

## EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS NA COMPOSIÇÃO LEUCOCITÁRIA DO SANGUE DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*RANA CATESBEIANA*)

Luis Ricardo Romero Arauco<sup>1</sup>, Marta Verardino De Stéfani<sup>2</sup>, Laura Satiko Okada Nakaghi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Acuicultura de la UNESP-CAUNESP. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900. <sup>2</sup>CAUNESP, Departamento de Zootecnia, FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo. <sup>3</sup>CAUNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo. Autor para correspondência: Luis Ricardo Romero Arauco, [arrolui@yahoo.es](mailto:arrolui@yahoo.es).

**Resumo:** Foram utilizados 1400 girinos, distribuídos em 20 tanques experimentais com 70 L de água, na densidade de um girino por litro. Foi misturado à ração comercial própolis nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %. O arraçoamento foi quatro vezes ao dia. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. No final do experimento, foi colhido o sangue do vaso caudal, de cinco girinos de cada repetição. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas pelo método de Rosenfeld (1947), em microscopia de luz. Foram contadas 100 células por lâmina. O grupo leucocitário influenciado pela própolis ( $P < 0,05$ ) foram os monócitos, que nas doses de 0,2 e 0,5 %, apresentaram as maiores porcentagens, diferindo do grupo controle e daquele de dose 1,5 %. Os linfócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

**Palavras chaves:** sangue, ranicultura, contagem diferencial de leucócitos.

## EFFECTO DEL EXTRACTO HIDRO ALCOHÓLICO DE PROPOLEO EN LA COMPOSICIÓN LEUCOCITARIA DE RENACUAJOS DE RANA TORO (*RANA CATESBEIANA*)

**Resumen:** Se utilizaron 1400 renacuajos, distribuidos en 20 tanques experimentales con 70 L de agua, a una densidad de un renacuajo por litro. Fue mezclada con el alimento comercial propóleo en las concentraciones de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %. La alimentación fue dada cuatro veces al día. Fue utilizado un diseño experimental enteramente al acaso con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Al final del experimento, fue recogido del vaso caudal sangre, de cinco renacuajos, de cada repetición. El conteo diferencial de leucócitos fue realizado en extensiones teñidas por el método de Rosenfeld (1947), en microscopia de luz. Fueron contadas 100 células por porta objeto. El grupo leucocitário influenciado por el propóleo ( $P < 0,05$ ) fueron los monócitos, que en las dosis de 0,2 e 0,5 %, presentan los mayores porcentajes, diferenciándose del grupo testigo y del que tenía concentración de 1,5 %. Los linfocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos no presentaron diferencia estadística entre los tratamientos.

**Palabras claves:** sangre, ranicultura, conteo diferencial de leucocitos.

## EFFECT OF THE PROPOLIS HIDROALCOHOLIC EXTRACT IN THE COMPOSITION LEUCOCYTARY IN THE BLOOD OF BULLFROG TADPOLES (*RANA CATESBEIANA*)

**Abstract:** Were used 1,400 tadpoles, distributed in twenty experimental tanks with 70 liters of water, in the density of one tadpole per liter. The commercial ration was mixed with propolis in the concentrations of 0.0; 0.2; 0.5; 1.0; and 1.5 %. The feeding was four times by day. Were used a completely randomized design with five treatments and three repetitions. In the end of the experiment, it was picked the blood of the vase flow, of five tadpoles of each repetition. The differential counting of leucocytes was accomplished in red-faced extensions by the method of Rosenfeld (1947), in light microscopia. They were counted 100 cells for sheet. The leucocyary

group influenced by the propolis ( $P < 0,05$ ) were the monocytes, that in the doses of 0.2 and 0.5 %, presented largest percentage, deferring of the control group and 1.5 %. The lymphocytes, basophils, neutrophils, eosinophils didn't present statistical difference among the treatments.

Key words: blood, frogculture, diferencial conting of leucocytes.

## INTRODUÇÃO

Na maioria dos ranários comerciais observa-se a ocorrência de mortalidade de girinos relacionada com vários fatores, tais como: manejo, instalações inadequadas, deficiência alimentar, má qualidade da água e doenças provocadas por bactérias e fungos. Conhecer as modificações fisiológicas dos animais através do leucograma facilita a orientação do diagnóstico de doenças, desde que a taxa de leucócitos possa ser comparada com seu adequado valor de referência. A morfologia dos leucócitos de anfíbios é amplamente estudada usando microscopia de luz (Cannon *et al.*, 1987).

O aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos pode ser induzida pela liberação de patógenos mortos ou de seus produtos (Roitt *et al.*, 1998) assim como da aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes (Siwicki *et al.*, 1998). A própolis tem se demonstrado efetiva contra bactérias gram positivas, fungos e pode também agir como promotor de crescimento e imunoestimulante (Sforcin *et al.*, 2004).

A própolis é um produto de origem vegetal, oriunda de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas de brotos de flores, exudatos de plantas, e modificadas na colméia por adição de secreções salivares e cera (Pinheiro-Filho, 1998). É utilizada pelas abelhas na proteção da colméia contra o ataque de outros insetos e a proliferação de microorganismos, incluindo fungos e bactérias (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995). De acordo com Marcucci (1995) já foram detectados mais de 50 flavonóides na própolis, entre os quais compostos pertencentes aos grupos dos polifenóis vegetais, ácidos aromáticos e oléicos.

A melhora observada no desempenho dos animais tratados com extrato de própolis em suas dietas pode ser consequência da melhora nas respostas imunológicas dos mesmos, após o consumo de própolis. Perez (1989), estudando a dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos, observou que doses mais altas sugerem uma influência inibitória e as mais baixas mostraram melhores resultados, refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos. Sforcin (1996) verificou que a atividade das células natural “killer” foi elevada nos grupos tratados com própolis, revelando sua ação imunomoduladora.

Scheller *et al.* (1977) e Hollands *et al.* (1991) não observaram reação alérgica alguma à própolis em coelhos, chinchila e camundongos tratados com extrato de própolis em suas dietas.

Entretanto, alguns autores têm relatado respostas exageradas ou inapropriadas do sistema imunológico frente à administração de própolis. Estudos recentes têm demonstrado que algumas substâncias presentes na própolis podem combinar-se com proteínas do organismo e tornarem-se imunogênicas, produzindo o quadro de hipersensibilidade (Paulino, 1999).

O objetivo foi verificar possíveis alterações na composição leucocitária no sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) no estágio 42 de Gosner (1960), alimentados com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis na ração.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Instalações e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, no período de fevereiro a maio de 2003.

Foram utilizados 20 tanques experimentais, com capacidade de 100 litros, os quais permaneceram com 70 L de água. Os tanques tinham abastecimento individual e escoamento diretamente do fundo. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano.

### Material biológico

Foram utilizados 1400 girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, com peso médio de 0,08 g no estágio 26 de Gosner (1960), procedentes de uma mesma desova, oriundos do setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Os animais foram distribuídos nos 20 tanques experimentais, na densidade de 1 girino/L de água.

### Procedência da própolis

A própolis foi adquirida da empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA, localizada em Ribeirão Preto-SP.

### Características do extrato hidroalcoólico de própolis

As características do extrato hidroalcoólico de própolis, fornecidas pela Apis Flora foram as seguintes:

Aspecto- líquido límpido, sem partículas em suspensão; Cor – Âmbar; pH - 5,35; Teor alcoólico - 56 %; Propriedade antioxidante - 8 segundos; Sólidos solúveis - 11 P/V %; Flavonóides totais - 5,45 mg/L.

### Preparo e fornecimento das dietas experimentais

Para a alimentação dos girinos foi utilizada ração comercial, farelada (Tabela 1), na qual foram adicionadas e misturadas manualmente diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5;1,0;1,5 %). Após esse procedimento, as rações foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 horas e, logo após, trituradas em liquidificador por dois minutos e estocadas em freezer.

**Tabela 1.** Composição percentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).

Nutrientes	%
Proteína Bruta (PB)	45,0
Extrato etéreo (EE)	9,0
Fibra bruta (FB)	6,0
Matéria mineral (MM)	3,0
Cálcio (Ca)	8,0
Fósforo (P)	1,0
Umidade	12,5

Premix: Vitamina A 12.000,00 UI; Vitamina D3, 3.400,00 UI; Vitamina E 150,00 mg; Vitamina K, 20,00 mg; Vitamina B1 (Tiamina) 30,00 mg; Vitamina B2 (Riboflavina) 30,00 mg; Vitamina B6 (piridoxina) 30,00 mg; Vitamina b12 30,00 mg; Niacina 150,00 mg; Pantotenato de Cálcio 78,75 mg; Ácido Fólico 8,12 mg; Biotina, 0,25 mg; Vitamina C 400,00 mg; Cloreto de Colina 1,00 g; Cobre 25,00 mg; Manganês 68,75 mg; Zinco 112,50 mg; Iodo 1,25 mg; Cobalto 0,75 mg; Selênio 0,30 mg; Antioxidante 125,00 mg; Fungistático 1.000,00 mg.

