

RESPOSTA HEPÁTICA À SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM RÃS-TOURO SOB CONDIÇÃO DE ESTRESSE

Jorgina Juliana Gradisse FREITAS¹; Erna Elisabeth BACH²; Isabella Cristina Antunes da Costa BORDON³; Ana Maria Cristina Rebello Pinto da Fonseca MARTINS⁴; Marcio HIPOLITO⁴; Cláudia Maris FERREIRA⁵

RESUMO

Avaliou-se o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico (*Bacillus subtilis*) e com betaglucana em rãs-touro submetidas à condição de estresse por adensamento. Os animais foram distribuídos nos tratamentos: T1: 100 animais m⁻² (controle); T2: 236 animais m⁻²; T3: 236 animais m⁻², suplementados com probiótico; e, T4: 236 animais m⁻², suplementados com betaglucana. Avaliou-se sobrevivência, ganho em peso (GP) e a condição bioquímica e histopatológica dos fígados. Não foi observada diferença estatística para a sobrevivência ($P>0,05$), porém foram observadas diferenças significativas para o GP aos 30 dias, entre os tratamentos não suplementados e os suplementados ($P<0,001$). As avaliações bioquímicas mostraram condições muito próximas entre os animais do tratamento controle e aqueles suplementados com betaglucana. A análise histopatológica mostrou lesões e rarefação citoplasmática em 100% das amostras, sugerindo deficiência proteica. A betaglucana mostrou efeito hepatoprotetor, reduzindo os efeitos do estresse sobre o fígado de rã-touro, porém o probiótico *Bacillus subtilis* não apresentou o mesmo potencial.

Palavras chave: Fígado; probiótico; betaglucana; *Bacillus subtilis*; *Agaricus blazei*; *Lithobates catesbeianus*

LIVER RESPONSE TO DIETARY SUPPLEMENTATION IN BULLFROG UNDER STRESS CONDITION

ABSTRACT

Evaluate the hepatoprotective effect of dietary supplementation with the probiotic (*Bacillus subtilis*) and with beta-glucan on bullfrog in stress of high stocking density. Animals were assigned in treatments: T1: 100 animals m⁻² (control); T2: 236 animals m⁻²; T3: 236 animals m⁻² supplemented with probiotic; T4: 236 animals m⁻² supplemented with beta-glucan. Evaluated survival, weight gain (WG) and the condition of liver biochemistry and histopathology. There was no statistical difference in survival between treatments ($P>0.05$), but were observed significant differences for WG at 30 days, between not supplemented treatments and supplemented treatments ($P<0.001$). Biochemical analysis showed conditions very near among animals of control treatment and animals supplemented with beta-glucan. Histopathological analysis revealed lesions and cytoplasmic rarefaction in 100% of the samples, suggesting protein deficiency. The beta-glucan reduced the effects of stress in bullfrog and has shown hepatoprotective effect, but the probiotic *Bacillus subtilis* was not demonstrating the same effect.

Keywords: Liver; probiotic; beta-glucan; *Bacillus subtilis*; *Agaricus blazei*; *Lithobates catesbeianus*

Nota Científica: Recebida em 03/05/2013 – Aprovada em 20/01/2014

¹ Programa de Pós-graduação. Instituto de Pesca. e-mail: jojgf@bol.com.br

² Universidade Nove de Julho. Av. Dr. Adolpho Pinto, 109 – CEP: 01156-050 – São Paulo – SP – Brasil. e-mail: ernabach@gmail.com

³ Programa de Pós-graduação. Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear – IPEN. Av. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – CEP: 05508-000 – São Paulo – SP – Brasil

⁴ Instituto Biológico. Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 – CEP: 04014-002 – São Paulo – SP – Brasil. e-mail: crisfm@biologico.sp.gov.br; hipolito@biologico.sp.gov.br

⁵ Instituto de Pesca. Av. Francisco Matarazzo, 455 – CEP: 05001-970 – São Paulo – SP – Brasil. e-mail: claudia@pesca.sp.gov.br (autora correspondente)

INTRODUÇÃO

O estresse representa uma condição na qual a homeostase do organismo é perturbada por estímulos estressores, que induzem respostas fisiológicas compensatórias e/ou adaptativas, a fim de capacitar o organismo a superar a situação que lhe é imposta, seja ela de origem ambiental ou orgânica, aguda ou crônica (WENDELAAR BONGA, 1997). Nos vertebrados, as respostas ao estresse são reguladas por glicocorticoides (GCs), sendo a corticosterona (CORT) o principal hormônio ligado a este processo em anfíbios (BELDEN *et al.*, 2005; DENVER, 2009). Uma das ações dos GCs é mobilizar estoques de energia e disponibilizá-la para que o organismo possa superar os períodos de estresse (ROMERO, 2002).

