13	35,15	19,11	10,92
CV(%) -Sub parcela	3,19	15,12	29,3	13,63	10,25
Medias					
R <sub>1(35/4,5)</sub>	57,86	12,97	2,21	3,84	3,06
R <sub>2(35/8,5)</sub>	57,79	12,06	2,58	3,96	3,77
R <sub>3(40/4,5)</sub>	57,74	12,19	2,16	3,87	3,11
R <sub>4(40/8,5)</sub>	57,72	12,67	2,54	4,12	3,77
Média C <sub>0</sub> (23/02/2006)	66,94 a	13,16	2,65	3,60	2,15
C <sub>1</sub> (24/03/2006)	64,16 a	12,01	2,65	3,76	2,43
C <sub>2</sub> (24/04/2006)	59,29 b	10,83	1,83	3,79	3,11
C <sub>3</sub> (25/05/2006)	53,32 c	12,60	2,23	4,33	4,46
C <sub>4</sub> (28/06/2006)	45,19 d	13,78	2,50	4,65	5,00

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

<sup>ns</sup> não significativo

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade

R<sub>1(35/4,5)</sub>= 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios; R<sub>2</sub>= 35% de carboidratos e 8,5 lipídios; R<sub>3</sub>= 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios; R<sub>4(40/8,5)</sub>=40% de carboidratos e 8,5% de lipídios.

R=Ração; C=Coleta

A concentração de glicose sanguínea nas rãs não foi influenciada pelas rações formuladas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios

(Tabela 3), variando de 57,72 a 57,86 mg/100ml de sangue. Entretanto, entre as coletas houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ), ocorrendo diminuição significativa da glicose sanguínea das rãs ao longo do período experimental, de 66,94 mg/100ml na primeira coleta ( $C_1$ ) para 41,19 mg/100ml na quarta coleta ( $C_4$ ).

O glicogênio hepático das rãs não foi afetado pelas diferentes rações e nem pelas coletas no decorrer do tempo, variando de 12,06 a 12,97 g/100g nas rações contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios (Tabela 3). A concentração de lipídio no fígado variou de 2,16 a 2,58g% entre as rações e também não foi afetada pelas rações e nem pelas coletas no tempo (Tabela 3).

Quanto ao índice hepatossomático (IHS), não foi observado diferença significativa entre as diferentes rações e coletas durante o experimento, variando este de 3,84 a 4,12%, (Tabela 3).

Para o índice gordurassomático (IGOS), a análise de variância indicou efeito significativo ( $P < 0,01$ ) para a interação entre rações e coletas (Tabela 3). Os valores médios do IGOS das rãs encontram-se na Tabela 4. De maneira geral, pode-se observar que entre as diferentes rações só houve diferença significativa do IGOS das rãs-touro nas últimas coletas ( $C_3$  e  $C_4$ ). As rãs que receberam a ração  $R_{2(35/8,5)}$  e  $R_{4(40/8,5)}$  apresentaram os maiores valores de IGOS (Tabela 4). Observou-se também que com o passar do tempo houve aumento significativo deste índice.

Tabela 4 – Valores médios do Índice gordurassomático (IGOS %) das rãs para rações e coletas

Tratamento	Coletas				
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
R <sub>1(35/4,5)</sub>	2,10 Ad	2,34 Acd	3,18 Abc	3,57 Bab	4,13 Ba
R <sub>2(35/8,5)</sub>	2,16 Ab	2,45 Ab	3,07 Ab	5,48 Aa	5,69 Aba
R <sub>3(40/4,5)</sub>	2,19 Ac	2,46 Ac	3,01 Ab	3,53 Bb	4,35 Ba
R <sub>4(40/8,5)</sub>	2,13 Ab	2,47 Ab	3,19 Ab	5,25 Aa	5,83 Aa

*Em cada linha (letra minúscula) e em cada coluna (letra maiúscula) resultados seguidos pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (0,05).*

*DISCUSSÃO*



### **Parâmetros de desenvolvimento**

Durante o período experimental ocorreu diminuição na temperatura ambiente no interior do galpão. Como são animais heterotérmicos, o metabolismo das rãs está diretamente relacionado com a temperatura do ambiente e/ou da água. Segundo BRAGA e LIMA (2001) o melhor crescimento da rã-touro ocorreu entre 25,1 e 30,4°C. FIGUEIREDO (1996) observou melhores ganhos de peso da rã-touro à temperatura de 27,6 e 30,1°C para rãs com peso inicial de 20 e 100 g, respectivamente, e melhor crescimento a 28,2°C.

Os resultados deste estudo demonstraram que essa diminuição da temperatura, principalmente no mês de junho (Figura 4), ocasionou declínio do consumo de ração e conseqüentemente menor ganho de peso e menor taxa de crescimento específico nesse período (Tabela 2).

De maneira geral, observou-se que os diferentes níveis de carboidratos e lipídios utilizados nas rações não afetou o desempenho das rãs. Segundo FONTANELLO *et al.* (1987) as rãs recém-metamorfoseadas possuem ótimo potencial de crescimento e após esta fase inicial (>50g), há tendência do consumo de alimento aumentar e o ganho de peso diminuir. De acordo com a literatura, o consumo alimentar sofre influência dos níveis energéticos da dieta e temperatura ambiente (CARNEIRO, 1990). No presente experimento houve diferença calórica entre as rações ( $R_{1(35/4,5)}$  - 3913,  $R_{2(35/8,5)}$  - 4134,  $R_{3(40/4,5)}$  - 3888 e  $R_{4(40/8,5)}$  - 4097 Kcal EB/kg), Provavelmente os níveis de energia bruta das rações não afetaram o consumo de ração, mas sim a temperatura do ambiente.

Os animais após atingirem o peso médio de 188g na terceira coleta (25/05), converteram pouco em peso até o final do período experimental (Figura 5). Provavelmente, esse menor ganho de peso foi devido ao menor consumo de ração observado nesse período em decorrência da diminuição na temperatura, a qual prejudica o desempenho desta espécie.

Os valores médios de conversão alimentar aparente observados durante o experimento (Tabela 2) estão próximos àqueles obtidos por LIMA e AGOSTINHO (1992) de 1,5 a 2,0:1 para 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 aparente 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) observaram variações na conversão alimentar aparente de 1,3 a 1,6:1 em três ranários em diferentes regiões, no município de Anchieta (ES), Coimbra (MG) e Visconde de Rio Branco (MG).

Segundo LIMA *et al.* (1988) os valores médios de conversão alimentar aparente para rãs-touro durante o período de engorda, variaram de 1,65 a 6,17:1 para os animais tratados com diferentes tipos de dietas. Entretanto, 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 padronização durante a coleta das rações para o cálculo de conversão, e também que a mesma varia com o tipo de instalação utilizada, eficiência do cocho, bem como a qualidade da ração administrada.

No presente estudo observou-se uma variação da conversão alimentar ao longo do período experimental. Na primeira coleta ( $C_1$ ) as rãs apresentaram melhor conversão alimentar (1,34) quando comparada com a segunda coleta (2,28). Provavelmente isso ocorreu porque à medida que as rãs cresceram, ocorreu maior desperdício de ração, que às vezes não foi possível de ser contabilizado devido à ração ter caído na água. Na última coleta a conversão alimentar melhorou porque apesar de ter ocorrido redução do consumo de ração e ganho de peso das rãs, devido à diminuição da temperatura ambiente, proporcionalmente a diminuição do consumo de ração foi maior do que a diminuição do ganho de peso.

Os diferentes níveis de carboidratos e lipídios não afetaram os valores da taxa de eficiência protéica (T.E.P.) das rações. Entretanto, houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) nos valores médios nas diferentes coletas. O maior valor (2,53) encontrado na primeira coleta, coincide com o melhor desempenho dos animais, ou seja, maior ganho de peso e melhor conversão alimentar aparente, coincidindo também com a temperatura mais alta do ambiente. Os resultados obtidos não diferem daqueles de STÉFANI (1996), que observou que os níveis de inclusão de carboidrato não afetaram os valores da TEP, variando de 1,09 a 1,21.

A taxa de crescimento específico (TCE) refere-se a porcentagem de crescimento de determinada espécie durante o período experimental. As diferentes rações experimentais também não interferiram nesse parâmetro. Ocorreu diferença significativa ( $P < 0,01$ ) nos valores médio da TCE nos diferentes períodos, sendo que o maior valor (1,41) ocorreu na primeira coleta,

e o menor valor (0,27) na última coleta, observando-se diminuição da temperatura ambiente, o que afetou o desempenho dos animais.

### ***Parâmetros metabólicos***

Os níveis de carboidratos e lipídios das diferentes rações experimentais não interferiram na concentração de glicose sangüínea. O fato da glicemia não ter se alterado com o aumento de carboidratos na ração, é indicativo de que a glicose foi utilizada pelos tecidos e pelo fígado, capaz de manter a homeostase glicêmica. Os valores médios de glicemia (57,72 a 57,86 mg/100) observados nas rãs do presente experimento foram próximos àqueles encontrados por STÉFANI e URBINATI, (1997a), (48,97 a 55,86 mg/100ml sangue) em rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de carboidratos na ração. SMITH (1954) e HUTCHISON e TURNEY (1975) observaram valores inferiores de glicose sangüínea para *Rana temporária* ( $38 \pm 1,42$  mg %) e *Rana pipiens* ( $24,5 \pm 3,0$  mg%). De acordo com HERMAN (1977) as diferenças nos níveis de glicose sangüínea entre as espécies, podem ser atribuídos a diferenças no manejo, procedimentos de amostragem e/ou método analítico utilizado. Além disso, deve-se considerar também as diferentes espécies de rãs e a época do ano em que ocorreu a coleta.

A concentração de glicogênio hepático das rãs variou de 12,06 a 12,97g/100g e não foi afetada pelos níveis de carboidratos e lipídios, nem pelas coletas durante o tempo de experimento (Tabela 4). Os resultados obtidos sugerem que apesar do aumento da ingestão de carboidratos, não ocorreu depósito na forma de glicogênio hepático. STEFANI (1996) também observou que níveis de carboidratos na ração e as diferentes coletas no tempo não

afetaram a concentração de glicogênio hepático das rãs-touro, que variou entre 5,78 a 5,98g/100g.

De acordo com BYRNE e WHITE (1975), as reservas de lipídios nos anfíbios ocorrem principalmente, nos corpos adiposos, no fígado e tecidos reprodutivos. Os menores valores observados por STÉFANI e URBINATI (1997a) (2,41 e 2,98 g%), e por FENERICK e STÉFANI (2005) (2,86g%) para a mesma espécie foram próximos aos encontrados no presente estudo (2,16 a 2,58 %).