O arraçoamento foi a lanço, de modo uniforme, quatro vezes ao dia, observando-se o consumo para evitar sobras, de forma que a quantidade oferecida foi considerada como consumida (Utne, 1978). Antes da alimentação diária os tanques foram sifonados para a retirada dos dejetos e restos da alimentação anterior.

#### Avaliação da qualidade da água

No decorrer do experimento a temperatura da água dos tanques foi aferida diariamente com termômetro digital, e semanalmente realizou-se análise de água medindo-se o pH, condutividade elétrica (mediante Horiba), e oxigênio dissolvido (oxímetro Hach DO meter 16046).

#### Avaliação Hematológica

##### *Coleta de sangue*

A coleta de sangue foi realizada no fim do período experimental, nos girinos que estavam no estágio 42 da tabela de Gosner (1960). Para isso utilizou-se seringa de insulina heparinizada, onde uma alíquota de sangue de aproximadamente 10 µL foi colhida por punção do vaso caudal, a qual foi depositada diretamente sobre lâmina e realizada a extensão. Foi coletado sangue de cinco girinos de cada repetição para todos os tratamentos, e as lâminas foram feitas em duplicata.

##### *Contagem diferencial de leucócitos*

Para a contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) foram feitas extensões sanguíneas com o sangue coletado (10 µL), que após secagem, foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947), examinadas sob microscopia de luz, com objetiva de 40x.

Foram analisadas 15 lâminas em cada tratamento, sendo cinco lâminas por repetição, onde cada lâmina representou um animal. Foram contados 100 leucócitos por lâmina, a fim de

verificar a frequência de cada componente celular de interesse. As células foram classificadas em cinco categorias (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, e monócitos) conforme sua morfologia e visualização ao microscópio, tomando-se por base os critérios adotados por Storer e Usinger (1979), Duellman & Trueb (1986), Turner (1988), Dias (1992), Ferreira (2002), Coppo (2003), Fioranelli *et al.* (2004) e Fenerick Jr. (2004).

### Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (dietas com concentrações de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis) e três repetições. A análise dos dados da Contagem Diferencial de Leucócitos foi realizada através da análise de variância, seguida pelo Teste de Tukey, para verificar as diferenças estatísticas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Características hidrológicas

A temperatura média da água dos tanques durante o período experimental variou de  $28,27 \pm 0,45$  a  $28,77 \pm 0,34$  °C. Esses valores estão dentro da faixa considerada ótima para cultivo de girinos ( $24,5$  a  $29,1$  °C), segundo Justo *et al.* (1985); Lima *et al.* (2003), Bambozzi *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (2004).

De maneira geral os parâmetros hídricos apresentaram-se relativamente constantes nos diferentes tratamentos.

Os teores médios de oxigênio dissolvido variaram de  $5,75 \pm 0,33$  a  $6,06 \pm 0,67$  mg/L estando dentro do limite aceitável para o cultivo de organismos aquáticos (  $6,5$  a  $6,9$ ) segundo Culley Jr. (1981).

Os valores médios de pH variando de  $7,3 \pm 0,17$  a  $7,6 \pm 0,06$ , também estão próximos ao valor recomendado para o cultivo de girinos de  $7,4$  segundo Hayashi *et al.* (2004) e de  $7,96$  segundo Bambozzi *et al.* (2004).

A condutividade elétrica da água dos tanques experimentais variou de  $190,2 \pm 5,52$  a  $195,1 \pm 4,94$   $\mu\text{S/cm}$ .

### Contagem diferencial de leucócitos

O resultado da análise de variância dos diferentes tipos de leucócitos encontrado no sangue periférico de girinos de rã-touro encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias dos diferentes tipos leucocitários encontrados no sangue periférico de girinos de rã-touro.

