

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

RESPOSTA DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR AO ESTRESSE POR
ADENSAMENTO EM RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*

Jorgina Juliana Gradisse Freitas

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Co-orientadora: Danielle de Carla Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro 2012

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

RESPOSTA DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR AO ESTRESSE POR
ADENSAMENTO EM RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*

Jorgina Juliana Gradisse Freitas

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Co-orientadora: Danielle de Carla Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro 2012

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

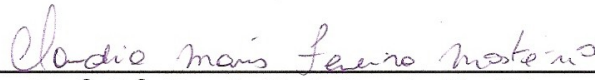
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“Resposta da suplementação alimentar ao estresse por adensamento em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*”

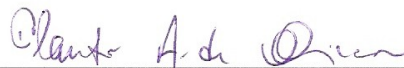
AUTOR: JORGINA JULIANA GRADISSE FREITAS

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. CLAUDIA MARIS FERREIRA MOSTÉRIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Claudia Maris Ferreira Mostério

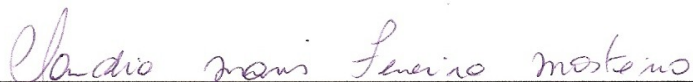


Prof. Dr. Cláudio Alvarenga



Prof. Dr. Antenor Aguiar dos Santos

Data da realização: 28 de setembro de 2012



Presidente da Comissão Examinadora
Prof^ª. Dr^ª. Claudia Maris Ferreira Mostério

À minha mãe, Sandra Gradisse de Oréquio, e meus irmãos, Isaac e Edgar, que mesmo à distância, torceram, oraram por mim e acreditaram na realização deste trabalho, dedico.

Agradecimentos

A Deus. Autor da vida, do querer e do efetuar. A Ele, que colocou no meu coração o desejo, e me deu condições de passar por mais essa etapa e de realizar esse trabalho, tenho tudo a agradecer.

Aos funcionários, professores, pesquisadores do Instituto de Pesca, que me receberam de braços abertos e me atenderam em tudo o que precisei, desde a primeira vez que estive nesta instituição.

Aos que, muito além de colegas de curso, mas se mostraram companheiros de jornada e verdadeiros amigos. Lígia, Sônia, Fábio Kiyoshi, Renan, Fernanda, Ludmila, Pedro, Janaína, Katerine. A amizade é um amor que nunca morre. Contem comigo sempre, amados!

Patrícia Teixeira, Adriana Sacioto, Fernanda Menezes. Além da amizade, pessoas com quem aprendi muito.

Márcio Hipólito, Erna Bach, Cristina Martins, Danielle Carla Dias, Leonardo Tachibana, pelos ensinamentos, grande colaboração e presença na realização desse trabalho. E também aos estagiários do LISA, Rodrigo, Luara, Júlia, Cleocilene.

Cláudia Maris Ferreira Mostério. Pessoa a quem agradeço infinitamente. Muito além da realização do trabalho, da orientação no mestrado, dos ensinamentos, mas também pela amizade.

Aos membros da comissão examinadora, pela dedicação e atenção, e pelas sugestões valiosas.

A todos que de alguma forma participaram dessa etapa da minha vida e contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

Sumário

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
CAPÍTULO 1.....	10
CAPÍTULO 2.....	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45

Resumo

O estresse é uma condição na qual o organismo se coloca em enfrentamento das situações adversas que lhe são impostas. Durante o estresse, várias respostas endócrinas são ativadas, entre elas, a liberação de glicocorticóides, principalmente corticosterona em anfíbios. Em curtos períodos de estresse, os glicocorticóides aumentam a mobilização de energia e melhoram o desempenho geral do organismo. Por outro lado, o estresse crônico pode levar à imunossupressão, atrofia dos tecidos e redução no desempenho, trazendo consequências como o aumento da incidência de enfermidades e da mortalidade dos animais. Na maioria dos ranários comerciais observa-se a mortalidade causada por agentes estressores, se fazendo necessário eliminar do cativeiro esses agentes, e o conseqüente prejuízo devido à perda de animais. Objetivamos avaliar a eficácia da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana do fungo *Agaricus blazei* na redução dos efeitos do estresse por adensamento em rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. Animais pesando 24.3 ± 2.38 g foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos com quatro réplicas simultâneas, sendo: T1: 100 animais/m² (Controle); T2: 236 animais/m²; T3: 236 animais/m², suplementados com probiótico; T4: 236 animais/m², suplementados com betaglucana. Fornecemos ração manualmente e o período experimental teve a duração de 30 dias. Avaliamos a sobrevivência (S), ganho em peso (GP), corticosterona plasmática (CORT) e a resposta imune (Capacidade fagocítica - CF e Índice fagocítico - IF), além da condição bioquímica e histopatológica dos fígados, nos tempos 24 h, 15 e 30 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas para as médias de S ($97.59\% \pm 2.71$), CF ($85.09\% \pm 15.57$) e IF (3.46 ± 1.25) ($p > 0.05$). A comparação de médias através do teste Tuckey mostrou diferenças significativas para o GP aos 30 dias, entre os tratamentos não suplementados (T1 e T2), e os suplementados (T3 e T4) ($p < 0.001$). Para os níveis de CORT foram encontradas diferenças significativas entre T1 no tempo 24 horas, e T1, T2 e T3 no tempo 30 dias ($p < 0.05$). Observamos também que, aos 30 dias de experimentação, os valores médios de CORT estavam muito próximos entre no T1 (controle) e o T4 (grupo suplementado com betaglucana), sendo que o T4 neste período não diferiu estatisticamente de T1 no início do experimento (24 horas). A análise histopatológica mostrou diversos tipos de lesões hepáticas, e rarefação citoplasmática em 100% das amostras, sugerindo deficiência proteica. Estes resultados indicam que a betaglucana extraída do fungo *Agaricus blazei* reduziu os efeitos do estresse provocado pelo adensamento em rã-touro Americana, além de ter evidenciado efeito hepatoprotetor, porém o probiótico *Bacillus subtilis* não se mostrou eficiente na redução desses mesmos efeitos nas condições em que o teste foi conduzido.

Palavras-chave: estresse, *Agaricus blazei*, resposta imune, corticosterona, probiótico, betaglucana.

Abstract

Stress is a condition in which an organism is faced with challenging situations. During stress, multiple endocrine responses are activated, including the release of glucocorticoids, mainly corticosterone in amphibians. In short periods of stress, glucocorticoids increase the mobilization of energy and improve the overall performance of the organism. Moreover, chronic stress can lead to immunosuppression, atrophy of tissues and decreased performance, bringing consequences such as increased incidence of disease and mortality of animals. In most commercial frog farms are observed mortality caused by stress agents, becoming necessary to remove these agents from captivity, and the consequent injury due to loss of animals. We aimed to evaluate the efficacy of dietary supplementation with the probiotic *Bacillus subtilis* and with the beta-glucan extracted from the fungus *Agaricus blazei* in reducing the effects of stress caused by high density in American bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*. Animals weighing 24.3 ± 2.38 g were randomly distributed into four following treatments with four simultaneous replicates: T1: 100 animals/m² (Control); T2: 236 animals/m²; T3: 236 animals/m² supplemented with probiotic; T4: 236 animals/m² supplemented with beta-glucan. We supplied feed manually, and the experimental period was 30 days long. We evaluated survival (S), weight gain (WG), plasma corticosterone (CORT) and non specific immunity, i.e., phagocytic capacity (PC) and phagocytic index (PI), at 24 h and 15 and 30 day, and the condition of liver biochemistry and histopathology in time 24 h, and 30 days. No statistical differences were observed between treatments to values of S ($97.59 \pm 2.71\%$), PC ($85.09\% \pm 15.57$) and PI (3.46 ± 1.25) ($p > 0.05$). A comparison of means by Tukey test showed significant differences for the GP to 30 days between treatments without supplementation (T1 and T2), and supplemented (T3 and T4) ($p < 0.001$). For the means levels of CORT we observed statistical differences between T1 at 24 hours, and T1, T2 and T3 at 30 days ($p < 0.05$). For the other hand, at 30 days these values were very close for the T1 (control) and T4 (beta-glucan supplemented) groups, and T4 in this period did not differ statistically from T1 at the beginning of the experiment (24 hours). Histopathological analysis showed various types of liver injury, and cytoplasmic rarefaction in 100% of samples, suggesting protein deficiency. These results indicate that *Agaricus blazei* beta-glucan reduced the effects of stress caused by high stocking density in American bullfrogs, and has shown hepatoprotective effect, but that the probiotic *Bacillus subtilis* was not efficient in reducing these effects under the conditions in which the test was performed.

Keywords: stress, *Agaricus blazei*, immune response, corticosterone, probiotic, betaglucan.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O estresse é uma condição na qual o organismo se coloca em enfrentamento das situações adversas que lhe são impostas, sejam ambientais ou orgânicas, agudas ou crônicas. Os agentes estressores induzem o organismo a respostas fisiológicas compensatórias ou adaptativas para possibilitar a superação dessa condição (WENDELAAR BONGA, 1997).