O fígado dos anfíbios realiza diversas funções fisiológicas, incluindo metabolismo energético e proteico, síntese de uréia, secreção de sais biliares, biotransformação e detoxificação, respondendo a agentes tóxicos ou infecciosos de maneira similar aos demais vertebrados (CRAWSHAW e WEINKLE, 2000). O mesmo é capaz de manifestar sinais de desordem orgânica como deficiência nutricional, intoxicações, infecções ou parasitismo, através de alterações na sua estrutura celular, bioquímica e morfológica. Sob a ação de GCs, este órgão pode sofrer alterações importantes. Sendo assim, os métodos de diagnóstico através de análises hepáticas podem constituir ferramentas úteis na avaliação da ocorrência de enfermidades e estresse (HIPOLITO *et al.*, 2004).

Na aquicultura, a utilização de suplementos alimentares, como por exemplo, probióticos e betaglucanas, visa aumentar a produção, diminuindo a mortalidade de animais em decorrência do estresse, imunossupressão e enfermidades (DILUZIO, 1985; ROBERTSEN *et al.*, 1990; FRANÇA *et al.*, 2008). Os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, tem efeito imunomodulador (COPPOLA e GILTURNES, 2004), podendo promover diversos benefícios à saúde do hospedeiro. Betaglucanas são polímeros de polissacarídeos unidos por ligações $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ e $\beta(1-6)$, encontrados naturalmente como componentes de parede celular de plantas, algas, fungos e algumas bactérias. A esses compostos são atribuídos efeitos

imunoestimulante, antitumoral e hepatoprotetor (BARBISAN *et al.*, 2002; FUJIMIYA *et al.*, 1998; MIZUNO *et al.*, 1999). O uso de probióticos e de betaglucanas na aquicultura é inovador, e seu estudo tem mostrado resultados promissores (DIAS *et al.*, 2010; PLANAS e CUNHA, 1999).

Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana do fungo *Agaricus blazei*, em rãs-touro submetidas à condição de estresse por adensamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 440 animais após a metamorfose, com 45 dias de idade, e peso médio de $24,34 \pm 2,38$ g, adquiridos em ranário comercial. Os organismos foram transportados para o Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura, em São Paulo/APTA/SAA. Neste local foram aclimatados por cinco dias em sala com temperatura ambiente (aferida todos os dias) e fotoperíodo controlado (12:12h L:E). Após este período, os animais foram pesados em lotes de 10 indivíduos e distribuídos em 16 caixas de polipropileno ($0,47 \times 0,30 \times 0,17$ m) (BUENO-GUIMARÃES, 1999), inundadas com lâmina d'água de 0,03 m. Foi utilizada água da rede pública, dechlorada por aeração e repouso noturno, para o abastecimento e limpeza diária das caixas, realizada de forma rápida a fim de causar o mínimo de perturbação aos animais.

O experimento foi composto por quatro tratamentos com quatro réplicas simultâneas: Tratamento 1 (controle): densidade de estocagem 100 animais m^{-2} (FERREIRA *et al.*, 2002), sem suplementação alimentar; Tratamento 2: densidade de estocagem de 236 animais m^{-2} , sem suplementação alimentar; Tratamento 3: densidade de estocagem 236 animais m^{-2} , suplementado com probiótico comercial à base de *Bacillus subtilis* (Cepa C-3102, 10^9 UFC g^{-1}); Tratamento 4: densidade de estocagem 236 animais m^{-2} , suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol®, Cogumelos Valemar, 167 mg g^{-1} betaglucana, 40 mg betaglucana livre, 2,4 mg g^{-1} proteína, 0,2 mg g^{-1} fenol). Ambos os suplementos foram adicionados na proporção de 10 g kg^{-1} de ração. As densidades de 100 animais m^{-2} e 236

animais m⁻² equivalem, respectivamente, a 14 e 32 animais por caixa. O período experimental foi de 30 dias.