		Variável				
		Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Monócitos (%)
F para Tratamentos		8,48 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	0,91 <sup>NS</sup>	2,99 <sup>NS</sup>	11,79 <sup>**</sup>
CV (%)		6,48	53,94	33,92	25,53	45,61
Médias	T1 (0,0)	72,13	6,07	11,03	10,67	0,07 b
	T2 (0,2)	73,53	3,27	8,06	10,07	5,07 a
	T3 (0,5)	65,93	4,07	11,53	10,53	7,87 a
	T4 (1,0)	72,86	5,67	11,53	7,26	2,7 ab
	T5 (1,5)	79,93	4,47	8,13	6,93	0,53 b

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 de 1 % de probabilidade.

T5 = 0,0 % de própolis; T2 = 0,2 % de própolis; T3 = 0,5 % de própolis ; T4 = 1,0% de própolis ; T5= 1,5 % de própolis.

Os valores médios das porcentagens de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos do sangue periférico de girinos de rã-touro não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pelos diferentes níveis de própolis na ração. Nos diferentes tratamentos, a quantidade média de linfócitos no sangue dos girinos variou de 65,93 a 79,93 % (Tabela 2), sendo o grupo predominante, o mesmo observado por Fenerick Jr. (2004) que obteve valores próximos de linfócitos no sangue de rãs-touro adultas (69,62 a 72,02 %).

Como na literatura não foi encontrado trabalhos com girinos, os resultados foram comparados com rãs adultas.

Os resultados obtidos diferem daqueles de Wang & Chang (1994) que obtiveram para rãs adultas em cativeiro 52,77 % de linfócitos; de Szubartowska *et al.* (1990) que obtiveram para *Rana esculenta* adulta 52,87 % de linfócitos; Fioranelli *et al.* (2004) 26,8 %; Coopó (2003) 16,3 a 39,8 % de linfócitos em *R. catesbeiana* adulta e Ferreira (2002) que obteve para girinos de rã-touro 94,22 % de linfócitos em 48 horas e 89,84 % em 312 horas no período de amostragem.

A porcentagem de neutrófilos no sangue dos girinos, nos diferentes tratamentos, variou de 3,27 a 6,07 % (Tabela 2), valores próximos aos obtidos por Ferreira (2002), 2,08 a 5,47 % e Fenerick Jr. (2004) que obteve valores de 2,82 a 3,09 % de neutrófilos no sangue de rãs-touro adultas; e inferiores aqueles obtidos por Szubartowska *et al.* (1990) que observaram para *Rana esculenta* adulta 19,10 % de neutrófilos; Wang & Chang (1994) que encontraram valores de 29,87 % de neutrófilos em rãs-touro adultas; Coopó (2003) 40,0 a 86,1 % e Fioranelli *et al.*, (2004) 60,9 % de neutrófilos em *Rana catesbeiana* adulta.

De acordo com Ranzani-Paiva (1995) a diminuição da porcentagem de neutrófilos geralmente é citada na literatura como consequência de alguma enfermidade.

As porcentagens de basófilos e eosinófilos do sangue dos girinos variaram de 6,93 a 10,67 % e de 8,06 a 11,53 % respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos (Tabela 2). Esses resultados foram superiores aqueles

encontrados por Wang & Chang (1994), 2,66 % de basófilos e 4,03 % de eosinófilos para rã-touro adultas. Szubartowska *et al.* (1990) obtiveram para *Rana esculenta* adulta valores próximos de eosinófilos (13,13 %) e 2,03 % de basófilos. Fioranelli *et al.* (2004) 3,5 % de basófilos e 5,8 % de eosinófilos. Coopo (2003), 0,0 a 6,0 % de basófilo e 2,0 a 11,9 % de eosinófilos em *Rana catesbeiana* adulta. Fenerick Jr. (2004) observou no sangue de rã-touro adulta valores de 14,29 a 16 % de basófilos e de 1,53 a 1,85 % de eosinófilos. Ferreira (2002) obteve para girinos de rã-touro valores de 2,82 a 3,09 % de basófilos e 0,74 a 1,22 % de eosinófilos em 48 e 312 horas no período de amostragem.