Durante o estresse, são ativadas respostas endócrinas a fim de melhorar o desempenho do organismo, entre elas, a liberação de glicocorticóides (GC). Em anfíbios, os glicocorticóides são liberados pelas glândulas interrenais, em resposta à ativação do Eixo HPI (Hipotálamo-Pituitária-Interrenais), sendo a corticosterona (CORT) o principal mediador das respostas fisiológicas e comportamentais a mudanças ambientais (HERMAN, 1992; GLENNEMEIER e DENVER, 2002b; BELDEN *et al.*, 2005; WADA, 2008; DENVER, 2009; DENVER, 2009; BELDEN *et al.*, 2010).

Em curtos períodos de estresse, os glicocorticóides aumentam a mobilização de energia e o desempenho do organismo. Por outro lado, o estresse crônico pode levar à imunossupressão, atrofia dos tecidos e redução no desempenho reprodutivo (MOSTL e PALME, 2002), trazendo conseqüências como o aumento da incidência de enfermidades e da mortalidade dos animais. Durante o estresse, em estados de exaustão, os animais apresentam diminuição da resistência a doenças e conseqüente contaminação por bactérias e fungos oportunistas, o que pode levá-los à morte (BARTON e IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas ao estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária. A primeira categoria é uma reação de alarme, que causa aumento das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides. A segunda caracteriza-se por um estado de resistência que produz efeitos metabólicos como aumento dos batimentos cardíacos e do consumo de oxigênio, alterações na glicemia, hematócrito e número de leucócitos. A terceira é um estado de exaustão que causa a queda de desempenho e a diminuição da resistência a doenças e, conseqüentemente, a contaminação por bactérias e fungos oportunistas, podendo levá-los à morte (BARTON e IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997).

Na maioria dos ranários comerciais observa-se a mortalidade de animais devido a agentes estressores, como manejo ou instalações inadequados, deficiência alimentar, má qualidade da água ou incidência de enfermidades (ROCHA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Na aquicultura em geral, há interesse especial em reduzir os efeitos do estresse e aumentar a resposta imune, o que pode ser induzido através do uso de imunoestimulantes (ROITT *et al.*, 1998), como os suplementos ou aditivos alimentares representados pelos probióticos e betaglucanas (DILUZIO, 1985; ROBERTSEN *et al.*, 1990; FRANÇA *et al.*, 2008), uma vez que é evidente que a composição da dieta influencia no funcionamento do sistema imune (VOLMAN *et al.*, 2008). Com o uso de imunoestimulantes, pode-se ainda eliminar o uso de antibióticos da produção, bem como os seus inconvenientes, ou seja, a presença de resíduos nos tecidos de animais destinados ao consumo e o desenvolvimento de bactérias resistentes (CHAGAS, 2010).

Probióticos são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal, agindo como promotores de crescimento e imunomoduladores (COPOLLA e GIL-TURNES, 2004). Em sua maioria, são preparados com *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e em alguns casos, leveduras (FULLER, 1989; GUZMÁN, 1992). Vários ensaios com o uso de probióticos têm apresentado resultados promissores na criação de organismos aquáticos, inclusive de anfíbios (DIAS *et al.*, 2010).

Betaglucanas são encontrados naturalmente como componentes de parede celular de plantas, algas, fungos e algumas bactérias, formadas por polímeros de polissacarídeos unidos por ligações $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ e $\beta(1-6)$, e funcionam como imunoestimulante em mamíferos (DI LUZIO, 1985) e em peixes (ROBERTSEN *et al.*, 1990; COOK *et al.*, 2003). O uso de betaglucanas na aquicultura é um tema inovador, mas com resultados promissores, principalmente no cultivo de larvas de peixes e moluscos (PLANAS e CUNHA, 1999). A utilização destes suplementos alimentares na criação de rãs é mais recente (DIAS, 2006). O fungo *Agaricus blazei*, espécie nativa do Brasil, onde é conhecido popularmente como Cogumelo do Sol, tem sido utilizado na alimentação humana, devido ao seu valor nutricional, e também

como suplemento alimentar, devido às suas propriedades medicinais. Ao mesmo são atribuídos efeitos imunoestimulante, antitumoral e hepatoprotetor (FUJIMIYA *et al.*, 1998; MIZUNO *et al.*, 1999; BARBISAN *et al.*, 2003).

Na aqüicultura estão sendo utilizados testes de ativação e de incremento da migração de macrófagos com o intuito de verificar a capacidade imunológica inespecífica dos animais frente a um desafio. Esta metodologia, descrita por SILVA *et al.* (2005), que trabalhou com peixes antárticos verificando a capacidade e o índice fagocítico de macrófagos, também está sendo utilizada para outros organismos aquáticos como peixes e anfíbios (DIAS, 2006).

O fígado reflete o estado geral do organismo, e em caso de inadequações na alimentação ou alterações no metabolismo, como deficiência nutricional, intoxicações, infecções e parasitismo, manifesta sinais de indicativos da desordem orgânica. Sendo essas alterações passíveis de afetar a estrutura celular, bioquímica e morfológica do fígado, os métodos de diagnóstico de enfermidades através de análises desse órgão podem constituir ferramentas úteis na avaliação da ocorrência de enfermidades e estresse. O fígado dos anfíbios realiza funções fisiológicas, incluindo metabolismo energético e proteico, síntese de ureia, secreção de sais biliares, biotransformação e detoxificação, respondendo a agentes tóxicos ou infecciosos de maneira similar aos demais vertebrados (CRAWSHAW e WEINKLE, 2000).

Segundo HIPOLITO *et al.* (2004), a deficiência proteica e a presença de agentes infecciosos ou tóxicos, bem como de micotoxinas, refletem na estrutura e função hepática, podendo ser a causa de graves alterações hepáticas quanto ao tamanho, cor, forma e textura. Histopatologicamente é possível observar, associado à deficiência protéica, a vacuolização e o rompimento do contorno celular, rarefação e degeneração celular; à micotoxicose, congestão sangüínea, degeneração hidrópica e gordurosa; à processos infecciosos, áreas focais de hepatite e hepatite intersticial. Os mesmos autores afirmam ainda que, para uma perfeita condição de criação animal, o bom desempenho das funções hepáticas é primordial, e o estudo bioquímico dessas funções é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de enfermidades e mortalidade na ranicultura. O estudo bioquímico dos fígados pode ser também voltado para o aprimoramento da formulação da ração, escolha da

melhor composição e matérias-primas, melhorando o desempenho nutricional da rã-touro.

O presente trabalho encontra-se dividido em dois capítulos, na forma de artigos científicos. No capítulo 1, “Resposta da Suplementação Alimentar ao Estresse provocado por Alta Densidade em Rã-Touro Americana, *Lithobates catesbeianus*”, a ser submetido à revista “Journal of the World Aquaculture Society”, objetivamos avaliar a eficácia da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana extraída do fungo *Agaricus blazei* na redução dos efeitos do estresse provocado por adensamento nessa espécie animal. No capítulo 2, “Resposta Hepática à Suplementação Alimentar com Probiótico e Betaglucana Em Rã Touro Sob Condição De Estresse Por Adensamento”, a ser submetido ao Boletim do Instituto de Pesca, objetivamos avaliar o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana do fungo *Agaricus blazei* em rã-touro submetida à condição de estresse por adensamento.

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*, Limerick, 83: 25-32.
- BARTON, B. A. e IWAMA, G. K. 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Diseases*, Amsterdam, 10: 3-26.
- BELDEN, L. K., MOORE, I. T.; WINGFIELD, J. C.; BLAUSTEN, A. R. 2005. Corticosterone and growth in pacific treefrog (*Hyla regilla*) tadpoles. *Copeia*, Washington, 2: 424-430.
- BELDEN, L. K.; WINGFIELD, J. C.; KIESECKER, J. M. 2010 Variation in the hormonal stress response among larvae of three amphibian species. *Journal of Experimental Zoology, New York*, 313(8): 524-531.

- BRAGA, L. G. T. e S. L. LIMA. 2001 Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw 1802) na fase da recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 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. 180 p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
- CHAGAS, E. C. 2010 β -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas. Jaboticabal. 141 p. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista). Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/teses/Tese%20Edsandra%20Campos%20Chagas.pdf> Acesso em: 01/08/2011.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. 2003 Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish and Shellfish immunology*, Aberdeen, 14(4): 333-45.
- COPPOLA, M. M. e GIL-TURNES, C. 2004 Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(4): 1297-1303.
- CRAWSHAW, G. J. e WEINKLE, T. K. 2000 Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *Journal of Exotic Pet Medicine*, Philadelphia, 9(3): 165-173.
- CRESPI, E. J. e DENVER, R. J. 2005 Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 141: 381-390.
- DENVER, R. J. 2009 Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 164: 20-31.
- DIAS, D. C. 2006 Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. Jaboticabal. 80p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista). Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/dissertacoes/Dissertacao%20Danielle%20de%20Carla%20Dias.pdf> Acesso em: 01/08/2011.
- 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*, Amsterdam, 41(7): 1064-1071.