Os animais, previamente condicionados a se alimentar com ração oferecida manualmente, a mesma oferecida em ranários que adotam o sistema inundado de criação (FAO, 2012), foram alimentados (3% da biomassa) com ração comercial para peixes, extrusada (Nutripeixe TC45™ Purina. 45% Proteína Bruta, 14% Extrato Etéreo, 6% Fibra Bruta, 2,5% Cálcio, 1% Fósforo, 14% Cinzas, 21% Carboidratos, Vitamina C 300 mg, Energia Bruta 4180 kcal kg⁻¹), duas vezes ao dia. Os suplementos foram misturados à ração por aspersão de 2% de óleo vegetal, sempre no dia anterior ao seu oferecimento.

Foram avaliadas a sobrevivência (S) e o ganho em peso (GP) das rãs. Para a estimativa da sobrevivência, registrou-se as mortalidades diariamente, do início até o final da experimentação. Para o cálculo de ganho em peso, pesaram-se todos os animais das quatro réplicas de cada tratamento, calculando a média do ganho em peso por tratamento (GP = Peso final - Peso inicial).

Para as avaliações bioquímicas e histopatológicas dos fígados foram coletadas, aleatoriamente, amostras de oito animais no Momento Zero (MZ, correspondente ao primeiro dia do experimento) e de outros 16 animais ao final do experimento (quatro por tratamento). Os animais foram eutanaziados em solução de benzocaína (3 g L⁻¹) e, em seguida, procedeu-se a coleta dos fígados. Parte das amostras de fígados coletadas (50%) foi mantida sob congelamento para análise bioquímica, e parte fixada em formalina 10% em tampão fosfato pH 7,4 para análise histopatológica.

Nas análises bioquímicas, foi preparado o pó cetônico dos fígados por meio da extração com acetona resfriada (-18°C), sendo, em seguida, filtrado em papel-filtro. O pó cetônico resultante foi seco em dessecador e conservado sob congelamento para posterior análise. A ressuspensão foi realizada no momento de cada análise, utilizando tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e 0,25 % de ácido cítrico (HIPOLITO *et al.*, 2004).

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al.*,

1951), expressa em mg SAB mL⁻¹ (SAB = Soro-Albumina Bovina), e a quantificação de fenóis foi realizada através do reativo de Folin-Ciocalteu, expressa em mg ácido clorogênico (SWAIN e HILLIS, 1959). As atividades enzimáticas *in vitro* da peroxidase e da polifenoloxidase foram determinadas em espectrofotômetro computadorizado. A atividade da peroxidase foi determinada medindo-se a variação de absorbância do tetraguaiacol formado na reação enzimática com comprimento de onda de 470 nm (MOERSCHBACHER *et al.*, 1986). A absorbância foi lida em 2 minutos e a atividade específica foi expressa como nKat mgSAB⁻¹ g⁻¹ de amostra (SOUTHERTON e DEVERALL, 1990). Para a atividade da polifenoloxidase, mediu-se a variação de ortoquinona formado na reação enzimática com comprimento de onda de 495 nm. A absorbância foi lida em 2 minutos e a atividade expressada como nKat mgSAB⁻¹ g⁻¹ de amostra (SRIVASTAVA, 1987). A dosagem de glicose nos fígados foi realizada segundo o método de Antrona baseado em DISCHE (1962), tendo sido os resultados expressos em mg g⁻¹.

Os cortes histológicos foram preparados por meio da fixação de amostras dos fígados em formalina a 10% tamponada pH 7,4, diafanização em xilol, inclusão em blocos de parafina, corte em micrótomo a 5 µm de espessura, montagem em lâmina de vidro, coloração em Hematoxilina-Eosina (GARTNER e HIATT, 1999) e observação ao microscópio ótico de transmissão de luz para avaliação histopatológica. Os resultados foram quantificados em porcentagem de ocorrências de cada tipo de lesão observada por número de lâminas analisadas.

Com exceção da sobrevivência e da lesão histológica, os dados das demais variáveis foram transformados em log (x+1) para atender a premissa de normalidade. Foi realizada a análise de variância com dois fatores (tratamento e tempo) (ANOVA TWO WAY), com inclusão dos dados do Momento Zero, seguida do teste *a posteriori* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando P≤0,05 (ZAR, 1999). Esta análise permite avaliar o impacto que estes fatores provocam na variável de interesse. Os fatores tratamento e tempo podem influir na variável dependente de forma isolada, denominados efeitos principais, e de forma

combinada, efeito de uma combinação específica dos fatores tratamento e tempo. Logo, por meio de um planejamento fatorial, pretendeu-se que a cada tentativa completa, ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis fossem investigadas. Apenas a variável peroxidase não foi tratada com esta análise, sendo realizado o teste de t de Student para a comparação dos dados do Momento Zero e do Tratamento 2. Os demais tratamentos desta variável não promoveram dados para comparação.