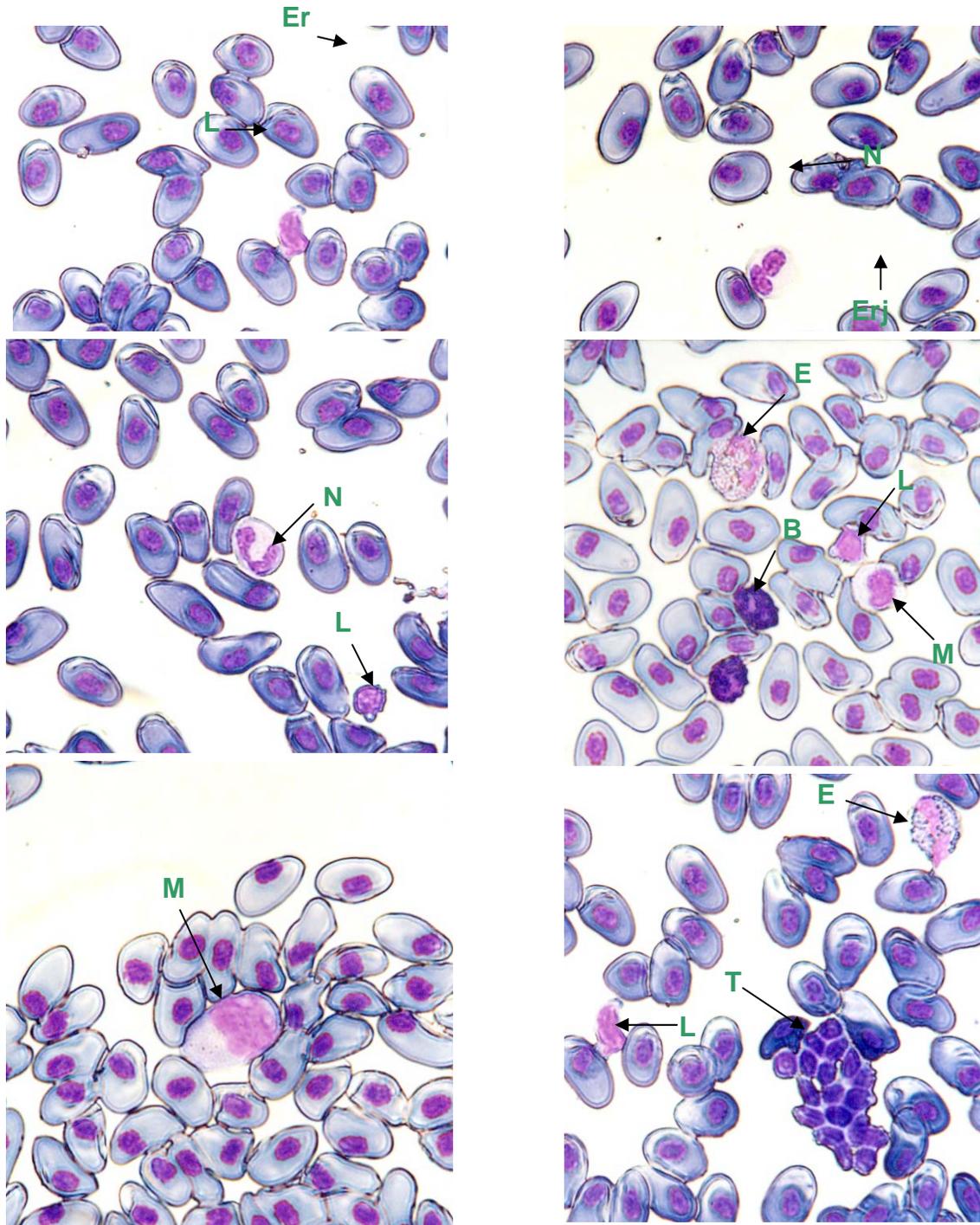
Somente houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) na porcentagem de monócitos no sangue dos girinos de rã-touro (Tabela 2), onde observou-se que girinos que receberam a dose mais alta de extrato hidroalcoólico de própolis (T5) e aqueles que não receberam (T1) apresentaram a menor porcentagem desse grupo leucocitário no sangue.

Orsi *et al.* (2000) indicaram que doses altas de própolis (3 a 10 mg %) incrementou a produção de monóxido de nitrogênio, apresentando efeito imunomodulador de macrófagos em ratos e doses baixas efeito imunoestimulante. Orsolich & Basic (2003) indicaram que derivados de própolis solúveis em água apresentaram propriedades imunoestimulantes de linfócitos e macrófagos em ratos.