- DILUZIO, N. R. 1985 Update on the immunomodulating activities of glucans. *Seminars in Immunopathology*, Berlin, 8: 387-400.
- EICHER, S. D.; MC KEE, C. A.; CARROLL, J. A.; PAJOR, E. A. 2006 Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *Journal of Animal Science*, Champaign, 84: 2352–2360.
- FERREIRA, C. M., A. G. C. PIMENTA, e J. S. PAIVA-NETO. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.
- FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI JR., J.; PENTEADO, L. A.; RODRIGUES, A. L.; JUSTO, C. L.; CAMPOS, B. E. S. 1987 Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 24: 213-216.
- 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*, São Paulo, 34 (3): 03-412.
- FRANCIS, G., H. P. S. MAKKAR; K. BECKER. 2001 Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 199: 197–227.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: a review. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 66: 365-378
- GLENNEMEIER, K. A. e DENVER, R. J. 2002 Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, Philadelphia, 292: 32-40.
- GLENNEMEIER, K. A. e DENVER, R. J. 2002b Developmental changes in interrenal responsiveness in anuran amphibians. *Integrative and Comparative Biology*, Oxford, 42: 565-573.
- GUZMÁN, G. A. 1992 Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R.; ALFARO, R. M. *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey. p. 332-337
- HERMAN, C. A. 1992 Endocrinology. In: FEDER, M. E. e BURGGREN, W. W. *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press. p. 40-54.

- HIPOLITO, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; BACH, E. E. 2004 Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Rana Catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. 71(2): 147-153.
- LEENHOUWERS, J. I.; ADJEI-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*, Amsterdam, 12: 111-116.
- MOBERG, G. P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing, Davis, p. 1-22.
- MORGAN, J. D. e IWAMA, G. K. 1997 Cortisol induces changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, 15 (5): 385-394.
- MOSTL, E. e PALME, R. 2002 Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, Auburn, 23: 67-74.
- PLANAS, M. e CUNHA, I. 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, Amsterdam, 177: 171-190.
- RICIARDELLA, L. F. BLILEY, J. M.; FETH, C. C.; WOODLEY, S. K. 2010 Acute stressors increase plasma corticosterone and decrease locomotor activity in a terrestrial salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). *Physiology & Behavior*, Elmsford, 101: 81-86.
- 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*, Oxford, 13(5): 391-400.
- ROCHA, G. C.; FERREIRA, C. M.; TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; FRANÇA, F. M.; ANTONUCCI, A. M.; MARCANTÔNIO, A. S. LAURETO, M. 2010 Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, 30: 891-896.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. 1998 *Immunology*. London: Mosby. 416 p.
- ROMERO, L. M. 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 128: 1-24.

- SILVA, J. R. M. C.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S.; JENSCH Jr., B. E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0 °C. *Polar Biology*, Heidelberg 28(4): 326-328.
- TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; ROCHA, G. C.; ANTONUCCI, A. M.; FRANÇA, F. M.; MARCANTÔNIO, A. S.; RANZANI-PAIVA, M. J.; FERREIRA, C. M. 2012 Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, (30): 10.
- VOLMAN J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. 2008 Dietary Modulation of Immune Function by B-Glucans. *Physiology & Behavior*, Elmsford, 94(2): 276-384.
- WENDELAAR-BONGA, E. E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, Bethesda 77(3): 592-625.
- WADA, H. 2008 Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 156(3). 441-453.
- ZAR, J. H. 1999 *Biostatistical analysis*. 3^a ed New Jersey. Prentice Hall. 662 p.

CAPÍTULO 1

Resposta de Aditivos Alimentares ao Estresse provocado por Alta Densidade em Rã-Touro Americana

Effect of Dietary Supplements on Stress Caused by High Density in American Bullfrogs

Resumo

Objetivamos avaliar a eficácia da suplementação alimentar com probiótico Bacillus subtilis e com a betaglucana extraída do fungo Agaricus blazei na redução dos efeitos do estresse provocado por adensamento em rã-touro Americana, Lithobates catesbeianus. Animais pesando 24.3 ± 2.38 g foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos com quatro réplicas simultâneas: T1: 100 animais/m² (Controle); T2: 236 animais/m² sem suplemento; T3: 236 animais/m² suplementados com probiótico; T4: 236 animais/m² suplementados com betaglucana. Fornecemos ração manualmente. O período experimental foi de 30 dias. Avaliamos a sobrevivência (S), ganho em peso (GP), corticosterona plasmática (CORT) e a resposta imune através da capacidade fagocítica (CF) e do índice fagocítico (IF), nos tempos 24h, 15 e 30 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas para as médias de S ($97.59\% \pm 2.71$), CF ($85.09\% \pm 15.57$) e IF (3.46 ± 1.25) ($P > 0.05$). A comparação de médias através do teste Tuckey mostrou diferenças significativas no GP aos 30 dias, entre os tratamentos não suplementados (T1 e T2) e os suplementados (T3 e T4) ($p < 0.001$). Para os níveis de CORT foram encontradas diferenças estatísticas entre T1 (24 horas), e T1, T2 e T3 aos 30 dias ($p < 0.05$). Observamos também que, aos 30 dias, os valores médios de CORT estavam muito próximos entre T1 (controle) e T4, sendo que o T4 neste período não diferiu estatisticamente de T1 no início do experimento. Estes resultados indicam que a betaglucana do fungo Agaricus blazei reduziu os efeitos do estresse por adensamento em rã-touro Americana, porém o probiótico Bacillus subtilis não se mostrou eficiente nessa função nas condições de realização do teste. Palavras-chave: corticosterona, Lithobates catesbeianus, resposta imune, probiótico, betaglucana

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficacy of dietary supplementation with the probiotic Bacillus subtilis and with beta-glucan from Agaricus blazei on the effects of stress caused by high density in bullfrogs. Animals weighing 24.3 ± 2.38 g were randomly distributed into four treatments with four simultaneous replicates: T1: 100 animals/m² (control); T2: 236 animals/m²; T3: 236 animals/m² supplemented with probiotic; and T4: 236 animals/m² supplemented with beta-glucan. We supplied food manually. The experimental period was 30 days long. We evaluated survival (S), weight gain (WG), plasma corticosterone (CORT) and nonspecific immunity, i.e., phagocytic capacity (PC) and phagocytic index (PI), at 24 h and 15 and 30 days. No statistical differences were observed between treatments to values of S ($97.59 \pm 2.71\%$), PC ($85.09\% \pm 15:57$) and PI (3.46 ± 1.25) ($p > 0.05$). A comparison of means by Tukey test showed significant differences for the GP to 30 days between treatments without supplementation (T1 and T2), and supplemented (T3 and T4) ($p < 0.001$). For the means levels of CORT we observed statistical differences between T1 at 24 hours, and T1, T2 and T3 at 30 days ($p < 0.05$). For the other hand, at 30 days these values were very close for the T1 (control) and T4 (beta-glucan supplemented) groups, and T4 in this period did not differ statistically from T1 at the beginning of the experiment (24 hours). These results indicate that beta-glucan reduced the effects of stress caused by high density in bullfrogs, but that the probiotic was not efficient in reducing these effects under the conditions in which the test was performed.

Key words: corticosterone, *Lithobates catesbeianus*, immune response, probiotic, beta-glucan

O estresse é uma condição na qual o organismo é desafiado a enfrentar as situações que lhe são impostas, sejam estas ambientais, orgânicas, agudas ou crônicas. Os agentes estressores induzem o organismo a respostas fisiológicas compensatórias ou adaptativas para possibilitar a superação dessa condição (Wendelaar Bonga 1997).

Durante o estresse, várias respostas endócrinas são ativadas para melhorar o desempenho do organismo, entre elas, a liberação de glicocorticóides (GCs) que aumentam a mobilização de energia e o desempenho do organismo. Por outro lado, o estresse crônico pode levar à imunossupressão, atrofia dos tecidos e redução no desempenho reprodutivo (Mostl e Palme 2002), trazendo consequências como o aumento da incidência de enfermidades e mortalidade dos animais.

Nos vertebrados, as respostas ao estresse são reguladas por GCs, sendo a corticosterona (CORT) o principal hormônio ligado a este processo em anfíbios (Belden et al. 2005; Denver 2009). Em mamíferos, os GCs são liberados pelo córtex adrenal em resposta à ativação do Eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) e desempenham papel importante na resposta ao estresse. Em anfíbios, são liberados pela glândula pituitária anterior e pelas glândulas interrenais, em resposta à ativação do Eixo HPI (Hipotálamo-Pituitária-Interrenais), sendo esses hormônios os principais mediadores das respostas fisiológicas e comportamentais a estímulos adversas (Herman 1992; Glennemeier e Denver 2002b; Wada 2008; Denver 2009; Belden et al. 2010).

