

ASPECTOS BIOQUÍMICOS EM FÍGADO DE RÃS-TOURO (*RANA CATESBEIANA* SHAW, 1802) SADIAS E DOENTES*

M. Hipolito¹, A.M.C.R.P.F. Martins¹, E.E. Bach²

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: hipolito@biologico.sp.gov.br

RESUMO

Estudou-se o comportamento bioquímico do fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) sadias e doentes provenientes de criações comerciais, no aspecto de quantificação de proteínas totais e fenóis, atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase, glutatona na relação glutatona oxidada (GSH) e glutatona reduzida (GSSG) e concentração de glicogênio. Os animais sadios apresentaram sempre maior concentração de proteínas totais, menor concentração de fenóis, menor atividade enzimática, maior número na relação glutatona GSH / GSSG e maior concentração de glicogênio, enquanto que os animais doentes apresentaram resultados inversos. As lesões hepáticas caracterizaram-se por deficiência e degeneração protéica e hepatite. Também ficou caracterizada a presença de estresse oxidativo nas células hepáticas decorrentes destas lesões pela relação GSH / GSSG que foi baixa nos animais doentes.

PALAVRAS-CHAVE: Rã-touro, *Rana catesbeiana*, fígado, patologia, bioquímica, estresse oxidativo.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL ASPECTS IN THE LIVER OF HEALTHY AND DISEASED BULLFROG *RANA CATESBEIANA* (SHAW, 1802). The aim of the present study was to evaluate the biochemical aspects of the liver of both healthy and diseased bullfrogs (*Rana catesbeiana*), from commercial froggeries. The concentration of total proteins and phenols, the activity of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes, obtained through spectrophotometry, glutathione, as the ratio of oxidised glutathione (GSH) to reduced glutathione (GSSG), and glycogen concentration were considered. The healthy animals always showed a higher concentration of total proteins, a lower concentration of phenols, a lower enzymatic activity, higher values in the ratio GSH / GSSG glutathione, and a higher concentration of glycogen, while the diseased animals showed opposite values. The hepatic lesions were characterised by proteic deficiency and degeneration, and hepatitis. The presence of an oxidative stress was also found in the hepatic cells from the lesions, with low values of the ratio GSH / GSSG glutathione in the diseased animals.

KEY WORDS: Bullfrog, *Rana catesbeiana*, liver, pathology, biochemic, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

O fígado é, por excelência, o órgão de escolha para se conhecer a condição de saúde geral e nutricional dos animais. Alterações causadas por problemas decorrentes de, principalmente, mau manejo alimentar, além de falhas nos manejos sanitário e zootécnico, ou da presença generalizada de agentes infecciosos refletem em sua estrutura e função.

Observa-se graves alterações hepáticas quanto ao tamanho, cor, forma e textura, causadas por processos de deficiência protéica, intoxicação, envenenamento, micotoxicoses (aflatoxinas), deterioração da ração e degenerativos gerais. Histopatologicamente pode-se observar associado à deficiência protéica vacuolização e rompimento do contorno celular, rarefação e degeneração celular hidrópica; à micotoxicose, congestão

²UNICASTELO, Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e Biológicas, São Paulo, SP, Brasil. Credenciada junto a UNESP, Araraquara (Programa Biotecnologia).

*Da Tese de Doutorado em Biotecnologia, Instituto de Química / UNESP / Araraquara, "Avaliação bioquímica no desenvolvimento da rã-touro *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) tratada com dieta comercial e experimental", Marcio Hipolito, 2004.

sangüínea, degeneração hidrópica e gordurosa; associado à deterioração, rarefação e degeneração celular protéica e hidrópica e à processos infecciosos, áreas focais de hepatite e hepatite intersticial (HIPOLITO, 2001; HIPOLITO, 2003; HIPOLITO *et al.*, 1997, HIPOLITO *et al.*, 2001; ROBERTS, 1978; THE MERCK MANUAL, 1973).