RESULTADOS

Durante o período experimental, a temperatura média foi $23,05 \pm 1,00^\circ\text{C}$, não apresentando variações que pudessem interferir nos resultados obtidos (BRAGA e LIMA, 2001).

Ao final do período experimental, não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de sobrevivência ($P > 0,05$), mas a ANOVA

demonstrou diferenças significativas com relação ao ganho em peso entre os animais que receberam ração não suplementada e os suplementados ($P < 0,001$) (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios de ganho em peso (g) e sobrevivência (%) de rês-touro nos distintos tratamentos, aos 30 dias de experimentação (n = 440).

Tratamento	Ganho em Peso (g)	Sobrevivência (%)
T1	$37,55 \pm 6,92$ a	$96,42 \pm 4,13$
T2	$28,46 \pm 5,18$ a	$98,43 \pm 1,81$
T3	$13,49 \pm 7,47$ b	$96,87 \pm 3,13$
T4	$16,79 \pm 1,56$ b	$98,43 \pm 1,81$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0,001$) entre as médias. T1 (controle): 100 animais m^{-2} , sem suplementação alimentar; T2: 236 animais m^{-2} , sem suplementação alimentar; T3: 236 animais m^{-2} , suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*; T4: 236 animais m^{-2} , suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

Tabela 2. Avaliações bioquímicas de amostras de fígados de rês-touro, *Lithobates catesbeianus*, coletados no Momento Zero (MZ) e ao final do experimento (n = 24).

Parâmetro	MZ*	Tratamentos (após 30 dias)			
		T1	T2	T3	T4
Proteínas (mg SAB mL ⁻¹)	$1,55 \pm 0,22$ a	$1,41 \pm 0,04$ a	$2,59 \pm 0,21$ b	$1,64 \pm 0,01$ a	$1,52 \pm 0,00$ a
Fenóis (mg Ác. Clorogênico)	$0,41 \pm 0,081$ a	$0,23 \pm 0,005$ b	$0,26 \pm 0,045$ b	$0,31 \pm 0,025$ a	$0,22 \pm 0,01$ b
Atividade da POD* (nKat mgSAB ⁻¹ g ⁻¹)	$8,63 \pm 5,06$ a	$0,00 \pm 0,00$	$2,40 \pm 0,20$ b	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Atividade da PPO* (nKat mgSAB ⁻¹ g ⁻¹)	$0,048 \pm 0,01$ a	$0,035 \pm 0,005$ b	$0,015 \pm 0,005$ c	$0,025 \pm 0,015$ d	$0,035 \pm 0,00$ b
Glicose (mg g ⁻¹)	$23,08 \pm 7,68$ a	$14,27 \pm 3,97$ b	$25,85 \pm 3,89$ c	$20,41 \pm 1,55$ a, c	$17,17 \pm 1,12$ d

As médias foram comparadas em esquema fatorial; letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) em relação ao MZ.

MZ: Momento Zero (antes da experimentação); POD: Peroxidase; PPO: Polifenoloxidase.

T1 (controle): 100 animais m^{-2} , sem suplementação alimentar; T2: 236 animais m^{-2} , sem suplementação alimentar; T3: 236 animais m^{-2} , suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*; T4: 236 animais m^{-2} , suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

* A atividade da enzima Peroxidase foi detectada em níveis próximos de zero e os dados comparados pelo teste t de Student.

Os resultados da quantificação de proteínas evidenciaram aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) para este parâmetro entre o Momento Zero (MZ) e T2 (sem suplementação alimentar). A produção de fenóis (degradação de

proteínas), também foi diferente estatisticamente entre MZ e 30 dias, mostrando que os dados dos MZ foram semelhantes apenas quando comparados com o T3 (tratamento suplementado com probiótico). A atividade da enzima

peroxidase (POD) no MZ foi de $8,53 \pm 5,06$ nKat mgSAB⁻¹ g⁻¹, porém, aos 30 dias de experimento, a mesma manteve-se em níveis consideráveis apenas em T2 (sem suplementação alimentar) ($2,40 \pm 0,20$ nKat mgSAB⁻¹ g⁻¹), apresentando-se em valores próximos de zero nos demais tratamentos. A atividade da enzima Polifenoloxidase (PPO) diminuiu significativamente entre MZ e 30 dias nos diferentes tratamentos. A glicose hepática apresentou diferença entre MZ e os tratamentos, sendo menor no T1 (controle) e T4 (suplementação com betaglucana) e mais elevada no T2 (sem

suplementação alimentar) e T3 (suplementação com probiótico) (Tabela 2).