Na maioria dos ranários comerciais observa-se a mortalidade de animais devido a agentes estressores, como instalações ou manejos inadequados, má qualidade da água, deficiência alimentar ou incidência de enfermidades (Rocha et al. 2010; Teixeira et al. 2012). Na aquicultura em geral, há interesse especial em reduzir os efeitos do estresse e aumentar a resposta imune, o que pode ser induzido através do uso de imunoestimulantes (Roitt et al. 1998), como probióticos e betaglucanas (Diluzio 1985; Robertsen et al. 1990; França et al. 2008), uma vez que é evidente que a composição da dieta influencia no funcionamento do sistema imune (Volman et al. 2008).

Os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, têm efeito imunomodulador (Copolla e Gil-

Turnes 2004). Em sua maioria, são preparados com Lactobacillus acidophilus, Streptococcus faecium, Bacillus subtilis e em alguns casos, leveduras (Fuller 1989; Guzmán 1992). Betaglicanas de leveduras e de fungos também são capazes de incrementar a função de células imunitárias (Volman et al. 2008).

Objetivamos com este trabalho avaliar a eficácia do probiótico Bacillus subtilis, e da betaglicana do fungo Agaricus blazei (Cogumelo do Sol®) na redução dos efeitos do estresse provocado por adensamento em rãs-touro, Lithobates catesbeianus.

Materiais e métodos

Foram utilizados 440 animais após a metamorfose com 45 dias de idade, e peso médio de 24.34 ± 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 e distribuídos em 16 caixas de polipropileno (0.47 x 0.30 x 0.17 m) (Bueno-Guimarães 1999), inundadas com lâmina d'água de 0.03 m. Foi utilizada água da rede pública, declorada 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.

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado, composto por quatro tratamentos com quatro replicas simultâneas: Tratamento 1 (controle): densidade de estocagem 100 animais/m² (Ferreira et al. 2002), sem suplementação alimentar; Tratamento 2: densidade de estocagem de 236 animais/m², sem suplementação alimentar; Tratamento 3: densidade de estocagem 236 animais/m², suplementado com probiótico comercial à base de Bacillus subtilis (Cepa C-3102, 10⁹ UFC/g); Tratamento 4: densidade de estocagem 236 animais/m², suplementado com betaglicana do fungo Agaricus blazei (Cogumelo do Sol®, Cogumelos Valemar, 167 mg/g betaglicana, 40 mg betaglicana livre, 2.4 mg/g proteína, 0.2 mg/g fenol). Ambos suplementos adicionados na proporção de 10g/kg de ração. As densidades de 100 animais/m² e 236 animais/m² 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 (NAVA, 2005), 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), duas vezes ao dia. Os suplementos foram misturados à ração por aspersão de 2% de óleo vegetal. O período experimental teve a duração de 30 dias.

Para respondermos aos objetivos desse estudo foram avaliados o ganho em peso (GP) e sobrevivência, além das análises de corticosterona plasmática (CORT) e imunidade específica por meio de um desafio imunológico.

Dois organismos de cada réplica (oito animais por tratamento) foram amostrados nos tempos 24 horas, 15 e 30 dias de experimentação, para coleta de sangue destinado à avaliação da CORT, totalizando 96 animais. A amostragem foi realizada por meio da punção do vaso do membro posterior utilizando seringas e agulhas descartáveis e heparinizadas. Medidas para evitar o possível estresse causado pela captura e coleta de sangue foram tomadas, tais como: coletas realizadas no período da manhã, envolvimento dos animais em gaze e aplicação de anestésico tópico (Lidocaína®). O procedimento de captura de animais e coleta de amostras compreendeu um tempo médio de 3 minutos. Após a amostragem, as alíquotas de sangue foram acondicionadas em microtubos, centrifugadas a 2000 x g por cinco minutos para a obtenção do plasma e congeladas para posterior análise. A dosagem da corticosterona plasmática (CORT) foi realizada através de radioimunoensaio (RIE) em fase líquida, utilizando-se conjunto diagnóstico comercial (ImunoChem® Double Antibody Corticosterone I¹²⁵ RIA kit MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA), de acordo com as indicações do fabricante e previamente validado para esta espécie (Teixeira et al. 2012). As análises foram feitas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Para realização do desafio imunológico foram amostrados oito animais no início do experimento (MZ – Momento Zero) e outros 32 animais ao final do experimento (30 dias) (dois de cada réplica). Os indivíduos foram inoculados com 2

mL de solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na cavidade abdominal, com concentração aproximada de 11.000 cel/mm^3 (Dias et al. 2010). Após a incubação de 2h, os animais foram eutanaziados em solução de benzocaína (3g/L). Em seguida foram submetidos à lavagem da cavidade abdominal com solução Ringer para anfíbios, através de corte lateral do abdome. O material foi centrifugado a $251 \times g$ por cinco minutos. O precipitado foi separado do sobrenadante, ressuspensionado e colocado sobre lâmina de vidro, e visualizado em microscópio de contraste de fases para a contagem dos fagócitos ativos e do total de leveduras fagocitadas. A capacidade fagocítica (CF) foi calculada através do número de fagócitos ativos por 100, e o índice fagocítico (IF) através do número total de leveduras fagocitadas dividido pelo número de fagócitos ativos (Silva et al. 2005; França et al. 2008; Dias et al. 2010).

A análise descritiva das variáveis do estudo foi realizada em termos de seus valores de tendência central e de dispersão. Testes foram feitos para verificar a normalidade dos dados (Lilliefors) e a homogeneidade das variâncias (F). Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para atender a premissa de normalidade. Para comparação das médias realizamos a análise de variância (ANOVA TWO WAY) seguido dos testes de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0.05$ (ZAR 1999).

Resultados

Durante o período experimental, a temperatura média mínima foi 22.14 ± 1.08 C, e a máxima, 23.96 ± 1.04 C não apresentando alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando dentro dos níveis de conforto térmico para esses animais recomendados por Braga e Lima (2001).

A Tabela 1 apresenta os valores médios de ganho em peso (GP) e sobrevivência (S) nos distintos tratamentos, aos 30 dias de experimentação. A comparação de médias através do teste Tukey mostrou diferenças significativas para o GP aos 30 dias, entre os tratamentos não suplementados (T1 e T2), e os suplementados (T3 e T4) ($p < 0.001$). Não foram observadas diferenças estatísticas para as médias de $S = 97.59\% \pm 2.71$ ($P > 0.5$).

Tabela 1. Valores médios de Ganho em peso e Sobrevivência de rã-touro nos distintos tratamentos, aos 30 dias de experimentação (n=440).

Tratamento	Ganho em Peso (g)	Sobrevivência (%)
T1	37.55±6.92 a	96.42±4.13
T2	28.46±5.18 a	98.43±1.81
T3	13.49±7.47 b	96.87±3.13
T4	16.79±1.56 b	98.43±1.81

As médias foram comparadas nas colunas onde letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0.05$). T1 (controle): 100 animais/m², sem suplementação alimentar; T2: 236 animais/m², sem suplementação alimentar; T3: 236 animais/m², suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*; T4: 236 animais/m², suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

Os parâmetros de sensibilidade e variação inter e intraensaio foram testados para garantir a qualidade laboratorial dos conjuntos diagnósticos (MP Biomedicals) de dosagem de corticosterona plasmática (CORT). A sensibilidade do ensaio foi de 1.99 ng/mL, sendo os coeficientes de variação intraensaio baixo e alto de 6% e 3.66%, respectivamente.

Os valores médios de CORT nos distintos tratamentos e tempos de coleta durante o período experimental encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Níveis médios e desvio padrão de corticosterona plasmática (CORT) em rãs-touro, nos distintos tratamentos e tempos de coleta (24 horas, 15 e 30 dias). Dosagens expressas em ng/mL (n=96).

Tratamento	24 horas	15 dias	30 dias
T1	4.35±2.46 a	8.12±3.65 a	11.25±3.08 b
T2	9.27±2.39 a	10.71±5.95 a	15.84±6.51 b
T3	6.11±1.38 a	9.99±2.95 a	16.86±7.21 b
T4	7.15±4.71 a	13.65±7.70 b	8.55±5.83 a

As médias foram comparadas nas colunas (tempo) e linhas (tratamentos) onde letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0.05$). T1 (controle): 100 animais/m², sem suplementação alimentar; T2: 236 animais/m², sem suplementação alimentar; T3: 236 animais/m², suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*; T4: 236 animais/m², suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

Verificamos aumento linear nos níveis de CORT entre os tempos 24 horas, 15 e 30 dias em todos os tratamentos, porém esse aumento não diferiu estatisticamente entre tempos. Para os níveis de CORT foram encontradas diferenças significativas entre T1 no tempo 24 horas, e T1, T2 e T3 no tempo 30 dias ($p < 0.05$). Observamos

também que, aos 30 dias de experimentação, os valores médios de CORT estavam muito próximos entre no T1 (controle) e o T4 (grupo suplementado com betaglucana), sendo que o T4 neste período não diferiu estatisticamente de T1 no início do experimento (24 horas). Na Figura 1 pode-se observar nitidamente o aumento dos valores de CORT no T4 (grupo suplementado com betaglucana) aos 15 dias, com redução nesses valores aos 30 dias.