Na alimentação da rã-touro, todo o seu desempenho está baseado na quantidade e na qualidade da proteína presente na ração. Qualquer alteração da função hepática causada pelo alimento, falta de alimento ou de proteínas de boa qualidade ou de aminoácidos mais necessários, disfunções orgânicas gerais provocadas por situações de estresses ou agressões sofridas por agentes infecciosos e parasitários, que possam comprometer de forma grave o fígado, causar lesões. Geralmente são graves e irreversíveis, levando o animal à morte ou ao seu descarte. Para uma perfeita condição de criação animal, o bom desempenho das funções hepáticas é primordial, e o estudo bioquímico destas funções é uma ferramenta auxiliar no diag-nóstico de situações de doenças e mortalidade na rãicultura. Por esse motivo, se fez necessário conhecer o comportamento bioquímico da rã-touro criada intensivamente sob o aspecto comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

As rãs-touros sadias foram provenientes de ranário de Bragança Paulista, criadas no sistema inundado, alimentadas com ração contendo 40% de proteína bruta. Após o lote alcançar a média do peso esperado foram abatidas de acordo com as normas sanitárias exigidas pela fiscalização. A densidade média utilizada neste ranário foi de 50 animais por m² em tanques de aproximadamente 10 m². Quanto aos animais considerados doentes, foram provenientes de casos de mortalidade ou com alterações no desenvolvimento esperado, vindos de diferentes ranários situados no Estado de São Paulo, nos municípios de Mogi das Cruzes, Jundiaí e Pindamonhangaba. Estes animais

também foram alimentados com rações comerciais, contendo 40% e 36% de proteína bruta. A densidade média utilizada por estes ranários também foi de 50 animais por m² em tanques de diferentes tamanhos. Todos os animais provenientes dos ranários comerciais foram criados dentro das boas práticas de criação animal.

A procedência, condição sanitária e identificação dos grupos são apresentados no Quadro 1.

Em cada grupo de animais sadios foram avaliados 50 animais para os doentes, foram grupos de 20 animais.

Os fígados dos animais sadios foram coletados na linha de abate.

Os animais doentes foram provenientes de três diferentes situações de mortalidade, que aconteceram na fase de engorda. Na sua maioria foram recebidos vivos na fase pré-agônica ou recém-mortos. Quando chegaram vivos foram insensibilizados por concussão craniana e sacrificados por corte da medula nervosa cervical (AVMA, 1993).

Todos os exemplares foram examinados externamente e a seguir necropsiados, observando suas lesões internas e principalmente o fígado no aspecto de cor, tamanho e consistência. As amostras de fígado foram coletadas e mantidas parte sob congelamento até o preparo do pó cetônico e parte fixada em formalina 10% em tampão fosfato para a histopatologia. Na histopatologia foram emblocados em parafina, feitos cortes com espessura de 5 µ, corados pela hematoxilina / eosina e as lâminas observadas sob transmissão de luz em microscópio óptico comum.

A extração de proteínas foi feita a partir de um grama de fígado de cada animal, triturado em gral mantido sob refrigeração (4° C) com N₂ líquido e lavado com acetona mantida em freezer (-18° C), sendo em seguida filtrado em papel-filtro. O pó cetônico resultante foi seco e conservado sob congelamento. A ressuspensão foi com tampão fosfato 0,1 M pH 7.0 mais 0,25 % de ácido cítrico. Este extrato ressuspensionado foi novamente filtrado e estocado até a análise. (HIPOLITO *et al.*, 2002).

Quadro 1 - Relação da procedência, condição sanitária e dos grupos dos animais.

Procedência	Condição sanitária / grupo	Identificação do grupo
Mogi das Cruzes	Doentes. Ranário 1/ Grupo 1	10
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 1	11
Jundiaí	Doentes	12
Mogi das Cruzes	Doentes. Ranário 1/ Grupo 2	13
Pindamonhangaba	Doentes	14
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 2	15
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 3	16

Grupos 1 e 2: dois envios diferentes de animais doentes.