A mudança na composição leucocitária observada nos animais pode ser conseqüência de uma melhora na resposta imunológica dos mesmos após o consumo de própolis, pois, segundo Perez (1989), estudando a dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos, observou que doses mais altas sugerem uma influência inibitória e as mais baixas mostraram melhores resultados, refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos. Sforcin (1996) verificou que a atividade das células natural "killer" foi elevada nos grupos tratados com própolis, revelando sua ação imunomoduladora.

Wang & Chang (1994) obtiveram 10,67 % e Szubartowska *et al.* (1990) obtiveram 12,87 % de monócitos no sangue de *Rana esculenta* adulta, valor superior aos do presente trabalho. Ferreira (2002) obteve valores de 0,14 e 0,38 % de monócitos no sangue de girinos de rã-touro em 48 e 312 horas do período de amostragem, respectivamente. Fenerick Jr. (2004) observou no sangue de rãs-touro adultas 0,11 a 0,53 % de monócitos. Fioranelli *et al.* (2004) 2,9 % e Coopo (2003) 1,0 a 5,0 % de monócitos em *Rana catesbeiana* adulta, valores próximos aos do presente trabalho.

Os tipos celulares encontrados no sangue periférico dos girinos de rã-touro encontram-se na Figura 2. Os diferentes tipos leucocitários foram: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, os mesmos descritos por Storer e Usinger (1979), Duellman & Trueb (1986), Turner (1988), Dias (1992), Ferreira (2002), Coppo (2003), Fioranelli *et al.* (2004) e Fenerick Jr. (2004).



**Figura 1.** Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de *R. catesbeiana* exposto a 0,5 % de extrato hidroalcoólico de própolis L = Linfócito, N = Neutrófilo, B = Basófilo, Er = Eritrócito, Erj = Eritrócito Jovem E = Eosinófilo, M = Monócito, T = Trombócito, coloração Rosenfeld. Aumento 400x.

## CONCLUSÕES

Os linfócitos são os leucócitos mais frequentes no sangue periférico de anuros larvais. Apresentam núcleo arredondado com cromatina densa e citoplasma basófilo, algumas vezes

apresentando microvilosidades (projeção citoplasmática). Os neutrófilos frequentemente possuem núcleo segmentado, apresentam citoplasma ocupado por extensas áreas de retículo endoplasmático granular bem desenvolvido. Os basófilos são comuns no sangue periférico de girinos, particularmente em *R. catesbeiana*, e mostram núcleos sem segmentação e citoplasma com exuberantes grânulos basofílicos. Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma. 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.

A porcentagem de monócitos no sangue periférico de girinos de rã-touro foi influenciada significativamente pela adição de extrato hidroalcoólico de própolis na ração, apresentando possivelmente efeito imunoestimulante nas doses mais baixas (0,2 e 0,5 %).

Nos demais grupos leucocitários não houveram alterações significativas, sendo os linfócitos o grupo predominante.

## REFERÊNCIAS

- BAMBOZZI, C.A., J. TEIXEIRA DE SEIXAS, L.A. THOMAZ, & M.Y. OSHIRO. 2004. Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). R. Bras. Zootc. Viçosa, 33 (1): 1-17.
- CANNON, S.M., H.W. SAMPSON, & E.D. KAPES. 1987. The blood leukocytes of *Bufo marinus* a light, phase-contrast, and histochemical study. Can. J. Zool., 65: 1445-1453.
- COOPO, J.A. 2003. El médio interno de la rana toro *Rana catesbeiana*, Shaw 1802. Rev. Vet., Corrientes. 14(1):25-41.
- CULLEY, Jr. D.D. 1981. Have use tamed the caner on bullfrog culture. *Aquarien. Maga*, Atuttsit 7(3):20-24.
- DIAS, J.L.C. 1992. 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). Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DUELLMAN, W. & L. TRUEB. 1986. Biology of amphibians. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- FENERICK, Jr. J. 2004. Efeito de diferentes tipos de rações comerciais sobre o desempenho e parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*. 2004. Dissertação (Mestrado) -Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- FERREIRA, C.M. 2002. Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FIORANELLI, S.A., N.B. COPPO, & J. COPPO. 2004. Los glóbulos blancos de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae) Variación según sexo, edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste, corrientes Argentina, Acesso em: 16 de maio 2004. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.pdf>.
- GHISALBERTI, E.L. 1960. Propolis: a review. *Bee world*, Cardiff, v. 60, n. 1, p. 59-84, 1979.
- GOSNER, K. L. 1991. A simplified table, for staging anura embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Jonson City. 16 (2): 185-190.
- HOLLANDS, I. *et al.* 1991. Demostración ultraestructural del efecto citohepatoprotector del propoleo. *Rev. Cubana Cienc. Vet.*, Habana, v. 22, n. 2, p. 85-90.