As diferentes rações experimentais não interferiram no índice hepatossomático (IHS). FENERICK e STÉFANI (2005) observaram valores próximos aos encontrados neste estudo (3,36 a 4,65%). BYRNE e WHITE (1975) obtiveram valores de IHS de rãs-touro coletadas na natureza, variando de 1,6 a 3,7%, sendo que o valor mais alto é semelhante aos valores médios nas diferentes coletas no presente experimento (3,36 a 4,65%).

O Índice gordurassomático (IGOS) apresentou interação significativa ( $P < 0,01$ ), entre rações e coletas (Tabela 3). O aumento do IGOS observado nas rãs alimentadas com a  $R_{2(35/8,5)}$  e  $R_{4(40/8,5)}$ , nas duas últimas coletas, provavelmente ocorreu por causa do teor de lipídios presentes nestas rações, e parte deste foi depositado nos corpos adiposos das rãs. Pode-se verificar também que ocorreu aumento deste índice com o passar do tempo, o pode ser considerado normal, uma vez que, com o desenvolvimento das rãs os corpos adiposos vão aumentando de tamanho, principalmente no período pré-desova. O aumento do IGOS com o desenvolvimento do animal também foi

observado por FENERICK e STÉFANI (2005) em rãs alimentadas com rações comerciais.

## **CONCLUSÕES**

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o desempenho produtivo não foi influenciado pelos diferentes níveis de carboidratos e lipídios utilizados nas rações, o aumento do índice gordurassomático (IGOS) observado nas rãs alimentadas com a Ração  $R_{2(35/8,5)}$  e Ração  $R_{4(40/8,5)}$  nas duas últimas coletas, ocorreu porque o teor de lipídios nas rações era maior, e parte deste foi depositado nos corpos adiposos dos animais. Assim, sugerimos a utilização da ração com 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios, considerando que assim ocorre redução dos níveis de proteína na dieta, e diminuição do índice gordurassomático. Conseqüentemente haverá redução do custo da ração.



## *REFERÊNCIAS*

A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Agriculture Chemists. Washington, A.O.A.C., 1025p.1995.

ALEIXO, R. C. et al. Criação de mosca domésticas para suplementação alimentar de rãs. Viçosa, MG: UFV: 12. Informe Agropecuário, 46 p. 1984.

BARBALHO, O. J. M. Exigências de proteína bruta de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) na fase de terminação 1991. 55f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. of Biochem. Physiol.*, Ottawa, v. 37, n. 8, p 911-917, 1959.

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, p. 87, 1995.

BRAGA, L.G.T. et al. Valor nutritivo de alguns alimentos para rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) na fase de recria. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 203-209, 1998.

BRAGA, L. G. T.; ALBINO, C. F. T. Digestibilidade do fubá de milho pela rã-touro *Rana catesbeiana*. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 11., 2001. Anais... Bragança Paulista, p. 58, 2001.

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. de Zoot.*, Viçosa, v. 30, n. 6, p.1659-1663, 2001.

BYRNE, J. J.; WHITE, R. J. Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 50, p. 709-715, 1975.

CARNEIRO, D. J. Efeito da temperatura na exigência de proteína e energia em dietas para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). São Carlos, SP: UFSCar, 56p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos. 1990.

CASTRO, J. C. et al. Energia metabolizável de alguns alimentos usados em rações de rãs. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1051-1056, 1998.

CASTRO, J. C. et al. Valor nutritivo de alguns alimentos para rãs. *Rev. Bras. Zoot.*, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 605-610, 2001.

FENERICK Jr., J.; STÉFANI, M. V. Desempenho e parâmetros metabólicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais *Acta Sci. Anim. Sci. Maringá*, v. 27, n. 3, p. 377-382, 2005.

FIGUEIREDO, M.R.C. Influência dos fatores ambientais sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana*) em gaiolas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 149f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

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.

HARPER, H. A. Review of physiological chemistry. California, Langemedical publications.618p, 1973.

HERMAN, C. A. Comparative effects of epinephrine and norepinephrine on plasma glucose and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, San Diego, v. 32, p. 321-329, 1977.

HUTCHISON, V. H.; TURNEY, L. D. Glucose and lactate concentrations during activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *J. Comp. Physiol.*, Berlin, v. 99, p.287-295, 1975.

KING, E. J.; GARNER, R. J. Colorimation of glucose. *J. Clin. Pathol.*, London, v.1, p.30-33, 1947.

LEGER, P. & SORGELOOS, P. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. *In: Fast A.W. and Lester L.J. (Eds). Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries science, volume 23. Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands, 1992.*

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. Ranicultura:Técnicas e propostas para alimentação de rãs. U.F.V., Viçosa-MG. *Informe Técnico* v. 5, n. 50, 11 p., 1984.

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, p. 35-40, 1988.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. *A tecnologia de criação de rãs*. Viçosa, MG, UFV, Impressão Universitária p. 168, 1992.

LIMA, S.L. et al. Sistema anfigranja I: índices de produtividade com rã-touro, *Rana catesbeiana*. *In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA*, 9, TECHNOFROG 97, 2, Santos. Anais... Santos,1997. p. 198, 1997.

LIMA, S. L. et al. Desempenho zootécnico e percentual de alimento de rã-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de recria (pós-metamorfose) do sistema anfigranja. *Rev. Bras. de Zoot.*, v. 32, n.3, p. 505-511, 2003.

MAZZONI, R. et al. Estudio del porcentaje de proteína y la energia en el alimento peleteado para engorde de rana toro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA*, 7, 1992, e SEMINÁRIO DE RANICULTURA, 2, 1992, Rio de Janeiro, 1992. Anais ... p. 185-190, 1992.

MONTEIRO, E. S. et al. Avaliação de desenvolvimento de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw) alimentadas com diferentes níveis de proteína. *In:*

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25., 1988, Viçosa. Anais... 1988. p.77.

MOON, T.W.; FOSTER, W.; PLISETSKAYA, E.M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. *Canadian Journal of Zoology*, 67:2189-2193, 1989.

SMITH, C. L. The relation between seasonal hyperglycemia and thyroid activity in the frog (*Rana temporaria*) *J. Endocrinol.*, Bristol, v.10, p. 184-191, 1954.

STÉFANI, M. V. Níveis de proteína adequada ao crescimento da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). In: INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, 1<sup>st</sup>., ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8., Viçosa, 1995. *Resumos...* p. 65, 1995.

STÉFANI, M.V. *Metabolismo e crescimento da rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) alimentada com níveis crescentes de carboidratos*. Jaboticabal. 92p. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista), 1996.

STÉFANI, M. V.; URBINATI, E. C. Metabolic studies em utilization of carbohydrate in bullfrog (*Rana catesbeiana*, Shaw,1802) diets. In : WORLD AQUACULTURE 97. THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE & EXPOSITION OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, Seattle, 1997, *Proceedings...* p. 111, 1997a.

STÉFANI, M. V.; URBINATI, E. C. Effect of different levels of carbohydrate in diet of bullfrog on body composition. In: WORLD AQUACULTURE 97. THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE & EXPOSITION OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, Seattle, 1997. *Proceedings* p. 112, 1997b.

WIRZ, R.R. et al. Ganho de peso de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) criada em gaiolas, com rações de diferentes níveis protéicos, consorciada com larvas de díptera (*Musca doméstica*). Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v.19 (único), p.83-88, 1992.





## **RESUMO**

O presente trabalho visou estudar hematologia de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos (35% e 40%) e lipídios (4,5% e 8,5%), que apresentavam teores de proteína bruta de 31,0% e energia bruta entre 3888 a 4135 kcal/kg. Seiscentas rãs com peso médio inicial de 31,0g foram utilizadas para avaliação. Coletas mensais de sangue foram realizadas durante cinco meses, para avaliação do hematócrito e contagem de eritrócitos e leucócitos. As análises hematológicas indicaram que nas condições experimentais deste trabalho, não foram observadas alterações no número de eritrócitos totais e porcentagens de hematócrito, monócitos, linfócitos e basófilos. Concluiu-se que os diferentes níveis de carboidratos e lipídios administrados na dieta, não alteraram os parâmetros hematológicos dos animais.

**ABSTRACT**

The present work sought to study bull-frog hematology, *Lithobates catesbeianus*, fed with ration containing different carbohydrate levels (35% and 40%) and lipids (4,5% and 8,5%), that you/they presented tenors of rude protein of 31,0% and rude energy among 3888 to 4135 kcal/kg. Six hundred frogs with weight medium initial of 31,0g were used for evaluation. Monthly collections of blood were accomplished for five months, for evaluation of the hematocrit and erythrocytes counting and leucocytes. Analyze them hematological they indicated that in the experimental conditions of this work, alterations were not observed in the number of total erythrocytes and hematocrit percentages, monocytes, lymphocytes and basophiles. It was ended that the different carbohydrate levels and lipids administered in the diet, they didn't alter the hematological parameters of the frogs.

## **INTRODUÇÃO**

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).

Os eritrócitos dos anfíbios são células geralmente elípticas com núcleo central, variando 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).

Os leucócitos são: os agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, que são produzidos nos lóbulos linfáticos e no baço e constituem os linfócitos e os monócitos; e os granulócitos, que se formam na medula óssea e se classificam em neutrófilos, basófilos e eosinófilos, cujos citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelo corante de Romanowisk (TAVARES, 2004). Nestes animais, os glóbulos brancos ou leucócitos são também nucleados e de nomenclatura semelhante à dos mamíferos, e em média em número próximo a 7000 por  $\text{mm}^3$ . A principal função dos glóbulos brancos é a defesa do organismo contra corpos estranhos que penetram nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986), TURNER (1988) e DIAS (1992) 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. 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. 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 contra infecções (THUVANDER et al., 1987; TURNER, 1988). 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 *Rana catesbeiana* (FERREIRA, 2002). 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).

Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma. O núcleo tende a ser pouco lobulado e apresenta-se basofílico, com cromatina densa (TURNER, 1988; RANZANI-PAIVA e SILVA SOUZA, 2004). Suas 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 (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).

Os trombócitos de anfíbios são células completas, predominantemente elípticas, arredondadas ou fusiformes, com núcleo fusiforme (PENHA et al., 1996). 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).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas de rã-touro, alimentada com rações contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Instalações e condições experimentais***

No presente trabalho foram utilizados exemplares de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) provenientes do Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, alimentadas com rações contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios. Para estudos das alterações hematológicas de rã-touro, foram coletadas 36 rãs em cada coleta, no período de fevereiro a junho de 2006, totalizando 180 animais.

Conforme relatado no capítulo anterior foram utilizadas quatro rações experimentais com diferentes níveis de carboidratos e lipídios (ração 1: 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios; ração 2: 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios; ração 3: 40% de carboidratos e 4,5% lipídios e ração 4: 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios), sendo mantido o nível de proteína bruta em torno de 31,0%.