Lotes 1, 2 e 3: três coletas diferentes em abatedouro.

Quadro 2 - Resultados da visualização e da histopatologia do fígado.

Procedência	Condição sanitária / grupo	Identificação do grupo	Visualização / histopatologia
Mogi das Cruzes	Doentes Ranário 1 Grupo 1	10	Alteração de cor, descoloridos, amarelados até enegrecidos, friáveis, aumentados de tamanho e perda das bordas afiladas (Fig. 2). Degeneração celular e deficiência protéica; hepatite (Fig. 4).
Bragança Paulista	Sadios para abate Lote 1	11	Normais na cor, consistência, aspecto e tamanho. Sem lesões histopatológicas
Jundiaí	Doentes	12	Alterações na cor. Degeneração e deficiência protéica.
Mogi das Cruzes	Ranário 1 Grupo 2	13	Alteração de cor, descoloridos, amarelados e até enegrecidos, friáveis, aumentados de tamanho e perda das bordas afiladas. Degeneração e deficiência protéica; hepatite.
Pindamonhangaba	Doentes	14	Descoloração, amarelados e enegrecidos, friáveis (Fig. 1). Degeneração celular e deficiência protéica (Fig. 5).
Bragança Paulista	Sadios para abate Lote 2	15	Descoloração. Sinais evidentes de deficiência protéica e vacuolização dos hepatócitos (Fig. 3).
Bragança Paulista	Sadios para abate Lote 3	16	Descoloração. Sinais evidentes de deficiência protéica e vacuolização dos hepatócitos.

(Figs. 1 a 5)

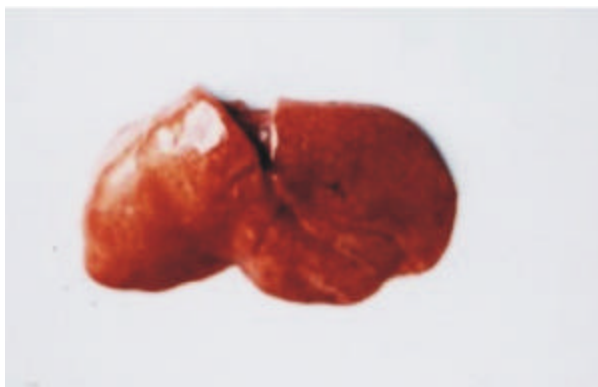


Fig. 1 - Alteração de cor. Animais provenientes de Pindamonhangaba.

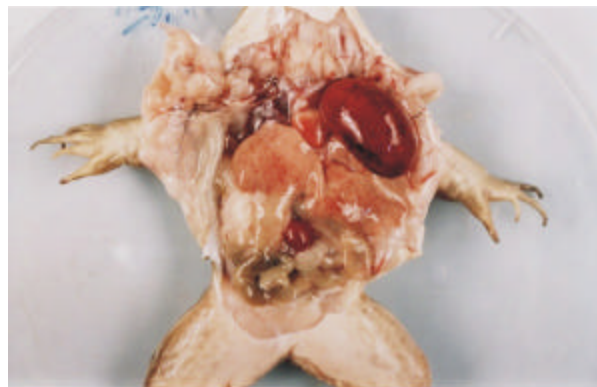


Fig. 2 - Grave alteração de cor. Animais Provenientes de Mogi das Cruzes. Grupo 2.

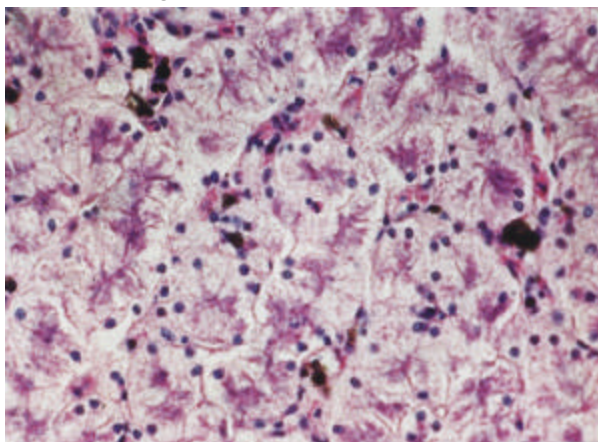


Fig. 3 - Deficiência protéica. Animais provenientes de Bragança Paulista. Lote 2. Coloração por Hematoxilina-Eosina. Aumento de 52,5x.