- JUSTO, C.L., L.A. PENTEADO & D. FONTANELLO. 1985. Ganho de peso de girinos de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) em criação intensiva, sob diferentes densidades populacionais. *Bol. Inst. Pesca., São Paulo.* 12 (3): 31-37.
- LIMA, S.L., A.P. CASALI, C. A. & AGOSTINHO. 2003. Desempenho zootécnico e tabela de alimentação de girinos de ra-touro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. *R. Bras. Zootc., Viçosa* 32 (3): 512-518.
- ORSI, O.R., S.R.C. FUNARI, A.M.V.C. SOARES, S.A. CALVI, S.L. OLIVEIRA, J.M. SFORCIN, & V. BANKOVA. 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. Botucatu, *J. Venom. Anim. Toxin*, Botucatu. 6 (2): 205-219.
- ORSOLIC, N. & I. BASIC. 2003. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacology*, USA. 84 (2): 265-273.
- PAULINO, N. 1999. Reação de hipersensibilidade à própolis. *Revista da Universidade de Franca, Franca.* (7):16.
- PEREZ, I. 1988. Influencia de las dosis parenteral de propoleo sobre la respuesta imune (RES), en conejos em 1989 *en: Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humana y animal*, 1., 1988. Varadero, Matanzas. *Memórias.* Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989: 230-233.
- PINHEIRO-FILHO, R. 1995. *Criação de abelhas*. 2. ed. Cuiabá: SEBRAE, 1998. RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. *B. Inst. Pesca, São Paulo.* 22 (1): 23-40.
- ROITT, I., J. BROSTOFF & D. MALE. 1998. *Immunology*. 5th. ed. London: Mosby.
- ROSENFELD, G. 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clinica. Nova combinação dos componentes do May - Grunwald e do Giensa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan, São Paulo.* (20):329-334.
- SHELLER, S., J. TUSTANOWSKI, E. FELUS & A. STOJKO. 1977. Biological properties and clinical application of propolis. VII. Investigation of immunogenic properties of ethanol extrat of propolis. *Arzneimi-Forsch. drug Res., Aulendorf,* (27):12.
- SFORCIN, J.M. 1996. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladoras e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico dos ratos. Botucatu, SP. 1996. 56p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Botucatu.
- SFORCIN, J.M., R.O. ORSI & V. BANKOVA. 2004. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on Bactericidal Activity of Macrophages Against *Salmonella Typhimurium*. *Microbiol. Immunol.* Bunkajo-Ru. Acesso em: 16 maio 2004. <http://www.immuno2004.org/onlineabstracts/982.html>.
- SIWICKI, A.K., M. MORAND, P. KLEIN, M. STUDNICKA, & E. TERECH-MAJEWSKA. 1998. Modulation of non-specific deference mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Vet.* 67 (4):323-328.
- STORER, T.I.; USINGER, R.L. 1979. *Zoologia geral*. São Paulo: Companhia Editora Nacional.
- SZUBARTOWSKA, E. , K. GROWYSZ-KALKOWSKA, & K. WOJCIK. 1990. Behaviour of the Formed blood elements in *Rana esculenta L.* after repeated contacted of the Animal with a Therapeutic dose of foschlor. *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, Lublin, Poland. 45 (6): 796-803.
- THUVANDER, A., L. NORRGREN & C. FOSSUM. 1987. Phagocytic the blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by cytometry and electron microscopy. *J. Fish Biol*, London. 31(2): 197-208.
- UTNE, F. 1978. Standart methods and therminology in finfish nutrition, em 1978. *In: SIMPOSIUM OF FINFISH OF NUTRITION AND FEED TECHNOLOGY*, 1978, Hamburg. Proceedings. Hamburg: EIFAC/FAO 14.
- WANG, J.H., & M.H. CHANG. 1994. Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fish.*, Jaipei. (46): 69-87.