### ***Delineamento Experimental***

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições em esquema fatorial 2 x 2, constituídos pelos dois níveis de carboidratos (40 e 45%) e dois níveis lipídios (4,5 e 8,5%).

### ***Manejo experimental***

Foram realizadas coletas mensais, totalizando cinco amostragens (05/02/2006, 09/03, 06/04, 10/05 e 10/06/2006). No dia anterior à coleta das amostras, as rãs foram submetidas ao jejum para que houvesse padronização.



Na primeira (23/02/2006) e segunda (24/03/2006) coleta, três rãs foram capturadas ao acaso de cada baía experimental, foram descerebradas por espinhalamento, pesadas, sua cavidade abdominal aberta e uma alíquota de sangue de aproximadamente 2 ml foi coletada diretamente do coração (Figura 1), com agulha e seringa plástica contendo anticoagulante (EDTA a 10%). Na terceira (24/04/2006), quarta (25/05/2006) e quinta (28/06/2006) coleta cerca de 2,0 a 3,0 mL de sangue foram retirados por meio de punção da artéria isquiática, utilizando-se agulhas e seringas plásticas contendo anticoagulante (EDTA a 10%).

### ***Parâmetros Analisados***

As amostras do sangue foram colocadas em tubos plásticos graduados e mantidas em gelo. Foram realizadas a contagem do número de eritrócitos totais e a contagem diferencial de células sangüíneas de defesa orgânica.

### ***Contagem de Eritrócitos***

Contagem do número de eritrócitos/ $\mu\text{L}$  de sangue foi realizada em câmara hemocitométrica de Neubauer. Inicialmente foram colocados 400  $\mu\text{L}$  do diluente Hayen (Anexo 3) em tubos plásticos graduados. 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, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em número de células  $\times 10^4/\text{mm}^3$  de sangue.

### **Contagem Diferencial de Leucócitos**

Contagem diferencial de leucócitos (CDL) consiste em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Foi realizada em extensões coradas pancromaticamente pelo método de Rosenfeld (1947) em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) foram contados 200 leucócitos. A contagem foi feita no corpo da extensão. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem, obtendo-se, desta forma, o valor relativo. O valor absoluto foi calculado por regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento.

Os números de leucócitos foram calculados pelo método proposto por PITOMBEIRA e MARTINS (1966).

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de leucócitos na extensão} \times \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

Os números de trombócitos foram calculados pelo método proposto por PITOMBEIRA e MARTINS (1966).

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de trombócitos na extensão} \times \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

### **Determinação do Hematócrito**

A determinação do hematócrito foi feita por meio 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 5 minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram compactados na parte inferior do tubo e

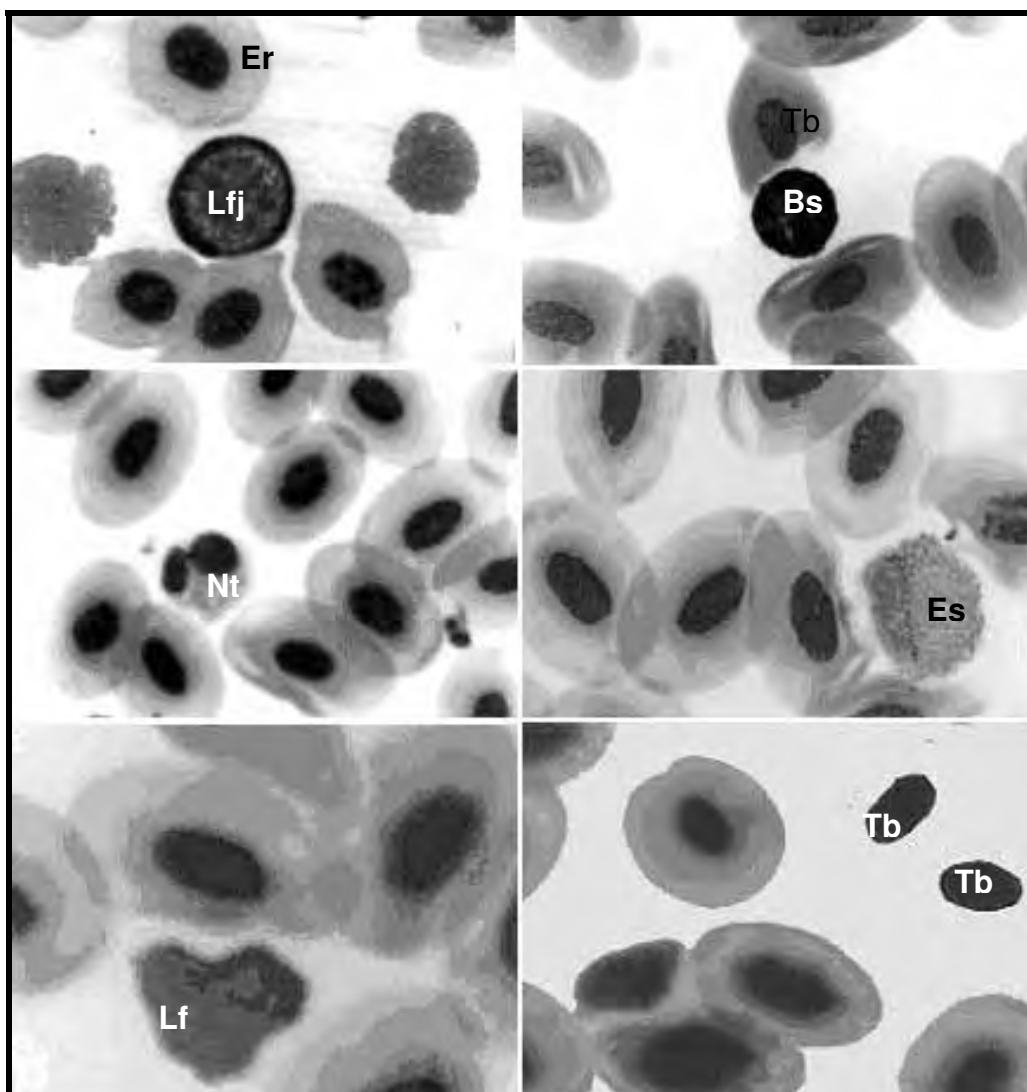
mostrados o volume por eles ocupado em relação ao sangue total. A seguir, foi feito a leitura com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem de células.

## **RESULTADOS**

Os tipos celulares observados são: eritrócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, linfócitos jovens monócitos e trombócitos

Na Figura 1 são identificados os diferentes tipos leucocitários encontrados no sangue de *Lithobates catesbeianus*. Os tipos celulares considerados foram linfócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os monócitos são raros e podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolado e fracamente basofílico. Os linfócitos apresentam núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico, algumas vezes apresentando microvilosidades (projeção citoplasmática). Os neutrófilos freqüentemente possuem núcleo segmentado, apresentam citoplasma ocupado por extensas áreas de retículo endoplasmático granular bem desenvolvido. Os basófilos mostram núcleos sem segmentação e citoplasma com exuberantes grânulos basofílicos. Os eosinófilos apresentam núcleos segmentados e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma.

Células jovens, ou imaturas, estiveram presentes nas extensões sangüíneas analisadas, mas foram ignoradas no presente trabalho. Os valores médios da contagem diferencial de células de defesa orgânica estão expressos na Tabela 1.



*Figura 1-Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de rã-touro alimentadas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios; Er =eritrócito, Bs = basófilos, Es = eosinófilos, Nt = neutrófilos, Lf =linfócitos, Lfj =linfócitos jovem e Tb = trombócito. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.*

Tabela 1-Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas dos eritrócitos totais ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ ), monócito (%), basófilo (%), linfócito (%), neutrófilo (%), eosinófilo (%), hematócrito (%), leucócito ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ ) e trombócito (%).

<b>Eritróc</b>										
	<b>Total</b>	<b>Hematócrito</b>	<b>Leucócito</b>	<b>Monócito</b>	<b>Linfócito</b>	<b>Neutrófilo</b>	<b>Basófilo</b>	<b>Eosinófilo</b>	<b>Trombócito</b>	
F para Trat.	0,77 <sup>ns</sup>	1,92 <sup>ns</sup>	1,63 <sup>ns</sup>	5,16 <sup>ns</sup>	0,64 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	2,23 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	2,09 <sup>ns</sup>	
F para Tempo	7,12 <sup>**</sup>	8,63 <sup>**</sup>	2,82 <sup>ns</sup>	4,54 <sup>**</sup>	10,00 <sup>**</sup>	2,18 <sup>ns</sup>	10,10 <sup>**</sup>	1,21 <sup>ns</sup>	1,58 <sup>ns</sup>	
F para inter. Trat. x Tempo	1,49 <sup>ns</sup>	0,66 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>	0,80 <sup>ns</sup>	1,15 <sup>ns</sup>	2,19 <sup>ns</sup>	1,18 <sup>ns</sup>	0,61 <sup>ns</sup>	
Coef. Variação da Parcela	33,14	28,93	21,15	11,77	8,96	53,12	19,75	33,68	61,06	
Coef. Variação Subparcial	24,29	20,59	21,65	20,56	9,55	37,02	31,48	42,27	64,89	
Média $R_{1(35/4,5)}$	31,07	28,53	60,67	1,64	69,33	12,29	14,29	2,44	4,40	
$R_{2(35/8,5)}$	33,47	29,04	65,71	1,93	71,04	10,29	14,13	2,60	3,80	
$R_{3(40/4,5)}$	31,78	26,78	64,40	1,87	70,18	11,40	14,02	2,53	5,09	
$R_{4(40/8,5)}$	27,91	22,91	56,11	1,87	68,02	11,40	16,38	2,33	2,91	
Média $C_0$	29,42 ab	18,64 ab	66,97	1,50 ab	60,69 ab	14,14	21,03 a	2,64	5,00	
$C_1$	25,08 a	28,67 a	56,25	2,00 a	68,31 a	11,94	14,81 ab	2,94	3,08	
$C_2$	30,00 ab	27,36 a	53,83	2,08 a	69,31 a	10,83	15,31 ab	2,47	5,06	
$C_3$	30,00 ab	29,31 a	68,56	1,83 a	77,06 a	9,58	9,31 b	2,22	3,94	
$C_4$	40,78 ab	30,11 a	63,00	1,72 ab	72,86 a	10,22	13,08 ab	2,11	3,17	

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

ns – não significativo.

\* – significativo ao nível da 5% de probabilidade.

\*\* – significativo ao nível da 1% de probabilidade.