Foram encontrados diversos tipos de lesões, tendo sido a rarefação citoplasmática detectada em 100% das amostras submetidas aos tratamentos (Tabela 3).

A Figura 1 mostra, para efeitos comparativos, cortes histológicos de tecido hepático retirados de animais em experimentação (Tratamento 1 (controle): 100 animais m⁻² e, Tratamento 2: 236 animais m⁻², sem suplementação alimentar).

Tabela 3. Alterações morfológicas (expressas em porcentagem) observadas por meio de análise histopatológica em amostras de fígados de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, coletados no Momento Zero (MZ) e ao final do experimento (n = 24).

Alteração	MZ	T1	T2	T3	T4
Rarefação citoplasmática	77,78%	75,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Melanomacrófagos	100,00%	25,00%	100,00%	66,67%	75,00%
Hepatite monolinfocitária	44,45%	*	33,34%	33,34%	50,00%
Áreas hemorrágicas	11,12%	*	66,67%	*	*
Pontos necróticos	11,12%	25,00%	66,67%	*	*
Granuloma	11,12%	25,00%	*	66,67%	25,00%
Leucócitos diversos	11,12%	25,00%	33,34%	66,67%	50,00%

O símbolo * indica ausência da alteração correspondente. T1 (controle): 100 animais m⁻², sem suplementação alimentar; T2: 236 animais m⁻², sem suplementação alimentar; T3: 236 animais m⁻², suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*; T4: 236 animais m⁻², suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

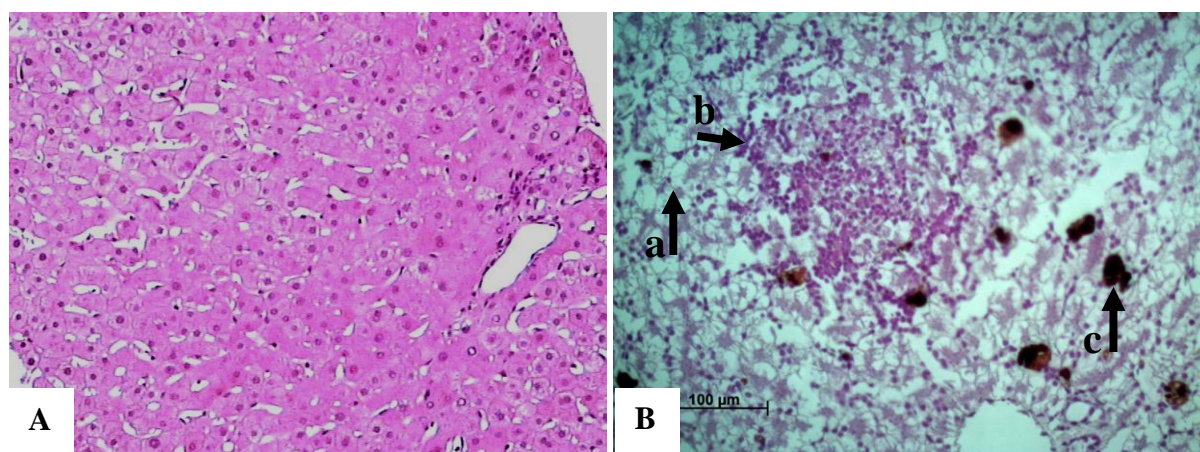


Figura 1. Corte histológico de tecido hepático de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. **A** - Fígado sem alterações histológicas (amostra obtida de animal do tratamento controle com 100 animais m⁻² - T1). **B** - Fígado com alterações histológicas apresentando rarefação citoplasmática (a), hepatite monolinfocitária (b) e, presença de melanomacrófagos (c) (amostra obtida de animal do tratamento com 236 animais m⁻², sem suplementação alimentar - T2). Escala 100 µm. Coloração Hematoxilina-Eosina.