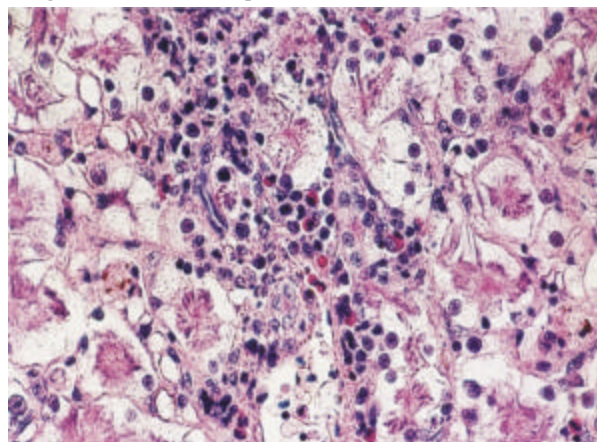


Fig. 4 - Degeneração celular, deficiência protéica e hepatite. Animais provenientes de Mogi das Cruzes. Grupo 1. Coloração por Hematoxilina-Eosina. Aumento de 52,5x.

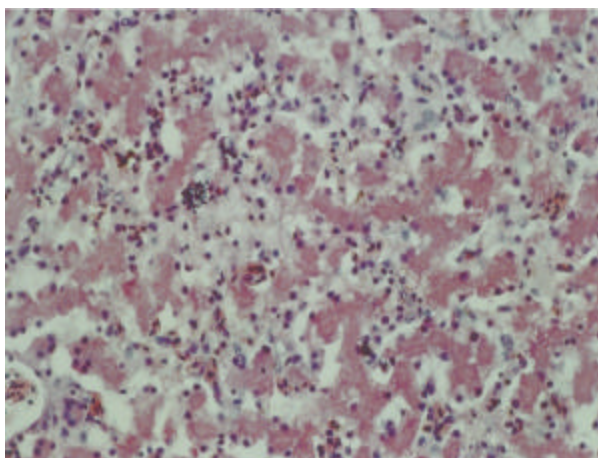


Fig. 5 - Degeneração celular e deficiência protéica. Animais provenientes de Pindamonhangaba. Coloração por Hematoxilina-Eosina. Aumento de 26,25x.

A quantificação de proteínas foi determinada de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) usando soro-albumina bovina como padrão e fenóis foi determinado com o reativo de Folin-Ciocalteu, usando ácido clorogênico como padrão (SWAIN & HILLIS, 1959).

As atividades enzimáticas *in vitro* da peroxidase e da polifenoloxidase foram determinadas em espectrofotômetro computadorizado. Para a peroxidase, sua atividade foi determinada medindo-se a variação de absorbância do tetraguaiacol formado na reação enzimática com comprimento

de onda de 470 nm (MOERSCHBACHER *et al.*, 1986). A absorbância foi lida em 2 minutos e a atividade específica foi expressa como nKat / mgSAB / 1 g de fígado (SOUTHERTON & DEVERALL, 1990). Para a atividade da polifenoloxidase, mediu-se a variação de ortoquinona formado na reação enzimática com comprimento de onda de 495 nm. A absorbância também foi lida em 2 minutos e a atividade expressada como nKat / mgSAB / 1 g de fígado (SRIVASTAVA, 1987).

A determinação da glutathiona GSH (glutathiona oxidada) e da GSSG (glutathiona reduzida) foi feita por kit da empresa Immunobiological Laboratories (IBL) de Hamburg, Alemanha, utilizando-se placa de teste de ELISA.