$R_{1(35/4,5)}$  = Ração 1;  $R_{2(35/8,5)}$  = Ração 2;  $R_{3(40/4,5)}$  = Ração 3;  $R_{4(40/8,5)}$  = Ração 4.

$C_0$  = Coleta de 23/02/2006;  $C_1$  = Coleta de 24/03/2006;  $C_2$  = Coleta de 24/04/2006;  $C_3$  = Coleta de 25/05/2006;  $C_4$  = Coleta de 28/06/2006.

Os valores médios das porcentagens de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e trombócitos do sangue periférico das rãs não foram influenciados pelas rações, mesmo durante as varias coletas realizadas no experimento.

Para o número de eritrócitos total, pode-se observar que ocorreram efeitos significativos para as coletas nas diferentes rações (Tabela 1). Ocorreu queda na porcentagem de eritrócitos na primeira coleta (25,08%), aumento na terceira coleta (30,0%), e posterior estabilização até a última coleta.

O hematócrito das rãs foi influenciado significativamente pelo tempo (Tabela 1). Observou-se aumento significativo a partir da primeira coleta ( $C_2$ ) e estabilização da porcentagem do hematócrito até o final das coletas.

A análise de variância da porcentagem de monócitos apresentou efeito significativo para coletas, os valores médios encontram-se na Tabela 1. Pode-se observar que a maior porcentagem de monócitos (2,08%) foi encontrada no sangue das rãs na segunda coleta, não diferindo significativamente do valor encontrado na primeira (2,00) e terceira coleta (1,83%).

A porcentagem de linfócitos no sangue das rãs somente foi influenciada significativamente pelos tempos de coleta (Tabela 1), sendo que pode-se observar que houve tendência de aumento da porcentagem de linfócitos com o passar do tempo, apresentando valores médios de 60,69 a 72,86 %.

A porcentagem de basófilo no sangue das rãs apresentou efeito significativo para a coletas (Tabela 1), ocorreu diminuição na porcentagem de basófilos, de 21,03% da coleta inicial ( $C_0$ ) para 14,81% na primeira coleta ( $C_1$ ), estabilizando estatisticamente na coleta seguinte ( $C_2$ ). Houve queda na porcentagem de basófilos na terceira coleta 9,58 ( $C_3$ ) e aumento na ultima coleta ( $C_4$ ) 13,08.



***DISCUSSÃO***

Resultados de eritrócitos total obtido neste experimento aproximam-se de FENERICK *et al.* (2006) que obtiveram 29,03 a 40,03% da mesma espécie criadas em cativeiro. Este estudo revela que ocorreu queda na porcentagem de eritrócitos na primeira coleta (C1), aumento na terceira coleta, e estabilização até a última coleta. Os menores valores obtidos por DIAS (2006) 30,67% assemelham a este estudo.

WANG e CHANG (1994) em estudos realizados com rãs-touro adultas criadas em cativeiros obtiveram porcentagem de monócitos de 10,67%. Entretanto SZUBARTOWSKA *et al.* (1990) obtiveram o valor relativo de 12,87% de monócitos no sangue periférico de exemplares adultos de *Rana esculenta*. FERREIRA (2002) observou em girinos de *Rana catesbeiana* valores de 0,14% e 0,38% em 14 e 312 horas de amostragem no grupo controle. COPPO (2003) e FIORANELLI *et al.* (2003) obtiveram valores percentuais de 2,9%; valores estes superiores aos do presente trabalho, que apresentou variação de 1,64 a 1,93%.

DUELLMAN e TRUEB (1986) e DIAS (1992) afirmaram que os linfócitos são os leucócitos mais freqüentes no sangue periférico de larvas de anuros, apresentando núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico e, algumas vezes, microvilosidades (projeções citoplasmáticas). A porcentagem de linfócitos foi influenciado significativamente ( $P < 0,01$ ) pelo tempo que variou 60,69 a 77,06%. Os resultados encontrados indicam que a porcentagem de linfócitos diferiu de FIORANELLI *et al.* (2003) que encontraram 26,8% e COPPO (2003) entre 16,3 a 39,8% para a mesma espécie. Os resultados próximos a este foram obtidos por WANG e CHANG (1994) que obtiveram média de 52,77% de linfócitos. FERREIRA (2002) obteve em girino

de *Rana catesbeiana* (controle), a porcentagem de 94,22% em 48 horas e 89,84% em 312 horas no período de amostragem. Entretanto, assemelha a estes valores resultados obtidos por FENERICK *et. al.* (2006) e o maior valor de linfócitos de *Rana catesbeiana* obtido por DIAS, (2006) que se aproxima do resultado obtido no presente trabalho.

A porcentagem de basófilos no sangue das rãs-touro também apresentou efeito significativo para as coletas, variando de 9,31 a 21,03% (Tabela 1). Estes resultados foram superiores aqueles encontrados por WANG e CHANG (1994) que observaram em rãs-touro adultas em cativeiros porcentagens de 2,66%. FENERICK *et al.* (2006) observaram valores de 14,29 a 16,60%, enquanto que, DIAS (2006) observou variações entre 11,87 a 16,20%, similares aos obtidos no presente trabalho.

O sistema imunológico dos animais está relacionado com o peso do animal, sendo tanto mais efetivo quanto maior for o exemplar (NOGA, 1996). No presente trabalho o ganho de peso das rãs foi semelhante durante o experimento e a porcentagem de leucócitos não variou significativamente.

***CONCLUSÕES***

Nas condições experimentais deste trabalho, não foram observadas alterações dos parâmetros hematológicos em *Lithobates catesbeianus*, alimentadas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios. Entretanto, houve variações no número de eritrócitos e porcentagens de monócitos, linfócitos e basófilos nos diferentes tempos de coletas.

***REFERÊNCIAS***

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.

CANNON, M. S. et al. The blood leukocytes of *Bufo marinus*: a light, phase contrast and histochemical study. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v. 65, p. 1445-1453, 1987.

CASILLAS, E.; SMITH. L.S. Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, London, v. 10, n. 5, p. 481-491, 1977.

DIAS, D. C., Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, 2006.

DIAS, J. L. C. *Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e as evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (Rana catesbeiana Shaw ,1802)*. 1992. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1992.

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.

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.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*, Baltimore – Maryland, The Johns Hopkins University Press. 1986.

ELLIS, A. E. The leukocytes of fish: review. *J. Fish Biol.* , London, v. 11, p. 453-492, 1977.

FENERICK, JR. J.; STÉFANI, M. V; MARTINS, M. L. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE RÃ-TOURO, *Rana catesbeiana*, ALIMENTADA COM DIFERENTES RAÇÕES COMERCIAIS B. *Inst. Pesca*, São Paulo, 32(2): 173 - 181, 2006

FERREIRA, C. M. *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas*. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002.

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

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.

GOLDENFARB, P.B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin.Pathol.*, v. 56, p. 35-39, 1971.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal 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.

LORENZI, T.F. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo, MDSI, p. 641, 1999.

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.

NAOUM, P. C. et al. Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em *Bufo paracnemis* (Amphibia-Anura). *Cienc. Cult.*, v. 38, p. 883-892, 1986.

NOGA, E.J. *Fish Disease: diagnosis and treatment*. New Jersey: Mosby-Year

Inc, 1996.

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.

PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J. M. A direct method for white blood count in fishes. *Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará*, v. 6, n. 2, p. 205, 1966.

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, p. 89-120 , 2004.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butant.*, São Paulo, v.20, p. 329-334, 1947.

SAUNDERS, D. C. Variations in the thrombocytes and small lymphocytes found in the circulation blood of marine fishes. *Trans. Am.Micros Soc.*, v. 87, p. 39-43, 1968.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal, Adaptação e Meio Ambiental*. 5a.Ed., São Paulo, livraria Santos, 1996.

SCHVARTSMAN, S. *Intoxicações Agudas*. 4a Ed., São Paulo, Sarvier, 1991.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. Zoologia Geral. São Paulo Companhia Editora Nacional, 757p., 1979.

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.

SZUBARTOWSKA, E. et al. Behavior of the Formed Blood Elements in *Rana esculenta* after repeated contacts of the Animal with a Therapeutic Dose of Foschlor. Bull Arch. Env. Cont. Toxicol., New York, v.45, p. 796–803, 1990.

TAVARES, M. D. Hematologia de Peixes Teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144p., 2004.

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. (Editor), *Vertebrate Blood Cells*, New York,. Cambridge University Press, p. 129 – 209, 1988.

UNDERHILL, R. A. Laboratory Anatomy of the Frog. Wm. C. Brown Company Publishers, 34p. , 1972.

WANG, J. H.; CHANG, M. H. Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. Coa Fisheries Series, v. 46, p. 69-87, 1994.



CAPÍTULO IV

**MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE RÃ-TOURO,  
*Lithobates catesbeianus*, ALIMENTADA COM RAÇÃO  
CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE  
CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS**

## **RESUMO**

O presente trabalho visou estudar a morfologia do tecido hepático de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos (35% e 40%) e lipídios (4,5% e 8,5%), que apresentavam teores de proteína bruta de 31,0% e energia bruta entre 3888 a 4135 kcal/kg. Para estudos das características morfológicas do parênquima hepático, as rãs foram coletadas mensalmente, totalizando cinco coletas, no período de fevereiro a junho de 2006, perfazendo um total de 240 animais. As observações macroscópicas do fígado de *L. catesbeianus* evidenciaram a presença de três lobos hepáticos, lobo direito, lobo médio e lobo esquerdo. O parênquima hepático apresenta-se constituído por hepatócitos com arranjo tubular, sendo caracterizado ausência tanto de lobulação hepática, como de tríades portal. As observações ultraestruturais evidenciaram vacuolização citoplasmática nos hepatócitos dos animais alimentados com teor mais elevados de lipídios (R<sub>2</sub> 35%/8,5% e R<sub>4</sub> 40%/8,5%).

**ABSTRACT**

The present work sought to study the morphology of the hepatic fabric of bull-frog, *Lithobates catesbeianus*, fed with ration containing different carbohydrate levels (35% and 40%) and lipids (4,5% and 8,5%), that you/they presented tenors of rude protein of 31,0% and rude energy among 3888 to 4135 kcal/kg. Para studies of the morphologic characteristics of the hepatic parenchyma, the frogs were collected monthly, totaling five collections, in the period of February to June of 2006, complete of 240 animals. The macroscopic observations of the liver of *L. catesbeianus* evidenced the presence of three hepatic wolves, right wolf, medium wolf and left wolf. The hepatic parenchyma comes constituted by hepatócitos with tubular arrangement, being characterized absence so much of hepatic lobulação, as of triads portal. The observations ultrastructural evidenced vacuolization cytoplasmic in the hepatócitos of the frogs fed with tenor higher of lipids (R2 35%/8,5% and R4 40% /8,5%).