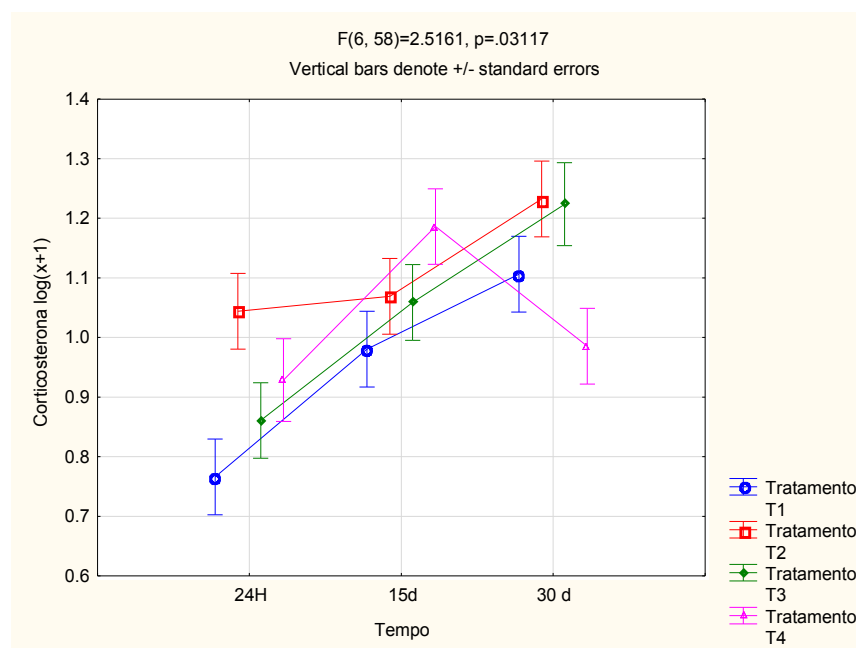


Figura 1: Níveis médios de corticosterona plasmática (CORT) em rãs-touro, nos distintos tratamentos e tempos de coleta (24 horas, 15 e 30 dias). Dosagens expressas em ng/mL.

As médias de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) obtidas através do desafio para verificar a resposta imune estão descritos na Tabela 3. Ao final do experimento, a CF média foi de $85.09\% \pm 15.57$, e o IF médio, 3.46 ± 1.25 , não diferindo estatisticamente quando comparados pelo teste de Tukey ($P > 0.05$). Porém, quando comparados com Momento Zero, observamos um incremento na resposta imune.

Tabela 3: Médias e desvio padrão da Capacidade Fagocítica, Índice Fagocítico em rã-touro após desafio imunológico com Saccharomyces cerevisiae nos diferentes tratamentos aos 30 dias (n = 40).

Tratamento	Momento	Capacidade Fagocítica	Índice
	Zero	%	Fagocítico
T1	CF 22.3±8.86	84.71±14.96	3.32±1.30
T2		91.33±10.02	3.62±1.78
T3	IF 1.26±0.41	86.40±8.88	3.73±0.96
T4		81.25±22.49	3.33±1.40

T1 (controle): 100 animais/m², sem suplementação alimentar; T2: 236 animais/m², sem suplementação alimentar; T3: 236 animais/m², suplementado com probiótico à base de Bacillus subtilis; T4: 236 animais/m², suplementado com betaglucana do fungo Agaricus blazei.

Discussão

Nesse estudo, investigamos se animais estimulados pelo adensamento teriam os efeitos desta condição de estresse reduzidos através da utilização de dietas suplementadas com probiótico Bacillus subtilis e betaglucana do fungo Agaricus blazei. É conhecido que os vertebrados geralmente respondem a esse tipo de estímulo estressor com aumento nos níveis plasmáticos de GCs (Romero 2002), corticosterona (CORT) no caso de anfíbios (Wada 2008). Os GCs desempenham papel importante na mobilização de energia, especialmente durante o estímulo estressor, com aumento na taxa metabólica, redução na ingestão de alimentos, mobilização de reservas de energia, redução no ganho em peso e crescimento e redução da atividade fagocítica (Moberg 2000). Esperávamos que a suplementação com probiótico e betaglucana reduzisse os níveis de CORT e incrementasse a resposta a imunidade inespecífica dos animais. Entretanto, não observamos alterações na sobrevivência e na resposta imune. Isto corrobora as afirmações de Fontanello et al. (1987) que reportam que é comum a ocorrência de altas taxas de sobrevivência para rãs-touro com peso médio acima de 12 g, devido ao fato de já terem passado pela fase crítica da metamorfose. Os animais utilizados nessa experimentação foram escolhidos após esta fase (45 dias) e a alta taxa de sobrevivência já era esperada, principalmente na condição experimental de laboratório onde se tem maior controle sobre os animais.

Entre os grupos submetidos à condição de estresse por adensamento, os tratamentos não suplementados (T1 e T2) apresentaram maior GP do que os que receberam a suplementação (probiótico e betaglucana) adicionado à ração (T3 e

T4). Algumas hipóteses podem explicar esses resultados tais como a presença de polissacarídeos não-amiláceos (PNA) e/ou o curto período experimental. Francis et al. (2001) e Leenhouders et al. (2006) reportam que os PNA presentes nas betaglucanas (componentes da parede celular de bactérias e fungos) constituem-se em um fator antinutricional. Possivelmente eles possam ter interferido na absorção e utilização de nutrientes, afetando negativamente o GP nos grupos suplementados. Por outro lado, Dias et al. (2010) observaram um incremento no GP e na resposta imune de rãs-touro, tratadas com o mesmo probiótico, fornecido na mesma dosagem e condições, porém em um período mais prolongado (112 dias), o que indicaria que o período experimental utilizado neste trabalho não tenha sido suficiente para que fossem observados os efeitos do probiótico sobre o GP.

Observamos um incremento nos níveis de CORT em todos os grupos na primeira quinzena do experimento, porém esse incremento foi significativo apenas em T4. Este incremento pode ser atribuído ao confinamento, corroborando com os resultados de Belden et al. (2005), que estudaram os efeitos do estresse de animais em confinamento, e com os de Glennemeier e Denver (2002), Crespi e Denver (2005) e Teixeira et al. (2012), que trabalharam com animais submetidos a altas densidades de estocagem. Ao final do experimento, observamos o efeito redutor do estresse no grupo suplementado com a betaglucana (T4), através da diminuição dos níveis de CORT até valores abaixo dos encontrados no grupo controle, diferindo estatisticamente dos valores encontrados para o mesmo parâmetro nos demais tratamentos nesse período.

Os subsídios bibliográficos relacionando valores de GCs em anfíbios e o uso de betaglucanas são escassos. Este tipo de estudo, assim como o uso de outros aditivos alimentares é relativamente recente na aquicultura, em especial em criação de rãs (Dias et al. 2010), não estando completamente elucidado o mecanismo exato pelo qual a betaglucana diminui os níveis de GCs. Eicher et al. (2006), avaliando os perfis de cortisol plasmático em suínos sob desafio imunológico e recebendo suplementação com betaglucana da levedura Saccharomyces cerevisiae, constataram que os perfis de cortisol plasmático sofreram um incremento durante o período experimental, porém mantiveram-se em níveis inferiores aos encontrados no grupo controle. Estes autores afirmam que a betaglucana atua na redução da

liberação de citocinas, que afetam o eixo HPA (HPI em anfíbios), reduzindo a liberação de ACTH pelas glândulas adrenais (interrenais em anfíbios) e, conseqüentemente, a produção e liberação dos GCs.

Na aqüicultura estão sendo utilizados testes de ativação e de incremento da migração de macrófagos com o intuito de verificar a capacidade imunológica inespecífica dos animais frente a um desafio (Silva et al. 2005). Riciardella et al. (2010) afirmam que os GCs alteram o metabolismo intermediário e aumentam a disponibilidade de energia e algumas respostas imunes, agindo de forma adaptativa e ajudando o organismo a lidar com o estímulo estressor. Entretanto, como dito anteriormente, para comprovar o efeito imunomodulador através de um teste de desafio de imunidade inespecífica, teríamos que realizar um novo teste, ampliando o período experimental da alimentação suplementada com os aditivos utilizados.

A utilização de probióticos e betaglucanas como suplementos alimentares em aqüicultura pode constituir uma alternativa ao uso de antibióticos, melhorando os aspectos sanitários e os parâmetros zootécnicos, o que é altamente desejável em qualquer exploração animal com fins comerciais. O probiótico Bacillus subtilis tem mostrado efeitos promissores em aqüicultura, especialmente no estímulo do sistema imune e no incremento do crescimento e ganho em peso, porém é necessário o uso prolongado para que os resultados sejam visíveis. A betaglucana do fungo Agaricus blazei, com conhecido efeito imunomodulador, hepatoprotetor, e anticancerígeno, mostrou-se também um potencial redutor dos efeitos do estresse, especialmente na redução dos níveis de glicocorticóides, uma vez que o estresse crônico pode promover danos fisiopatológicos nos sistemas que são atingidos por esse estímulo.