A dosagem do glicogênio foi baseada na reação do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) com açúcares redutores segundo MILLER (1959), e feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Para a análise estatística, os resultados foram analisados por teste -t (Student's) através do programa Origin (ANOVA).

RESULTADOS

Quanto ao aspecto externo (Figs. 1 e 2) e histopatológico do fígado (Figs 3, 4 e 5), os resultados estão apresentados no Quadro 2.

Quanto aos resultados dos testes bioquímicos, estes são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Médias dos testes bioquímicos para quantificação de proteínas totais e de fenóis; atividade enzimática de peroxidase e polifeniloxidase e glicogênio extraído do fígado de rãs.

Procedência	Condição sanitária / grupo	Identificação do grupo	Proteínas (mg SAB ¹)	Fenóis.(mg ácido clorogênico ¹)	Ativ. Peroxidase (nkat ¹)	Ativ. Polifenoloxidase (nkat ¹)	Glicogênio (g ²)
Mogi das Cruzes	Doentes. Ranário 1 / Grupo 1	10	18,84 ^a	8,25a	0,955a	0,207a	5,22a
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 1	11	36,04b	1,84b	0,200b	0,009b	38,33b
Jundiaí	Doentes. Ranário 1 / Grupo 2	12	24,80c	8,97c	0,965a	0,238c	3,55c
Mogi das Cruzes		13	23,46d	8,19d	1,047c	0,206a	2,23d
Pindamonhangaba	Doentes.	14	18,84 ^a	7,14e	0,924d	0,299d	8,20e
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 2	15	15,40e	10,02f	0,856e	0,120e	2,52d
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 3	16	22,50f	10,20f	0,917d	0,115e	3,40c

Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente entre si à nível de 0,05%.

¹Concentrações de proteínas e de fenóis e atividades enzimáticas - por grama de fígado.

²Para glicogênio - por kg de fígado.

Tabela 2 - Médias de GSH e GSSG em μM (por grama de fígado de rã).

Procedência	Condição sanitária / grupo	Identificação do grupo	GSH (μM)	GSSG(μM)	GSH / GSSG
Mogi das Cruzes	Doentes.Ranário 1Grupo 1	10	4,80a	6,20a	0,77a
Bragança Paulista.	Sadios para abate. Lote 1	11	14,66b	4,86b	3,02b
Jundiá	Doentes.	12	2,30c	6,60c	0,35c
Mogi das Cruzes	Ranário 1Grupo 2	13	3,45d	5,85d	0,59d
Pindamonhangaba	Doentes.	14	5,80e	6,30a	0,92e
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 2	15	3,76f	5,98d	0,63f
Bragança Paulista	Sadios para abate. Lote 3	16	5,36g	6,65c	0,81g

Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente à nível de 0,05%.

Relação GSH / GSSG: Média de duas repetições.

DISCUSSÃO

Os resultados das provas bioquímicas mostram alterações significativas na concentração de proteínas e de fenóis, nas atividades enzimáticas e na quantificação de glicogênio. Nota-se que os fígados considerados normais (sadios do Lote 1 de Bragança Paulista) apresentaram uma maior quantidade de proteínas, menores atividades enzimáticas da peroxidase e da polifenoloxidase e maior concentração de glicogênio quando comparados com os fígados lesados (Tabela 1).

A menor quantidade de proteína está associada às lesões (degeneração celular) e a maior função enzimática pode estar relacionada com alterações nos mecanismos de retroalimentação.

A diferença também é notada nos resultados de concentração de proteína total e de fenóis, que apresentaram uma relação inversa, quanto menor a concentração de proteínas totais, maior é a concentração de fenóis, mostrando que este está mais presente quando há, de algum modo, um menor metabolismo protéico.

Isto pode estar associado à fonte de proteínas na ração que não suprem as necessidades de aminoácidos do animal ou à inapetência dos animais pela doença.