## **INTRODUÇÃO**

Segundo HIPOLITO *et al.*, (2004), o fígado é, por excelência, o órgão de escolha para se conhecer a condição de saúde geral e nutricional dos animais. Alterações causadas por problemas decorrentes de, principalmente, nutrição inadequada, falhas nos manejos sanitário e zootécnico, presença generalizada de agentes infecciosos, refletem na estrutura e função do tecido hepático. Alterações hepáticas causadas pelo processo de deficiência protéica, intoxicação e deterioração da ração provocam modificações do tamanho, cor, forma e textura do órgão.

Dentre os vertebrados, segundo a literatura especializada, o fígado em peixes teleósteos apresenta proeminente papel fisiológico, participando de funções anabólicas (síntese de proteínas, lipídios, carboidratos), catabólicas (nitrogênio, glicogênio e detoxificação de xenóforos), e atua no processo vitelogênese, realizando a síntese de vitelogenina. Desta forma, este tecido é considerado órgão alvo para estudos de muitos parâmetros ambientais e biológicos que podem alterar sua estrutura e metabolismo (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Para anfíbios em geral, a literatura sobre histologia do tecido hepático e principalmente referente a ultraestrutura do hepatócito ainda é escassa, apesar de terem sido realizados diversos estudos sobre nutrição em rã-touro.

SEIXAS FILHO *et al.*, (2006) avaliaram o trato gastrintestinal de girinos da rã-touro, submetidos à alimentação com rações comerciais contendo



22, 24 e 28% de proteína bruta. Com auxílio de microscopia de luz, no 25<sup>o</sup> dia após o início da alimentação exógena, foram observadas células hepáticas que se encontravam com arranjo glandular compacto, sugerindo funcionalidade do órgão, corroborando com os resultados de desempenho obtidos, a partir deste período, onde os animais submetidos às rações de maior nível de proteína bruta se destacaram dos demais em relação ao desempenho.

HIPOLITO *et al.*, (2001) relataram que todo o desempenho da rã-touro está baseado na alimentação e qualquer alteração na função hepática, decorrente da falta de alimento ou de proteínas de boa qualidade, estresse, parasitas ou agentes infecciosos, podem causar sérias lesões no fígado.

Em ranicultura, o manejo sanitário e nutricional visa dinamizar as criações por meio do uso de rações para que ocorra obtenção dos nutrientes em quantidades e qualidades desejadas. O desbalanceamento das rações fornecidas aos animais, devido à matéria-prima utilizada, comprometerá todo o processo nutricional, podendo levar então à disfunção hepática (HIPOLITO, 2004).

Estudos morfológicos realizados no fígado de *Xenopus laevis* (SPORNITZ, 1975), evidenciaram que períodos de jejum acima de quatro semanas não provocaram alterações estruturais nos hepatócitos, ou ainda não foram observadas alterações ultraestruturais do glicogênio intra-hepático. PASANEN e KOSKELA (1974) observaram concentrações substanciais do glicogênio hepático em *Rana temporaria* capturada do campo mesmo após um período de inverno de 7 a 8 meses.

Segundo FIGUEIREDO *et al.*, 2001, In PASAEN e KOSKELA (1974), ocorrem alterações nos níveis de glicogênio no fígado e nos músculos, glucose no sangue e lipídios no corpo de rãs nas diferentes estações do ano, verificando-se considerável hiperglicemia no verão, ao mesmo tempo em que se evidencia um rápido desenvolvimento do corpo gorduroso abdominal.

De acordo com BROWN JR. (1964), enquanto o corpo gorduroso não estiver com suficiente estocagem de gordura, nem houver glicogênio no fígado, os valores de açúcar no sangue estarão baixos (inferiores a 40 mg/100mL). O maior desenvolvimento do corpo gorduroso ocorre no período não reprodutivo. Entretanto, durante o inverno, o teor de lipídio decresce gradativamente, em conseqüência do seu uso com fonte de energia.

Segue-se, então rápida e grande depressão do corpo gorduroso em razão da estação reprodutiva. Esta depressão também observada por PASANEN e KOSKELA (1974), que encontraram os menores pesos do corpo gorduroso de *Rana temporaria* na primavera, depois da desova, foi confirmada por COSTA (1992) em estudo do ciclo reprodutivo da rã-touro em sistema de anfigranja.

Para a rã-touro, segundo FIGUEIREDO *et al.*, 2001, a relação lipossomática atingiu o seu valor máximo, tanto para machos quanto para fêmeas, quando se encontravam no estágio 3 (maturação intermediária) reduzindo-se no estágio 4 (maturação avançada) para valores semelhantes aos observados no estágio 1 (juvenil). A tendência de queda dos valores da relação

lipossomática persistiu no período compreendido entre setembro e fevereiro (estação reprodutiva no hemisfério sul).

Quanto às características histológicas do fígado em vertebrados, foram observados em peixes, que o núcleo dos hepatócitos apresentam-se com formato variando de redondo a ovóide, localizados centralmente no citoplasma, a não ser quando os acúmulos de glicogênio ou lipídeos o deslocam para a periferia da célula. O nucléolo, de alta densidade eletrônica, é único, central e razoavelmente homogêneo. A cromatina é granular, com heterocromatina mais condensada na periferia do núcleo e associada também com o nucléolo (BRUSLÉ & ANADON, 1996).

Estudos ultraestruturais do fígado de *Xenopus laevis* realizados por SPORNITZ (1975) evidenciaram que o complexo de Golgi não é muito proeminente. A presença de numerosas vesículas observadas em cada lado do complexo de Golgi, possivelmente estejam relacionadas com a formação de corpos multivesiculares.

Quanto ao retículo endoplasmático evidenciado em *Xenopus laevis*, SPORNITZ (1975) observou que este se encontra bem definido e geralmente disposto em pilhas, as quais consistem de aproximadamente 25 cisternas individuais, paralelas umas as outras. O retículo endoplasmático encontram-se geralmente localizado próximo aos canalículos biliares, correndo ao longo da membrana plasmática ou em posição próxima ao núcleo.

Em cortes finos os canalículos biliares foram observados como sendo formados por dois a cinco células. A largura do lúmen dos canalículos

biliares esta correlacionada com a atividade metabólica da célula. Em animais submetidos ao jejum os canalículos biliares mostravam lúmen bastante estreito ou colapsado (SPORNITZ, 1975).

Assim sendo, até o momento foram encontrados poucos estudos ultraestruturais sobre o fígado de anfíbios em geral. Desta maneira o presente trabalho foi realizado com o propósito de fornecer informações morfológicas sobre arquitetura do parênquima hepático em animais submetidos a diferentes dietas contendo concentrações variadas de carboidratos e lipídios. Cabe ressaltar que ainda há necessidade de se aprofundar estudos sobre a morfofisiologia do fígado de *Lithobates catesbeianus*, considerando que esta espécie é o único animal utilizado para a ranicultura no Brasil.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

No presente trabalho foram utilizados exemplares adultos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) provenientes do Setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, alimentadas com ração contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios. Para estudos das características morfológicas do parênquima hepático, as rãs foram coletadas mensalmente, totalizando cinco coletas, no período de fevereiro a junho de 2006, perfazendo um total de 240 animais.

Conforme relatado no capítulo anterior foram utilizadas quatro rações experimentais com diferentes níveis de carboidratos e lipídios ( $R_{1(35/4,5)}$ ;  $R_{2(35/8,5)}$ ;  $R_{3(40/4,5)}$  e  $R_{4(40/8,5)}$ ), sendo mantido o nível de proteína bruta em torno de 31,0%.

### ***Estudos Anatômicos***

Para os estudos anatômicos foram utilizados 12 animais em cada coleta, perfazendo um total de 60 exemplares de *L. catesbeianus*. Os animais foram descerebrados por espinhalamento, pesados em balança digital Marte AS2000C e a seguir procedeu-se à abertura da cavidade corporal para observação das características anatômicas do fígado, tais como tamanho, textura e coloração (Figura 1).

Em seqüência o fígado foi retirado para análise da lobação hepática e fotodocumentação com auxílio de máquina fotográfica digital Sony DSC-P41.

### ***Estudos Histológicos***

Para os estudos histológicos foram utilizados 24 animais em cada coleta, perfazendo um total de 120 exemplares adultos de *L. catesbeianus*. Após decerebramento dos animais foi realizada uma incisão na região ventral, para coleta de fragmentos de tecidos hepáticos, que foram imediatamente fixados em solução de Karnoviski por 24 horas e destinados para rotina histológica com inclusão de material em historesina (Leica, Germany), no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências da UNESP, Câmpus de Bauru.

A microtomia dos blocos foi realizada em micrótomo modelo RM 2265 (Leica, Germany), com espessura de 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , com emprego de navalhas descartáveis de vidro. Os cortes histológicos foram destinados para rotina de coloração em hematoxilina/eosina e azul de toluidina. Análise e fotodocumentação do material foram realizadas com auxílio de fotomicroscópio Olympus BX50 (Tokyo, Japan).

### ***Estudos de Microscopia Eletrônica de Transmissão***

Para os estudos ultraestruturais foram utilizados 12 animais em cada coleta, perfazendo um total de 60 exemplares. Após o decerebramento e abertura dos animais, foi realizado gotejamento de solução fixadora de Karnoviski sobre os lobos hepáticos e imediatamente foram retirados

pequenos fragmentos de tecidos para rotina de microscopia eletrônica de transmissão. Os fragmentos de tecidos hepáticos foram imersos, em solução de Karnoviski durante 4 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) em 3 horas. Após desidratação, o material foi incluído em araldite (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis ,USA) e em seqüência, secções de 0,5  $\mu$ m, foram coradas com azul de toluidina para escolha de campos. A seguir, secções de 50 a 70 nm foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), para posterior análise e fotodocumentação em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 (Eindhoven, The Netherlands), com utilização de filme preto e branco 35 mm Eastman 5302 (Kodak), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu.



## **RESULTADOS**

O fígado de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) encontra-se situado na região cranial da cavidade corporal, separado do coração por intermédio do septo transverso. Encontra-se dividido macroscopicamente em três lobos: lobo direito, lobo médio e lobo esquerdo (Figura 2).

O parênquima hepático apresenta-se constituído por hepatócitos, arrançados na forma de túbulos, sendo estes cercados por sinusóides (Figuras 3 e 4). Os hepatócitos apresentam-se como células grandes e poliédricas, com núcleo arredondado, de disposição basal, e contendo nucléolo evidente (Figura 4). Os estudos histológicos evidenciaram ainda que o fígado da rã-touro não apresenta lobulação. Os ductos biliares encontram-se revestidos por epitélio simples cuboidal, e sob este se destaca uma camada de colágeno e de fibras musculares lisas (Figuras 5 e 6).