Conclusões

A betaglucana do fungo Agaricus blazei reduziu ao longo do tempo os efeitos do estresse provocado por adensamento, porém o probiótico Bacillus subtilis não se mostrou eficiente nessa situação para rãs-touro (Litobathes catesbeianus).

REFERÊNCIAS

BELDEN, L. K.; MOORE, I. T.; WINGFIELD, J. C.; BLAUSTEN, A. R. 2005 Corticosterone and growth in pacific treefrog (*Hyla regilla*) tadpoles. *Copeia*, Washington, 2: 424-430.

- BELDEN, L. K.; WINGFIELD, J. C.; KIESECKER, J. M. 2010 Variation in the hormonal stress response among larvae of three amphibian species. *Journal of Experimental Zoology*, Philadelphia, 313(8): 524-531.
- BRAGA, L. G. T. e S. L. LIMA. 2001 Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw 1802) na fase da recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 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. (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*, London, 62: 2218-2213.
- CHEREL, Y.; ROBIN, J. P.; WALCH, O.; KARMANN, H.; NETCHTALO, P.; LE MAHO, Y. 1988 Fasting in king penguin. Hormonal and metabolic changes during breeding. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 254: 170-177.
- CRESPI, E. J. e DENVER, R. J. 2005 Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 141: 381-390.
- COPPOLA, M. M. e GIL-TURNES, C. 2004 Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34 (4): 1297-1303.
- DENVER, R. J.; GLENNEMEIER, K. A.; BOORSE, G. C. 2002 Endocrinology of complex life cycles: Amphibians. In: *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier Science 2(28) p. 469-513
- DENVER, R. J. 2009 Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 164: 20-31.
- 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*, Amsterdam, 41(7): 1064-1071.
- DILUZIO, N. R. 1985 Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminary of Immunopathology*, Berlin, 8: 387-400.
- EICHER, S. D.; MC KEE, C. A.; CARROLL, J. A.; PAJOR, E. A. 2006 Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs

- and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *Journal of Animal Science*, Champaign 84: 2352–2360.
- FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C; PAIVA-NETO, J. S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.
- FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI JR., J.; PENTEADO, L. A.; RODRIGUES, A. L.; JUSTO, C. L.; CAMPOS, B. E. S. 1987 Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 24: 213-216.
- 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*, São Paulo, 34 (3): 403-412.
- FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C; PAIVA-NETO, J. S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.
- 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*, Amsterdam, 199: 197–227.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: a review. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 66: 365-378.
- GLENNEMEIER, K. A. e DENVER, R. J. 2002 Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, Philadelphia, 292: 32-40.
- GLENNEMEIER, K. A. e DENVER, R. J. 2002b Developmental changes in interrenal responsiveness in anuran amphibians. *Integrative and Comparative Biology*, Oxford, 42: 565-573.
- GUZMÁN, G. A. 1992 Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R.; ALFARO, R. M. *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey. p. 332-337
- HERMAN, C. A. 1992 Endocrinology. In: FEDER, M. E. e BURGGREN, W. W. *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago, The University of Chicago Press. p. 40-54.
- KNOOP, R.; FERREIRA, C. M.; TAKAHASHI, N.; FRANÇA, F. M.; ANTONUCCI, A. M.; TEIXEIRA, P. C.; SUGOHARA, A.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.;

- HIPÓLITO, M. 2011 Influência da incorporação de vitamina C à dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 37: 383-391.
- LE NINAN, F., CHEREL, Y., SARDET, C., LE MAHO, Y., 1988 Plasma hormone levels in relation to lipid and protein metabolism during prolonged fasting in king penguin chicks. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 71: 331–337.
- LEENHOUWERS, J. I.; ADJEI-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*, Amsterdam, 12: 111-116.
- 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*, Amsterdam, 583(2-3): 174-185.
- MOBERG, G. P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P. e MENCH, J. A. *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing, Davis, p. 1-22.
- MOSTL, E. e PALME, R. 2002 Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, Auburn, 23: 67-74.
- NAVA, A. F. In FAO Fisheries and aquaculture department (online). 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em 3 ago. 2012.
- RICIARDELLA, L. F. BLILEY, J. M.; FETH, C. C.; WOODLEY, S. K. 2010 Acute stressors increase plasma corticosterone and decrease locomotor activity in a terrestrial salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). *Physiology & Behavior*, Elmsford, 101: 81–86.
- 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*, Oxford, 13(5): 391-400.
- ROCHA, G. C.; FERREIRA, C. M.; TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; FRANÇA, F. M.; ANTONUCCI, A. M.; MARCANTÔNIO, A. S. LAURETO, M. 2010 Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, 30: 891-896.

- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. 1998 *Immunology*. London, Mosby, United Kingdom.
- ROMERO, L. M. 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 128: 1-24.
- SILVA, J. R. M. C.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S.; JENSCH Jr., B. E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0 °C. *Polar Biology*, Heidelberg, 28(4): 326-328.
- SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. 2009 Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*. São Paulo, 6(1): 817-836.
- TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; ROCHA, G. C.; ANTONUCCI, A. M.; FRANÇA, F. M.; MARCANTÔNIO, A. S.; RANZANI-PAIVA, M. J.; FERREIRA, C. M. 2012 Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, (30): 10.
- VOLMAN J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. 2008 Dietary Modulation of Immune Function by B-Glucans. *Physiology & Behavior*, Elmsford, 94(2): 276-384.
- WENDELAAR-BONGA, E. E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, Bethesda, 77(3): 592-625.
- WADA, H. 2008 Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 156(3): 441-453.
- ZAR, J. H. 1999 *Biostatistical analysis*. 3^a ed. New Jersey, Prentice Hall, 662 p.

CAPÍTULO 2

RESPOSTA HEPÁTICA À SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM PROBIÓTICO E BETAGLUCANA EM RÃ-TOURO SOB CONDIÇÃO DE ESTRESSE POR ADENSAMENTO

RESUMO

Objetivamos avaliar o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana do fungo *Agaricus blazei* em rã-touro submetida à condição de estresse por adensamento. Animais pesando $24,3 \pm 2,38$ g foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos com quatro réplicas simultâneas, sendo: T1: 100 animais/m² (Controle); T2: 236 animais/m²; T3: 236 animais/m², suplementados com probiótico; T4: 236 animais/m², suplementados com betaglucana. Foram avaliadas a sobrevivência (S), ganho em peso (GP), e a condição bioquímica e histopatológica dos fígados. Não foi observada diferença estatística para sobrevivência (97,72%) entre tratamentos ($p > 0,05$), porém foram observadas diferenças significativas para o GP aos 30 dias, entre os tratamentos não suplementados (T1 e T2), e os suplementados (T3 e T4) ($p < 0,001$). As avaliações bioquímicas dos fígados mostraram condições muito próximas entre T1 e T4. A análise histopatológica mostrou diversos tipos de lesões, e rarefação citoplasmática em 100% das amostras, sugerindo deficiência proteica. A betaglucana do fungo *Agaricus blazei* mostrou efeito hepatoprotetor, reduzindo os efeitos do estresse sobre o fígado em rã touro americana, *Lithobates catesbeianus*, porém o probiótico *Bacillus subtilis* não mostrou o mesmo potencial efeito sobre o fígado, nas condições de realização do teste.

Palavras-chave: estresse, adensamento, fígado, suplementação alimentar, probiótico, betaglucana

LIVER RESPONSE TO DIETARY SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC AND BETA-GLUCAN IN AMERICAN BULLFROG UNDER HIGH STORAGE DENSITY

STRESS

ABSTRACT

We aimed to evaluate the hepatoprotective effect of dietary supplementation with the probiotic *Bacillus subtilis* and with beta-glucan extracted from the fungus *Agaricus blazei* in American bullfrog *Lithobates catesbeianus* in condition of high storage density. Animals weighing $24,3 \pm 2,38$ g were randomly assigned to four treatments with four replicates simultaneously: T1: 100 animals/m² (Control); T2: 236 animals/m²; T3: 236 animals/m² supplemented with probiotic; T4: 236 animals/m² supplemented with beta-glucan. We evaluated survival (S), weight gain (WG), and the condition of liver biochemistry and histopathology. There was no statistical difference in survival (97,72%) between treatments ($p > 0,05$), but were observed significant differences for weight gain at 30 days, between not supplemented treatments (T1 and T2) and supplemented treatments (T3 and T4). ($p < 0,001$). Biochemical analysis showed conditions very near among T1 and T4. Histopathological analysis revealed various types of lesions, and cytoplasmic rarefaction in 100% of the samples, suggesting protein deficiency. The beta-glucan extracted of fungus *Agaricus blazei* reduced the effects of stress by high stocking density on American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, and has shown hepatoprotective effect, reducing the stress effects on liver, but the probiotic *Bacillus subtilis* was not effective in reducing the effects of stress, on the conditions of the test.