DISCUSSÃO

HIPOLITO *et al.* (2004) e SEIXAS-FILHO *et al.* (2006) relataram problemas no desempenho das rãs-touro adulta e de girinos desta espécie, em virtude de disfunção hepática, devido à falta de proteínas de boa qualidade na alimentação, assim como ao desequilíbrio dos aminoácidos. Estes últimos autores observaram ainda em girinos, fígado apresentando sinais de desorganização, degeneração e vacuolização celular, indicando possível rarefação celular de proteínas, que pode ser indicativo de mau aproveitamento da proteína da ração.

Para uma perfeita condição de criação animal e o bom desempenho das funções hepáticas é primordial o estudo bioquímico dessas funções, sendo esta uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de enfermidades e mortalidade na rancultura. Como sob a ação de glicocorticóides (GCs), o fígado pode sofrer importantes alterações na sua estrutura celular, bioquímica e morfológica (HIPOLITO *et al.*, 2004), esperava-se que a suplementação com probiótico e betaglucana mostrasse efeito hepatoprotetor, reduzindo a ocorrência de lesões hepáticas.

Entre os grupos estudados, os tratamentos não suplementados (T1 e T2) apresentaram maior ganho em peso (GP) do que o observado nos demais grupos. DIAS *et al.* (2010) obtiveram um incremento no GP de rãs-touro tratadas com o mesmo probiótico, utilizado na mesma dosagem, em um período de 112 dias. Possivelmente, o período experimental utilizado neste trabalho não tenha sido suficiente para que fossem observados os efeitos do suplemento sobre esse parâmetro. Além disso, é possível que as frações solúveis dos polissacarídeos não-amiláceos (PNA) presentes nas betaglukanas componentes da parede celular de bactérias e fungos, que constituem fator antinutricional, tenham interferido na absorção e utilização de nutrientes (FRANCIS *et al.*, 2001; LEENHOUWERS *et al.*, 2006), afetando negativamente o GP nos grupos suplementados. De acordo com CAMPBELL (1983), essa interferência pode se dar através de efeitos como aumento da viscosidade do quimo no intestino, proteção do alimento contra o ataque de enzimas digestivas e aumento da taxa de passagem, entre outros, causados pelos PNA.

No fígado ocorrem atividades metabólicas diversas, entre elas o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Sob a ação dos glicocorticóides, o metabolismo pode sofrer alterações importantes. Segundo SILVEIRA *et al.* (2009), o cortisol atua de modo amplo no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, tendo efeito gliconeogênico, estimulando a biosíntese de glicose a partir de compostos de carbono não-glicídicos, como aminoácidos.

Comparando os resultados das análises bioquímicas dos fígados, verificou-se que os animais do grupo T4 (236 animais m², suplementado com betaglucana) apresentavam condição hepática muito próxima à do grupo controle, demonstrando efeito hepatoprotetor da betaglucana do fungo *Agaricus blazei*, concordando com as afirmações de BARBISAN *et al.* (2002) e HI *et al.* (2008).

É desejável o aumento da deposição de proteínas no fígado, enquanto o aumento na produção de fenóis indica o aumento na degradação das mesmas (SWAIN e HILLIS, 1959; SILVEIRA *et al.*, 2009). HIPOLITO *et al.* (2004) afirmam que a queda na quantificação de proteínas e o aumento na produção de fenóis indicam menor metabolismo proteico, o que pode estar relacionado à qualidade da ração utilizada em fazendas de criação, podendo-se, nesse caso, observar vacuolização celular (rarefação citoplasmática) em cortes histológicos do fígado. No presente estudo, observou-se que, ao final, a deposição de proteínas foi maior apenas em T2 (animais estressados por adensamento, mas sem suplementação alimentar), não sofrendo a influência dos suplementos. Já a degradação de proteínas, indicada pela produção de fenóis, diminuiu entre o início e o final do experimento, mantendo-se mais elevada em T3 (suplementado com probiótico).

Aos 30 dias do experimento, foi observada atividade da enzima peroxidase apenas em T2, com significativa diminuição na atividade da mesma entre o início e o final do experimento. Conforme reportado por HIPOLITO *et al.* (2007), esta enzima catalisa reações de oxidação, e a intensificação da sua atividade indica aumento na presença de radicais livres. COTRAN *et al.* (2000) afirmam que o desbalanceamento nutricional

pode ser a principal causa de lesões celulares, produzidas pela presença dos radicais livres, que provocam a fragmentação de proteínas e lipídeos nas membranas.