Quanto aos estudos histológicos e ultraestruturais do fígado da rã-touro alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios, foram observadas as seguintes características:

Em nível de microscopia de luz os hepatócitos mantiveram-se organizados na forma de túbulos, e apresentaram núcleo basal arredondado contendo um ou mais nucléolos evidentes (Figuras 7 e 9). Entretanto, nos animais alimentados com as rações  $R_{2(35/8,5)}$  e  $R_{4(40/8,5)}$  evidenciou-se nos hepatócitos intensa vacuolização citoplasmática (Figuras 8 e 10).

Em nível de microscopia eletrônica de transmissão, os hepatócitos da rã-touro exibiram núcleo basal variando de arredondado a achatado, de acordo com a quantidade de vesículas lipídicas localizadas no citoplasma (Figuras 11, 12, 13 e 14). Destaca-se ainda a presença de retículo endoplasmático granular geralmente dispostos em lamelas. As mitocôndrias exibiram forma arredondada ou em bastões, apresentando alta eletrondensidade (Figuras 11, 12 e 13).

Nos tratamentos com rações contendo 8,5% de lipídios, as eletronicografias evidenciaram acúmulo de vesículas lipídicas no citoplasma, principalmente quando foi administrada ração contendo 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios (Figuras 13 e 14).

***LEGENDAS***

Figura 1 – Vista ventral de exemplar adulto de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), com destaque para: coração (c), septo transverso (st) e fígado (f).

Figura 2 – Vista ventral do fígado de rã-touro, apresentando três lobos: lobo direito (ld), lobo médio (lm) e lobo esquerdo (le).

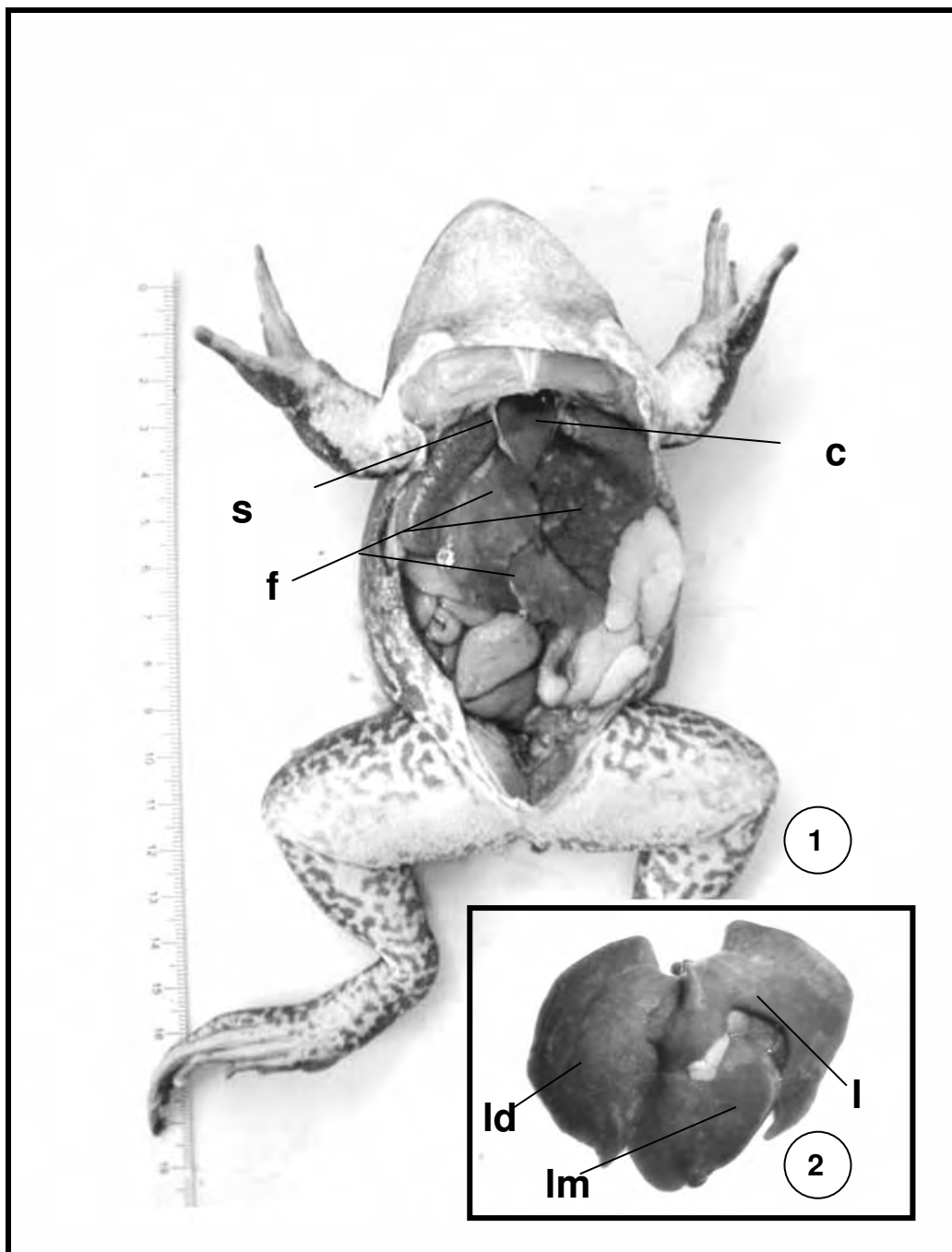


Figura 3 – Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, apresentando hepatócitos (h) arranjados na forma de túbulos, circundados por sinusóides (s). Azul de toluidina, 100X.

Figura 4 – Destaque para hepatócitos (h) apresentando núcleos arredondados de disposição basal e contendo nucléolos evidentes. Azul de toluidina, 200X.

Figura 5 – Fotomicrografia do parênquima hepático, com destaque para ducto biliar (db) revestido por epitélio simples cuboidal (e), próximo de um vaso sanguíneo (v). Azul de toluidina, 400X.

Figura 6 – Ducto biliar revestido por epitélio simples cuboidal (e) circundado por células musculares lisas (ml). Azul de toluidina, 400X.

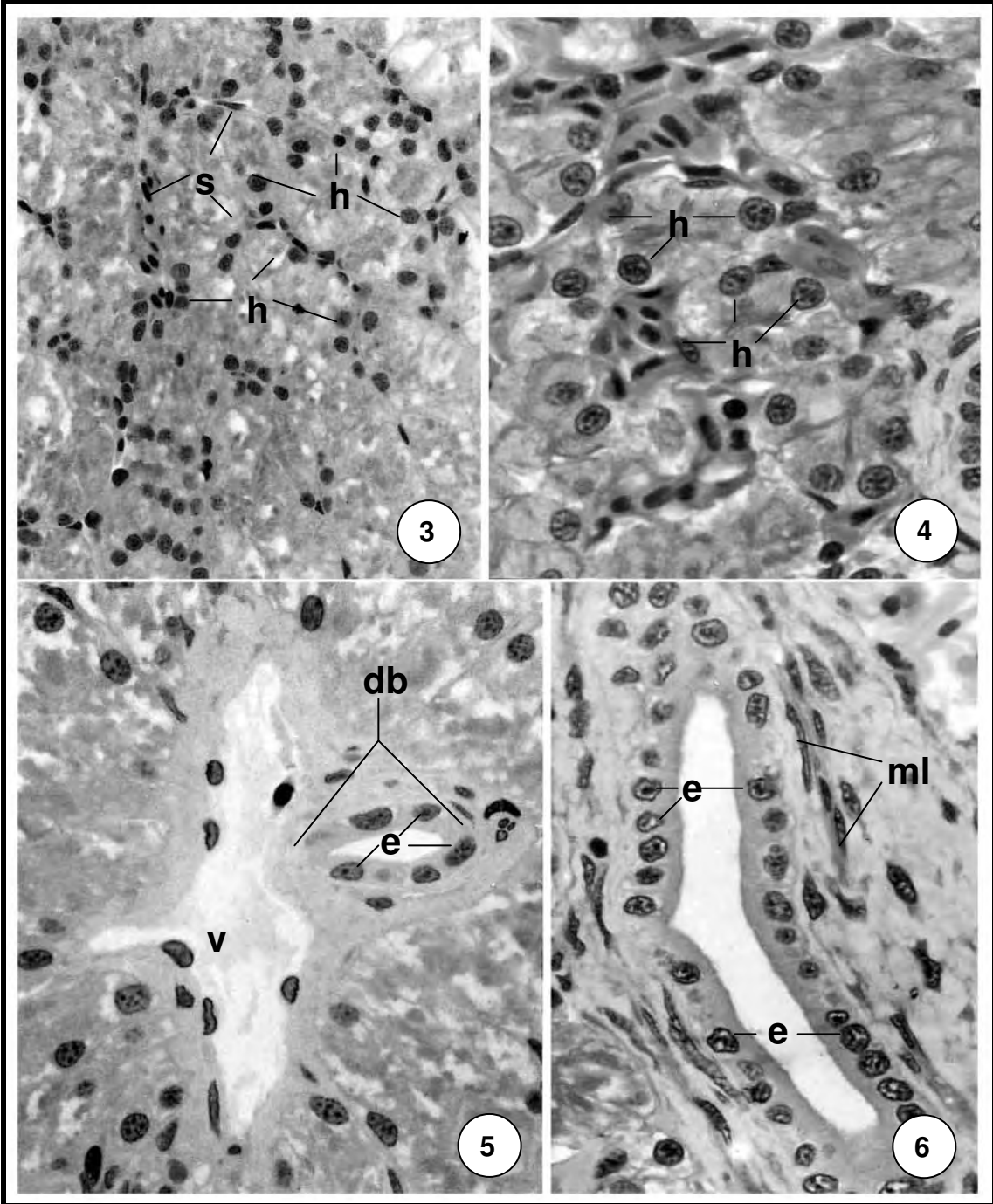


Figura 7 – Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios (ração 1). Observar hepatócitos (h) organizados na forma de túbulos, apresentando núcleo basal. Azul de toluidina, 400X.

Figura 8 – Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios (ração 2). Observar vacuolização citoplasmática (v) nos hepatócitos. Destaque para centros de melanomacrófagos (cm). Azul de toluidina, 200X.

Figura 9 – Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentadas com 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios (ração 3). Destaque para hepatócitos (h) organizados na forma de túbulos, apresentando núcleo basal. Azul de toluidina, 400X.

Figura 10 – Fotomicrografia do parênquima hepático de rã-touro, alimentada com 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios (ração 4). Observar vacuolização citoplasmática (v) nos hepatócitos. Azul de toluidina, 400X.