Keywords: stress, high storage density, liver, dietary supplementation, probiotics, beta-glucan

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 ureia, 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 (COPOLLA e GIL-TURNES, 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.*, 2003; 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 objetivamos avaliar o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucana do fungo *Agaricus blazei* em rã-touro americana submetida 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 e distribuídos em 16 caixas de polipropileno (0,47 x 0,30 x 0,17 m) (BUENO-GUIMARÃES, 1999), inundadas com lâmina d'água de 0,03 m. Foi utilizada água da rede pública, decolorada 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.

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado, composto por quatro tratamentos com quatro replicas simultâneas: Tratamento 1 (controle): densidade de estocagem 100 animais/m² (FERREIRA *et al.*, 2002), sem suplementação alimentar; Tratamento 2: densidade de estocagem de 236 animais/m², sem suplementação alimentar; Tratamento 3: densidade de estocagem 236 animais/m², suplementado com probiótico comercial à base de *Bacillus subtilis* (Cepa C-3102, 10⁹ UFC/g); Tratamento 4: densidade de estocagem 236 animais/m², suplementado com

betaglucana do fungo *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol[®], Cogumelos Valemar, 167 mg/g betaglucana, 40 mg betaglucana livre, 2,4 mg/g proteína, 0,2 mg/g fenol). Ambos suplementos adicionados na proporção de 10g/kg de ração. As densidades de 100 animais/m² e 236 animais/m² 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), duas vezes ao dia. Os suplementos foram misturados à ração por aspersão de 2% de óleo vegetal. O período experimental teve a duração de 30 dias.

Para as avaliações bioquímicas e histopatológicas dos fígados foram coletados aleatoriamente amostras de oito animais no Momento Zero (MZ, correspondente ao primeiro dia do experimento) e de outros oito animais ao final do experimento (dois de cada tratamento). Os animais foram eutanaziados em solução de benzocaína (3 g/L), e em seguida procedeu-se a coleta dos fígados. Parte das amostras de fígados coletadas 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 através 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.*, 2002).

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) expressa em mg SAB/mL (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 absorvância do tetraguaiacol formado na reação enzimática com comprimento de onda de 470 nm (MOERSCHBACHER *et al.*, 1986). A absorvância foi lida em 2 minutos e a atividade específica foi expressa como nKat/mgSAB/g 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 absorvância foi lida em 2 minutos e a atividade expressada como nKat/mgSAB/g 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.

Os cortes histológicos foram preparados através 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.

Os dados foram transformados em $\log(x+1)$ para atender a premissa de normalidade. Para comparação das médias realizamos a análise de variância (ANOVA TWO WAY) seguido dos testes de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1999).

RESULTADOS

Durante o período experimental, a temperatura média foi $23,05 \pm 1,0$ °C não apresentando variações que pudessem interferir nos resultados obtidos (BRAGA e LIMA, 2001).

Aos 30 dias de experimentação o Ganho em Peso (GP) e Sobrevivência (S) média foram $37,55\text{g}\pm 6,92$ e $96,42\%\pm 4,13$ no Tratamento 1; $28,46\text{g}\pm 5,18$ e $98,43\%\pm 1,81$ no Tratamento 2; $13,49\text{g}\pm 7,47$ e $96,87\%\pm 3,13$ no Tratamento 3 e; $16,79\text{g}\pm 1,56$ e $98,43\%\pm 1,81$ no Tratamento 4. Não foram observadas diferenças estatísticas para as médias de Sobrevivência ($p>0,5$), mas a ANOVA fatorial demonstrou diferenças altamente significativas para o GP, entre os tratamentos não suplementados (T1 e T2), e os suplementados (T3 e T4) ($p<0,001$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos hepáticos avaliados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Avaliações bioquímicas de amostras de fígados de rã-touro Americana, *Lithobates catesbeianus*, coletados no Momento Zero (MZ) e ao final do experimento (n = 16)

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

As médias foram comparadas nas colunas onde letras diferentes representam diferenças estatísticas (p<0,05).

MZ – Momento Zero; POD: Peroxidase; PPO: Polifenoloxidase.

T1: Controle, 100 animais/m², sem suplementação alimentar. T2: 236 animais/m², sem suplementação alimentar. T3: 236 animais/m², suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*. T4: 236 animais/m², suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

*: A atividade da enzima Peroxidase foi detectada em níveis próximos de zero.

Os resultados da quantificação de proteínas analisados através da ANOVA evidenciaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para este parâmetro entre MZ e T2. 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 probióticos). A atividade da enzima Peroxidase (POD) no MZ foi de $8,53 \pm 5,06$, porém, aos 30 dias de experimento, a mesma manteve-se em níveis consideráveis apenas em T2 ($2,40 \pm 0,20$), 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 e T4 e mais elevada no T2 e T3.

As alterações morfológicas encontradas nos cortes de fígados durante a análise histopatológica estão descritas na Tabela 2. Foram encontrados diversos tipos de lesões, tendo sido a rarefação citoplasmática detectada em 100% das amostras submetidas aos tratamentos.

Tabela 2: Alterações morfológicas observadas através de análise histopatológica em amostras de fígados de rã-touro Americana, *Lithobates catesbeianus*, coletados no Momento Zero (MZ) e ao final do experimento. (n=16)

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

O símbolo * indica ausência da alteração correspondente. T1: Controle, 100 animais/m², sem suplementação alimentar. T2: 236 animais/m², sem suplementação alimentar. T3: 236 animais/m², suplementado com probiótico à base de *Bacillus subtilis*. T4: 236 animais/m², suplementado com betaglucana do fungo *Agaricus blazei*.

A Figura 1 mostra um corte histológico de uma amostra de fígado do Tratamento 2 (T2), apresentando rarefação do citoplasma, hepatite monolinfocitária e presença de melanomacrófagos.

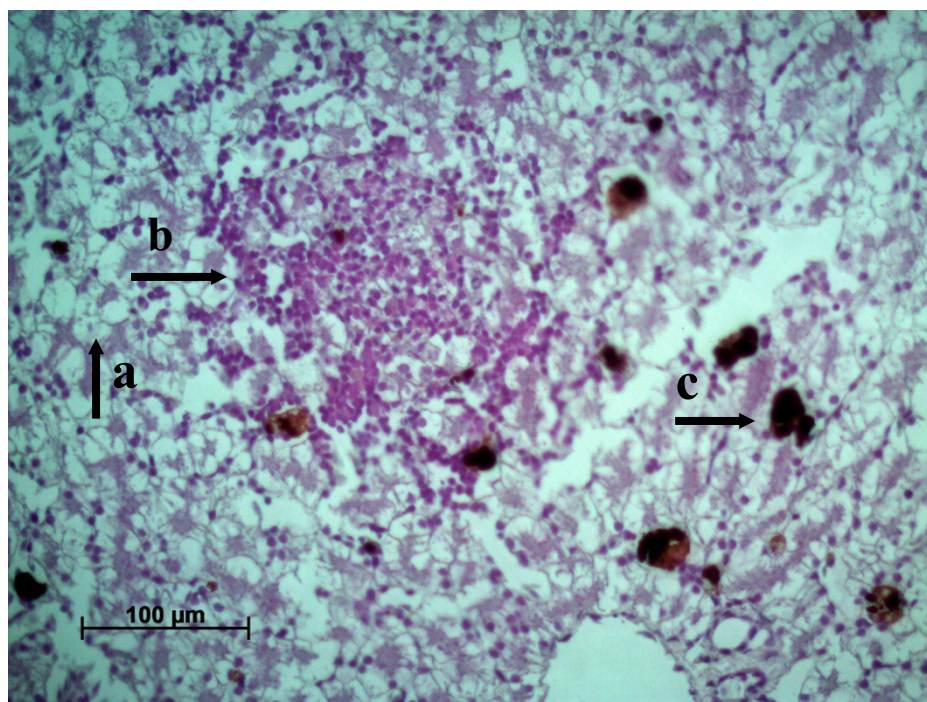


Figura 1: Corte histológico de fígado de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, apresentando rarefação citoplasmática (a), hepatite monolinfocitária (b) e presença de melanomacrófagos (c), visto ao microscópio ótico de transmissão. Escala 100 μm. Coloração Hematoxilina-Eosina.

DISCUSSÃO

Nesse estudo objetivamos avaliar o efeito hepatoprotetor da suplementação alimentar com probiótico *Bacillus subtilis* e com a betaglucona do fungo *Agaricus blazei* em rã-touro submetida à condição de estresse por adensamento. É conhecido que os vertebrados geralmente respondem a esse tipo de estímulo estressor com aumentos nos níveis plasmáticos de glicocorticoides (ROMERO, 2002), corticosterona (GC) no caso de anfíbios (WADA, 2008). Os glicocorticóides desempenham papel importante na mobilização de energia, especialmente durante o estímulo estressor, com aumento na taxa metabólica, redução na ingestão de alimentos, mobilização de

reservas de energia, redução no ganho em peso e crescimento e redução da atividade fagocítica (MOBERG, 2000). Esperávamos que a suplementação com probiótico e betaglucana mostrasse efeito hepatoprotetor, reduzindo a ocorrência de lesões hepáticas.