A polifenoloxidase sofreu diminuição significativa em sua atividade entre o Momento Zero e 30 dias, mantendo-se muito próxima entre os animais do grupo controle (T1) e animais suplementados com betaglucana (T4), e entre os animais estressados por adensamento e sem suplementação alimentar (T2) e os animais suplementados com probiótico (T3). Para HODGSON *et al.* (2004), a menor intensidade da atividade da PPO indica aumento na degradação de proteínas, podendo-se, conseqüentemente, observar o aumento na produção de fenóis.

Os GCs desempenham papel importante na mobilização de energia, especialmente durante o estresse. O aumento na dosagem desses hormônios estimula o catabolismo proteico e a gliconeogênese (EL NAGDY *et al.*, 1995; DENVER *et al.*, 2002; ROMERO, 2002), com aumento na degradação de proteínas hepáticas, e conseqüente produção de fenóis e glicose no fígado. Diante disso, pode-se explicar o aumento no teor de glicose hepática proporcional ao aumento da degradação de proteínas nos fígados nos animais estressados por adensamento e sem suplementação alimentar (T2) e os animais suplementados com probiótico (T3).

O estresse crônico pode promover danos fisiopatológicos nos sistemas que são atingidos por esse estímulo (MC EWEN, 2008), inclusive alterações morfológicas irreversíveis nas células hepáticas (HIPOLITO *et al.*, 2004). GUYTON e HALL (2002) afirmam que o fígado, quando apresenta severa disfunção decorrente de várias causas e por dias seguidos, pode levar a um quadro irreversível, com evidente diminuição da taxa do crescimento, e à morte.

A ração para peixes é usada na ricultura devido à inexistência de uma ração comercial específica para a rã-touro. Apesar da utilização da suplementação alimentar, que poderia ter melhorado a condição geral de saúde dos animais, o fornecimento da ração para peixes, possivelmente com perfil nutricional inadequado à espécie, pode ser uma das causas das lesões hepáticas observadas. Por outro lado, os

rancultores obtêm resultados razoáveis em suas fazendas de criação, ou seja, conseguem realizar a engorda dos animais até o ponto de abate, mesmo com prejuízos hepáticos. Ao mesmo tempo, procuram maximizar suas produções com a adição de suplementos alimentares à ração. Neste cenário, o probiótico *Bacillus subtilis* tem mostrado efeitos promissores na aquicultura, especialmente no estímulo do sistema imune, porém, na maioria das vezes, é necessário o uso prolongado deste aditivo para que os resultados sejam visíveis, o que não foi o caso do presente estudo. Já a betaglucana do fungo *Agaricus blazei*, com conhecido efeito imunomodulador, hepatoprotetor, e anticancerígeno mostrou, neste trabalho, um potencial redutor dos efeitos do estresse, além do seu efeito hepatoprotetor.

CONCLUSÃO

A betaglucana do fungo *Agaricus blazei* reduziu os efeitos do estresse provocados por alta densidade de estocagem sobre o fígado em rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, mostrando efeito hepatoprotetor para essa espécie. Entretanto, o probiótico *Bacillus subtilis*, não apresentou o mesmo efeito nas condições experimentais deste estudo.

REFERÊNCIAS

- BARBISAN, L.F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CAMARGO, J.L.V. 2002 Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 25-32.
- BELDEN, L.K.; MOORE, I.T.; WINGFIELD, J.C.; BLAUSTEN, A.R. 2005 Corticosterone and growth in pacific treefrog (*Hyla regilla*) tadpoles. *Copeia*, 2: 424-430.
- BRAGA, L.G.T. e LIMA, S.L. 2001 Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw 1802) na fase da recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(06): 1659-1663.
- BUENO-GUIMARÃES, H.M. 1999 *Avaliação da resposta da Rana catesbeiana frente às variações ambientais: determinação das condições ideais de*

- manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos. São Paulo. 180 p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
- CAMPBELL, G.L.; CLASSEN, H.L. GOLDSMITH, K.A. 1983 Effect of fat retention on the rachitogenic effect of rye fed to broiler chicks. *Poultry Science Journal*, 62: 2218-2213.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.R. 2000 *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogam. 1251p.
- CRAWSHAW, G.J. e WEINKLE, T.K. 2000 Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 9(3): 165-173.
- COPPOLA, M.M. e GIL-TURNES, C. 2004 Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, 34(4): 1297-1303.
- DENVER, R.J. 2009 Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*, 164: 20-31.
- DENVER, R.J.; GLENNEMEIER, K.A.; BOORSE, G.C. 2002 Endocrinology of complex life cycles: Amphibians. In: PFAFF, D.W.; ARNOLD, A.P.; ETGEN, A.M.; FAHRBACH, S.E.; RUBIN, R.T. *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier Science, 2(28): 469-513.
- DIAS, D.C.; DE STEFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; PAIVA, M.J.T.R.; SANTOS, A.A. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 41(7):1064-1071.
- DILUZIO, N.R. 1985 Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminary of Immunopathology*, 8: 387-400.
- DISCHE, Z. 1962 Anthrone assay. In: *Methods carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press Inc. p. 478-512.
- EL NAGDY, S.A.; ZAHRA, M.H.; AL ZAHABY, A.A.; EL SABBAGH, M.E. 1995 Biochemical studies on the blood and tissue components of the common egyptian toad *Bufo regularis*. *Qatar University Science Journal*, 15: 37-49.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012 Cultured aquatic species information programme. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1862). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em: ago. 2012.
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 33:1-15.
- FRANÇA, F.M.; DIAS, D.C.; TEIXEIRA, P.C.; MARCANTÔNIO, A.S.; STÉFANI, M.V.; ANTONUCCI, A.; ROCHA, G.; RANZANI-PAIVA, M.J. T.; FERREIRA, C.M. 2008 Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3): 403-412.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. 2001 Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199: 197-227.
- FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. 1998 Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 46: 147-159.
- GARTNER, L.P. e HIATT, J.L. 1999 *Tratado de Histologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 426p.
- GUYTON, A.C. e HALL, J.E. 2002 *Tratado de fisiologia médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 611p.
- HI, E.M.B.; AZEVEDO, M.R.A; BACH, E.E.; OGATA, T.R.P. 2008 Efeito protetor do extrato de *Agaricus sylvaticus* em fígado de ratos do tipo wistar inoculado com pristane. *Revista Saúde Coletiva*, 5: 76-79.
- HIPOLITO, M.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; BACH, E.E. 2004 Aspectos bioquímicos em fígados de rãs-touro (*Rana Catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(2): 147-153.
- HIPOLITO, M.; RIBEIRO FILHO, O.P.; BACH, E.E. 2007 Aspecto bioquímico em fígados de *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802) submetida a diferentes dietas. *ConScientiae Saúde*, 6(1): 49-56.

- HODGSON, E. 2004 *A textbook of modern toxicology*. 3ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons Incorporation. 557p.
- LEENHOUWERS, J.I.; ADJEL-BOATENG, D.; VERRETH, J.A.J.; SCHRAMA, J.W. 2006 Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in african catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. *Aquaculture Nutrition*, 12: 111-116.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193: 265-274.
- MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAI, H.; TSUCHIDA, H. 1999 The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 47: 707-714.
- MC EWEN, B.S. 2008 Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*, 583(2-3): 174-185.
- MOERSCHBACHER, B.M.; HECK, B.; KOGEL, K.H.; OBST, O.; REISNER, H.J. 1986 An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Biosciences*, 41(9-10): 32-37.
- PLANAS, M. e CUNHA, I. 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. 1990 Enhancement of non-specific disease resistance in atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of fish diseases*, 13(5): 391-400.
- ROMERO, L.M. 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 128: 1-24.
- SEIXAS-FILHO, J, T.; ALMEIDA, L. H. O.; AGUIAR, D. V.; CARVALHO, G. A. 2006 Avaliação do trato gastrintestinal em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos à alimentação com três níveis de proteína bruta em rações comerciais. In: SIMPÓSIO DE ANFÍBIOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2., Macaé, 08/jun./2006. *Resumos...* Macaé: UFRJ. p.16.
- SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.C. 2009 Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, 6(1): 817-836.
- SOUTHERTON, S.G. e DEVERALL, B.J. 1990 Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. *Plant Pathology*, 39(2): 223-230.
- SRIVASTAVA, S.K. 1987 Peroxidase and polyphenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid, and their implication in disease resistance. *Journal of Phytopathology*, 120(3): 249-254.
- SWAIN, R. e HILLIS, W.E. 1959 The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 63-68.
- WENDELAAR-BONGA, E.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 592-625.
- ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. 3ª ed. New Jersey, Prentice Hall. 662p.