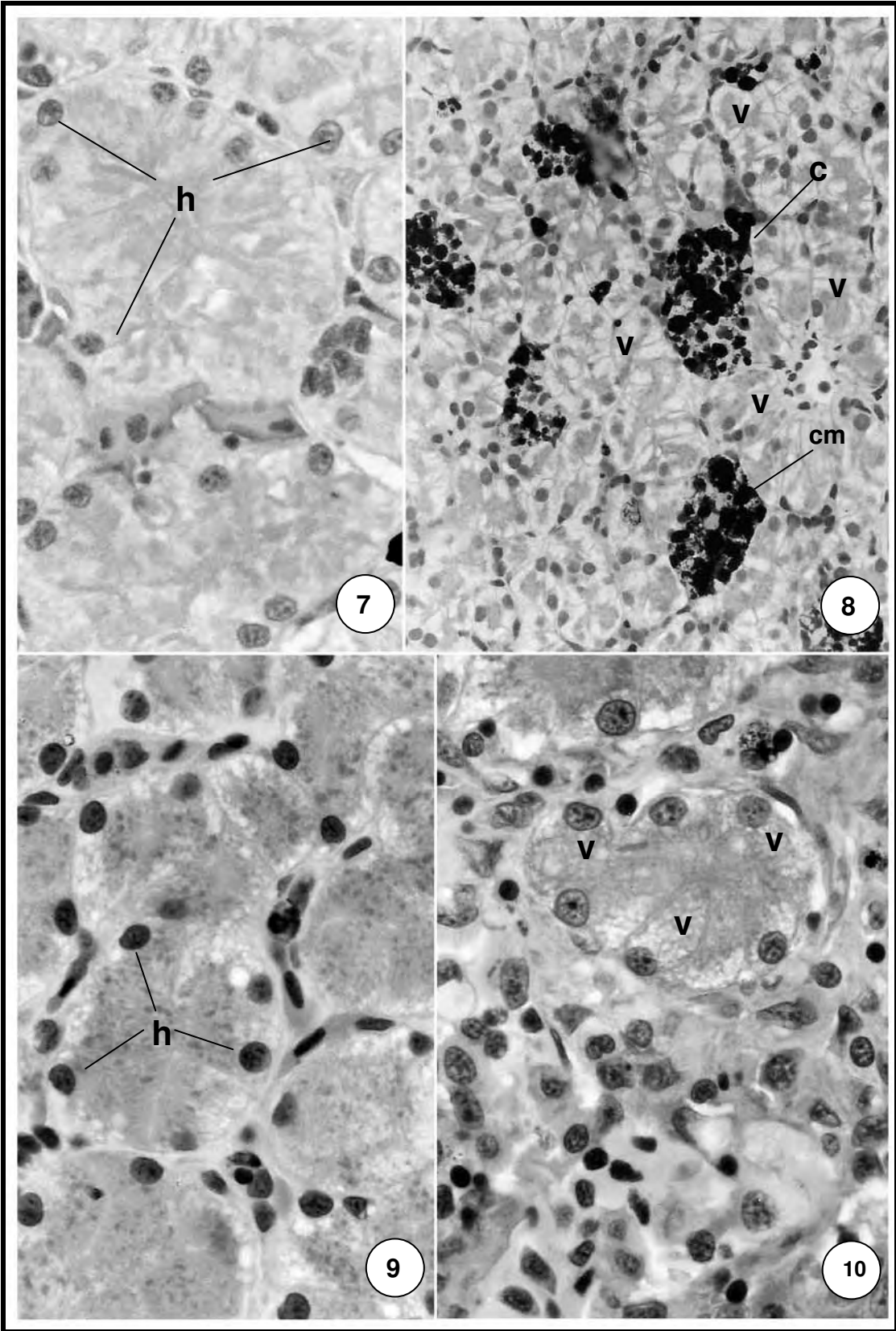
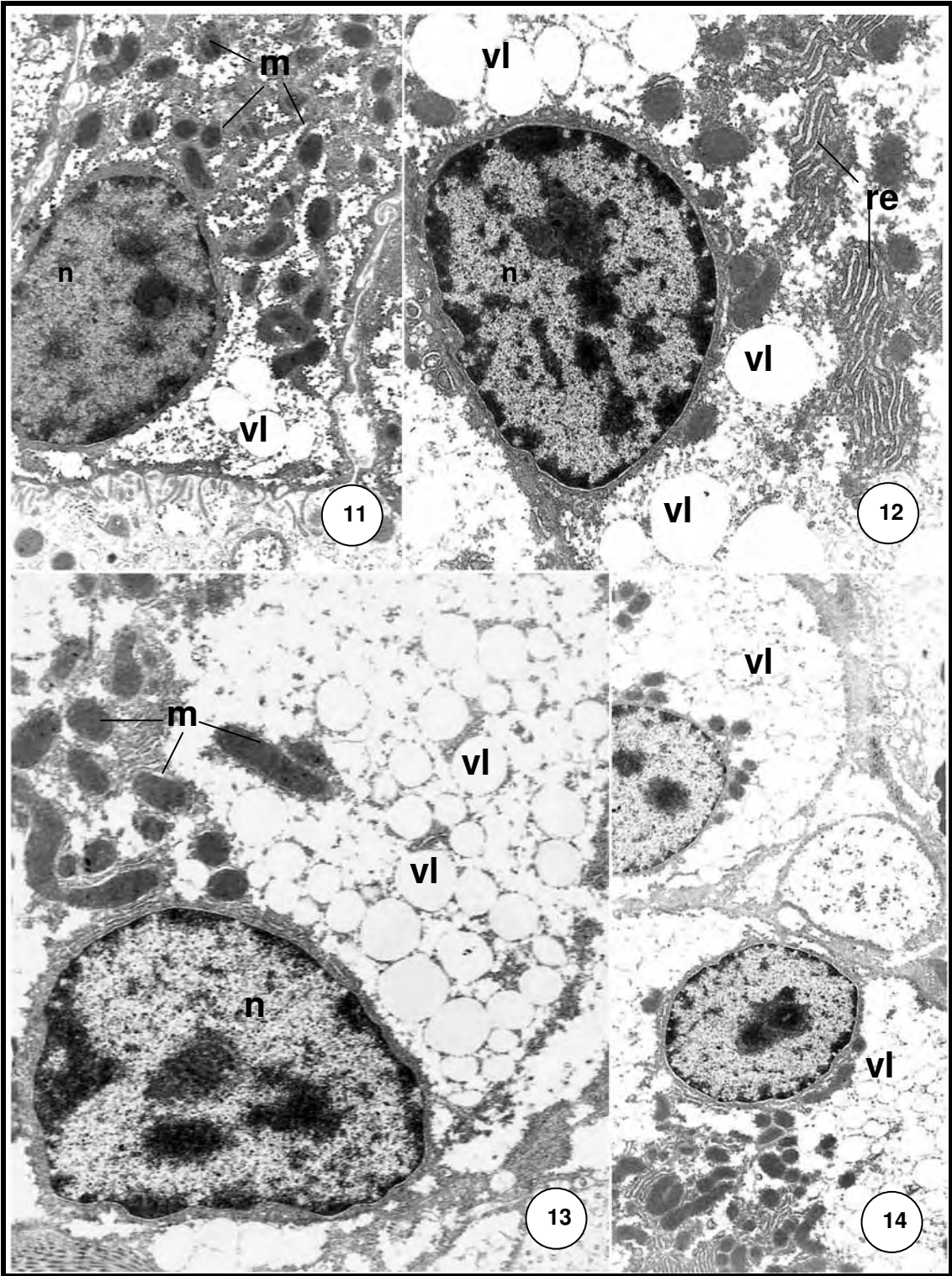


Figura 11 – Eletronmicrografia de hepatócito de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 4,5% de lipídios. Observar núcleo (n) arredondado com áreas de heterocromatina, mitocôndrias arredondadas (m) e algumas vesículas lipídicas (vl) no citoplasma basal (7.750X).

Figura 12 – Eletronmicrografia de hepatócito de rã-touro, alimentada com 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios. Observar núcleos (n), vesículas lipídicas (vl) e retículo endoplasmático rugoso (re) (9.750X).

Figuras. 13 e 14 – Eletronmicrografia de hepatócitos de rã-touro, alimentada com 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios. Observar grande quantidade de vesículas lipídicas (vl) no citoplasma basal e apical, e mitocôndrias arredondadas ou na forma de bastões. Devido ao acúmulo de vesículas lipídicas, o núcleo (n), encontra-se achatado na região basal do citoplasma (9.750X e 4.350X, respectivamente).



***DISCUSSÃO***

As observações macroscópicas do fígado de *L. catesbeianus* evidenciaram a presença de três lobos hepáticos, similar ao encontrado em muitos peixes teleósteos (VICENTINI *et al.*, 2005, BERTOLUCCI *et al.*, 2008). Entretanto, não foram encontradas informações sobre a descrição anatômica do fígado em rã-touro apesar dos estudos morfológicos ou bioquímicos realizados nesta espécie (UNDERHILL, 1972; STEFANI *et al.*, 2002; HIPOLITO *et al.*, 2004).

As observações microscópicas referentes à estrutura histológica do fígado de *L. catesbeianus* demonstraram que o parênquima hepático apresenta-se constituído por hepatócitos com arranjo tubular, e em forma de placas, similar ao encontrado em *Xenopus laevis* (SPORNITZ, 1975). Outra característica observada foi a ausência de lobulação hepática, assim como a falta de tríades portal, similar ao descrito para peixes teleósteos e anfíbios (SPORNITZ, 1975; HAMPTON, 1985; VICENTINI *et al.*, 2005; BERTOLUCCI *et al.*, 2008).

Quanto aos estudos histológicos do fígado da rã-touro (*L. catesbeianus*) alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios, foram observados que os hepatócitos mantiveram-se organizados na forma de túbulos e apresentaram núcleo basal arredondado contendo um ou mais nucléolos evidentes. Em estudos similares realizados por STEFANI *et al.*, (2002), na mesma espécie, com dietas contendo diferentes níveis de carboidratos, não foram observadas alterações significativas referentes a variação de área, diâmetros máximo e mínimo do citoplasma e núcleo do hepatócitos, indicando assim, que não ocorreu alteração estrutural dos hepatócitos com níveis crescente de nutrientes na ração (30%, 35%, 40% e 45% de carboidratos).

Segundo os autores, não houve evidências de depósito de substâncias no citoplasma, uma vez que não ocorreu alteração nas áreas dos hepatócitos.

Todavia, houve evidências de atividades celular considerando que as áreas do citoplasma e do núcleo dos hepatócitos não apresentaram diferenças significativas. Os resultados de STEFANI *et al.*, (2002) mostraram variações nos parâmetros morfológicos apenas nas rãs alimentadas com ração contendo 45% de carboidratos. Isto sugere que a ingestão prolongada de níveis de carboidrato, em torno de 45%, podem afetar a capacidade do animal de utilização deste nutriente.