FONTANELLO *et al.* (1987) afirmam que é comum a ocorrência de altas taxas de sobrevivência para rãs-touro com peso médio acima de 12 g, devido ao fato de já terem passado pela fase crítica da metamorfose. Os animais utilizados nessa experimentação foram escolhidos após esta fase (45 dias) e esta alta taxa de sobrevivência já era esperada, principalmente na condição experimental de laboratório onde se tem maior controle sobre os animais.

Entre os grupos submetidos à condição de estresse por adensamento, os tratamentos não suplementados (T1 e T2) apresentaram maior ganho de 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 betaglucanas 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 ganho de peso 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 os ataques 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

biossíntese 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 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.* (2003) 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, 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, não sofrendo a influência do tempo nos outros tratamentos. A degradação de proteínas, indicada pela produção de fenóis, diminuiu entre o início e o final do experimento, mantendo-se mais elevada em T3.

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. A enzima Peroxidase catalisa reações de oxidação, combatendo os peróxidos, geradores de radicais livres, causadores de lesões celulares. A sua atividade protege as células, mantendo a integridade das mesmas, porém sua intensificação indica estresse oxidativo, aumento da presença de radicais livres, e o aumento na ocorrência de lesões celulares. HIPOLITO *et al.* (2006) afirmam que a intensificação da atividade desta enzima indica maior quantidade de radicais livres, causadores de lesões hepáticas, e também a ocorrência de deficiência nutricional. COTRAN *et al.* (2000) afirmam que o desbalanceamento nutricional pode ser a principal causa de lesões celulares, que podem ser produzidas pela presença de radicais livres durante o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, provocando a fragmentação de proteínas e lipídeos nas membranas celulares.

A Polifenoloxidase sofreu uma diminuição significativa em sua atividade entre MZ e 30 dias, mantendo-se muito próxima entre T1 e T4, e entre T2 e 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 glicocorticóides desempenham um 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 em T2 e 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.

Apesar da utilização da suplementação alimentar, que poderia ter melhorado a condição geral de saúde dos animais, a utilização da ração para peixes, possivelmente com perfil nutricional inadequado à espécie, pode ser umas das causas das lesões hepáticas encontradas neste estudo. O probiótico *Bacillus subtilis* tem mostrado efeitos promissores em 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. A betaglucana do fungo *Agaricus blazei*, com conhecido efeito imunomodulador, hepatoprotetor, e anticancerígeno, mostrou também 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.

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*, Limerick, 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*, Washington, 2: 424-430.
- BRAGA, L. G. T. e S. L. LIMA. 2001 Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw 1802) na fase da recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 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. (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*, London, 62: 2218-2213.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. 2000 *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogam. 1251 p.
- CRAWSHAW, G. J. e WEINKLE, T. K. 2000 Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *Journal of Exotic Pet Medicine*, Philadelphia, 9(3): 165-173.
- COPPOLA, M. M. e GIL-TURNES, C. 2004 Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria. 34(4): 1297-1303.

- DENVER, R. J. 2009 Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 164: 20-31
- DENVER, R. J.; GLENNEMEIER, K. A.; BOORSE, G. C. 2002 Endocrinology of complex life cycles: Amphibians. In: *Hormones, Brain and Behavior. Elsevier Science* 2(28): 469-513.
- DIAS, D. C., M. V. DE STEFANI, C. M. FERREIRA, F. M. FRANÇA, M. J. T. R. PAIVA; A. A. SANTOS. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, Amsterdam, 41(7):1064-1071.
- DILUZIO, N. R. 1985 Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminary of Immunopathology*, Berlin, 8: 387-400.
- DISCHE, Z. Anthrone assay methods. 1962 In: *Carbohydrate Chemistry*. New York, Academic Press, 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*, Qatar, 15: 37-49.
- FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C; PAIVA-NETO, J. S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33:1-15.
- FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI JR., J.; PENTEADO, L. A.; RODRIGUES, A. L.; JUSTO, C. L.; CAMPOS, B. E. S. 1987 Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 24: 213-216.
- 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*, São Paulo, 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*, Amsterdam, 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*, New York, 46:147-159.

- GARTNER, L. P. e HIATT, J. L. 1999 *Tratado de Histologia* - 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 426 p.
- GLENNEMEIER, K. A. e DENVER, R. J. 2002 Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, Philadelphia, 292:32-40.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; 2002 *Tratado de fisiologia médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 611 p.
- HIPOLITO, M.; MARTINS, B. S.; BACH, E. E. 2002 Padronização da metodologia de extração de proteínas hepáticas da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) para eletroforese. In: Encontro brasileiro de patologistas de organismos aquáticos. *Encontro latino-americano de patologistas de organismos aquáticos*, Foz do Iguaçu, p. 33.
- HIPOLITO, M.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; BACH, E. E. 2004 Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Rana Catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 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*, São Paulo, 6(1): 49-56.
- 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*, Barueri, 05: 76-79.
- HODGSON, E. 2004 *A textbook of modern toxicology*. 3ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons Incorporation. 557p.
- LEENHOUWERS, J. I.; ADJEI-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*, Amsterdam, 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*, Maryland, 193: 265-274.
- MAZZONI, R.; CARNEVIA, D.; ALTIERI, W.; MATSUMURA, Y. 1995 Cría de ranas em "Sistema Inundado", experiencias en ranarios comerciales. In: Encontro Nacional de Ranicultura & Technofrog'95. 8. 1995. *Anais...* Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura e UFV, Viçosa, 1: 121-122.

- MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. 1999 The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Sydney, 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*, Amsterdam, 583(2-3): 174-185
- MOBERG, G. P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing: Davis, p. 1-22.
- 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*, Bangalore, 41 (9-10): 32-37.
- PLANAS, M. e CUNHA, I. 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, Amsterdam, 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*, Oxford, 13(5): 391-400.
- ROCHA, G. C.; FERREIRA, C. M.; TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; FRANÇA, F. M.; ANTONUCCI, A. M.; MARCANTÔNIO; A. S. LAURETO, M. 2010 Physiological response of american bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, 30: 891-896.
- ROMERO, L. M. 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 128:1-24.
- SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. 2009 Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, São Paulo, 6(1): 817-836.
- SOUTHERTON, S. G.; DEVERALL, B. J. 1990 Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. *Plant Pathology*, Oxford, 39(2):223-230.
- SRIVASTAVA, S. K. 1987 Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid, and

their implication in disease resistance. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 120(3): 249-254.

SWAIN, R.; HILLIS, W. E. 1959 The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 10: 63-68.

TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; ROCHA, G. C.; ANTONUCCI, A. M.; FRANÇA, F. M.; MARCANTÔNIO, A. S.; RANZANI-PAIVA, M. J.; FERREIRA, C. M. 2012 Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro (In press)

WENDELAAR-BONGA, E. E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, Bethesda, 77(3): 592-625.

WADA, H. 2008 Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, New York, 156(3): 441-453.

ZAR, J. H. 1999 *Biostatistical analysis*. 3^a ed. New Jersey, Prentice Hall, 662 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Probióticos e betaglucanas são exemplos de suplementos alimentares utilizados como imunoestimulantes, e seu uso na aquicultura tem produzido resultados animadores, inclusive relacionados ao aumento do desempenho zootécnico e à redução dos efeitos do estresse. A sua utilização na aquicultura, em especial na ranicultura, pode constituir uma alternativa ao uso de antibióticos, melhorando também os aspectos sanitários da criação, resultado desejável em qualquer exploração animal com fins comerciais.

O probiótico *Bacillus subtilis* tem mostrado efeitos promissores em aquicultura, especialmente no estímulo do sistema imune e no incremento do crescimento e ganho em peso, porém é necessário o uso prolongado para que os resultados sejam visíveis.

A betaglucana do fungo *Agaricus blazei*, com conhecido efeito imunomodulador, hepatoprotetor, e anticancerígeno, mostrou-se também um potencial redutor dos efeitos do estresse, especialmente na redução dos níveis de glicocorticoides.

Apesar da utilização da suplementação alimentar, que poderia ter melhorado a condição geral de saúde dos animais, a utilização da ração para peixes na alimentação da rã-touro, possivelmente com perfil nutricional inadequado à espécie, pode ser uma das causas das lesões hepáticas, inclusive deficiência proteica, encontradas neste estudo. Não existe uma ração comercial específica para rã-touro, e a sua produção não é economicamente viável para as fábricas de ração devido ao baixo volume demandado pelo mercado. No entanto, a suplementação alimentar da ração utilizada visando a redução dos efeitos do estresse mostrou-se uma alternativa razoável para a ranicultura.