Quanto às observações histológicas e ou ultraestruturais do fígado de rã-touro (*L. catesbeianus*) verifica-se intensa vacuolização citoplasmática quando os animais foram alimentados com níveis de 35% de carboidratos e 8,5% de lipídios e principalmente com 40% de carboidratos e 8,5% de lipídios. Cabe destacar, que em nível de microscopia eletrônica de transmissão, os hepatócitos da rã-touro exibiram núcleo basal variando de arredondado a achatado de acordo com a quantidade de vesículas lipídicas localizadas no citoplasma.

De acordo com BRUSLÉ e ANADON (1996), em peixes, o núcleo dos hepatócitos localiza-se centralmente no citoplasma, a não ser quando os acúmulos de glicogênio ou lipídeos o desloquem para a periferia da célula. Ainda, de acordo STEFANI *et al.*, (2002) foi observado um aumento da área citoplasmática dos hepatócitos de rãs alimentadas com 45% de carboidratos. O aumento da área do citoplasma pode indicar acúmulo de lipídios no fígado. Entretanto apesar de se ter constatado níveis alto de lipídios em rãs alimentadas com 45% de carboidratos, não se pode afirmar que estes níveis sejam prejudiciais, considerando que o desempenho destes animais foi melhor em relação ao demais tratamentos.

Quanto às organelas citoplasmáticas dos hepatócitos de *L. catesbeianus* observou-se a presença de retículo endoplasmático granular, dispostos

em lamelas. Ainda, as mitocôndrias exibiram forma arredondada ou em bastões, com alta eletrondensidade. Aparentemente, não foram observadas alterações em nível de organelas, nos hepatócitos de rã-touro alimentas com diferentes níveis de carboidratos e lipídios. Entretanto, em estudos realizados em *Rana pipiens* (BAIC *et al.*, 1979), submetidas a dois meses de inanição, foram observadas drásticas alterações na morfologia do tecido hepático. Os sinusóides apresentaram-se aumentados e os hepatócitos diminuíram de tamanho.

Finalmente, segundo BAIC *et al.*, (1979), a maioria das estruturas celulares dos hepatócitos de *Rana pipiens*, exibiram alterações, após o período de dois meses de jejum. As mitocôndrias apresentaram-se inchadas e freqüentemente exibiam formas esféricas. Outra característica observada foi a diminuição significativa na quantidade e tamanho das gotas de lipídios e na quantidade de glicogênio intracelular.

**CONCLUSÕES**



Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o fígado de *L. catesbeianus* apresenta três lobos hepáticos, lobo direito, lobo médio e lobo esquerdo, contudo, não se observa lobulação hepática. O parênquima está constituído por hepatócitos organizados em arranjo tubular, cercados por sinusóides. As observações ultraestruturais evidenciaram vacuolização citoplasmática nos hepatócitos dos animais alimentados com teor mais elevados de lipídios ( $R_2$  35/8,5 e  $R_4$  40/8,5). Entretanto, não se pode afirmar que estas características sejam prejudiciais, considerando o período de duração do presente experimento.

## REFERÊNCIAS

- BAIC, D.; LADEWSKI, B. G. e FRYE, B. E. Quantitative Ultrastructural Studies of Hepatocytes from Fed and Starved Frogs J. EXP. ZOOL., 210: 381-406, 1979.
- BERTOLUCCI, B.; VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BOMBONATO, M. T. S. Light microscopy and ultrastruture of the liver of *astyanax altiparanae* garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) Acta Sci. Biol. Sci. Maringá, v. 30, n.1, 2008 (prelo).
- BROWN JR., G.W. The metabolism of amphibia. In: MOORE, J.A. (Ed.) *Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press. p.1-98, 1964.
- BRUSLÉ, J. & ANADON, G. G. *The Structure and Function of Fish Liver*. In: Fish Morphology. Science Publishers, 1996. pp 77-93.
- COSTA, C.L.S. Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro (*Rana catesbeiana*), no sistema anfigranja. Viçosa, MG: UFV, 1992. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- FIGUEIREDO, M. R. C., LIMA, S. L., AGOSTINHO, C. A., BAETA, F. C. Efeito da Temperatura e do Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor de Rã-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) Rev. Bras. Zootec. vol.30, n.3, Viçosa May/June 2001

HAMPTON, J. A.; MCCUSKEY, P. A.; MCCUSKEY, R. S. & HINTON, D. E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Rec.*, 213:166-75, 1985.

HIPOLITO, M.; LEME, M. C. M.; BACH, E. E. Lesões anátomo-histopatológicas em rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) associadas à deterioração da ração. *Arq. Inst. Biol.*, v. 68, n. 1, p. 111-114, 2001.

HIPOLITO, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; BACH, E. E. Aspectos bioquímicos em fígado de rãs -touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, n. 2, p.147-153, 2004.

PASANEN, S., KOSKELA, P. 1974. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. in Northern Finland. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47(A):635-654

SEIXAS FILHO, J. T.; HIPOLITO, M. ; Martins, A.M.C.R.P.F. ; SILVA, L. . Alterações histopatológicas em girinos de rã-touro *Rana catesbeiana* SHAW, 1802 alimentados com rações comerciais de diferentes níveis de proteína bruta.. In: 19ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 2006, São Paulo. O Biológico, Suplemento 2. São Paulo : I. Biológico, 2006. v. 68.

SPORNITZ, U. M. 1975 Studies on liver of *Xenopus laevis*.I. The ultrastruture of the parenchymal cell. *Anat. Embryol.*, 146:245.

STÉFANI, M. V.; NAKAGHI, L. S.;URBINATI, E.C. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIIS DO FÍGADO DA RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) SUBMETIDA A

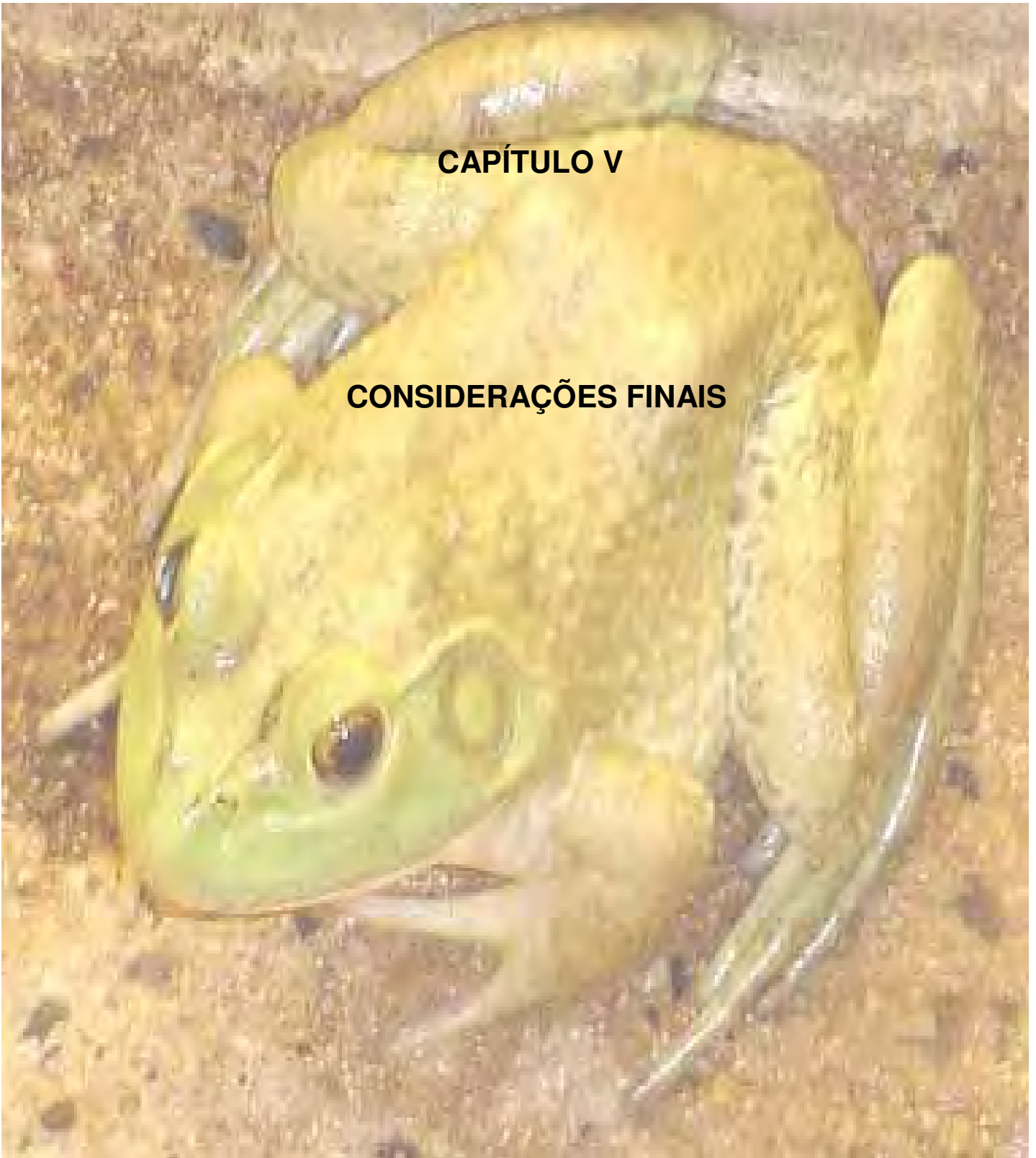
DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE CARBOIDRATOS *Ars. Veterinaria*, Jaboticabal, SP, 18, nº 1, 78-82, 2002.

UNDERHILL, R. A. *Laboratory Anatomy of the Frog*. Wm. C. Brown Company Publishers, 1972, 34p.

VICENTINI, A. C.; FRANCESCHHINI-VICENTINI, I. B.; BOMBONATO, M.T.S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S.G.; SANTOS, A.S. Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Morphol.*, v. 23, n. 3, p. 211-16, 2005.

**CAPÍTULO V**

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**



## Considerações Finais

Considerando que o desempenho, parâmetros metabólicos e hematológicos dos animais não foram influenciados pelos diferentes níveis de carboidratos e lipídios utilizados nas rações; e ainda pelo fato dos estudos morfológicos não evidenciarem alterações drásticas na estrutura dos hepatócitos, sugerimos a utilização da ração (R<sub>3</sub>), balanceada com 40% de carboidratos e 4,5% de lipídios, levando assim a uma redução dos níveis de proteína na dieta e conseqüentemente diminuindo o custo da ração.