Quanto maior é a lesão do fígado, mais significativas são estas diferenças, e quando o fígado está aparentemente normal, as diferenças são poucas. Isto pode ser notado no caso dos animais provenientes de Bragança Paulista. O Lote 1, de animais sadios para abate e sem alterações e lesões hepáticas apresentaram os resultados bioquímicos bem diferentes dos animais positivamente doentes. Os Lotes 2 e 3, considerados sadios para o abate, mas com alterações e lesões hepáticas menos pronunciadas que os doentes, apresentaram valores diferentes dos animais do Lote 1, por vezes fugindo dos resultados dos animais doentes, ficando numa posição intermediária (Tabela 1).

Seus resultados mostraram que estão sofrendo alterações hepáticas, mas ainda não demonstraram doença visível que se manifestaria se continuassem a

viver. Estas alterações nos Lotes 2 e 3 de Bragança Paulista, podem ser decorrente de situação de agressão pontual no aspecto nutricional. Estes lotes foram criados nas mesmas condições e alimentados com o mesmo tipo de ração, mas de partidas diferentes, que o Lote 1, e abatidos em épocas diferentes. Não houve notificações de qualquer intercorrência grave ou prática inadequada de manejo no histórico destes 3 lotes.

Para os animais das outras procedências, pelas agressões serem mais graves, como processo infeccioso secundário (proveniente de erro de manejo zootécnico) presente nos animais de Mogi das Cruzes e como oportunistas nos de Pindamonhangaba (causado por erro no manejo sanitário), com alta mortalidade em pouco tempo, as lesões hepáticas foram mais pronunciadas, e conseqüentemente os resultados das provas bioquímicas ficaram bem afastados dos animais considerados sadios (Tabela 1).

A presença quase que constante de vacuolização celular-degeneração protéica no diagnóstico histopatológico pode indicar que a qualidade da ração esteja imprópria, pois mesmo se os animais estão comendo o volume esperado, não estão aproveitando a proteína da ração, por ser de baixa qualidade, não ter os aminoácidos necessários em quantidade suficiente ou estar abaixo da quantidade anunciada. Pode também ser indicativo de um mal estado geral dos animais, pois uma das primeiras manifestações de problema é a inapetência.

A vacuolização celular-deficiência protéica também é evidenciada pela baixa concentração de proteína observada nos fígados lesados.

Nos animais sadios do Lote 1 de Bragança Paulista, a concentração encontrada de glicogênio no fígado (Tabela 1) está bem próximas dos 57,8 g / kg observados por STÉFANI (1966) e dos 39,4 g / kg encontrados por STEINER *et al.* (2000), ambos para a rã-touro. A baixa concentração de glicogênio nos animais doentes deve ser decorrente da lesão celular, pois há menos células para seu armazenamento e também por necessidade bioquímica, pois o animal não se alimentando, está consumindo suas reservas.

A presença mais elevada da enzima peroxidase nos animais doentes em relação aos sadios (Tabela 1), e também a baixa relação da glutathione GSH / GSSG nestes animais doentes (Tabela 2), mostra que também está se manifestando um estresse oxidativo nestas células, decorrente da má função metabólica hepática. STOREY (1996) afirmou que os níveis de glutathione nas células e o efeito do estresse na razão GSH / GSSG pode ser correlacionado com estresse oxidativo imposto sob diferentes sistemas metabólicos e o nível de defesas antioxidantes mantidas por diferentes organismos. Quanto maior a relação GSH / GSSG maior seria a saúde hepática, pois menos lesado está o fígado (Yu et al., 1999). Isto foi observado nos fígados dos animais sadios do Lote 1 de Bragança Paulista, que apresentaram a maior relação GSH / GSSG (Tabela 2) por não terem o fígado lesado.

A diminuição nesta relação indicaria a ocorrência de um estresse oxidativo, estando relacionado a ele várias enzimas, entre elas a GSH-peroxidase (SIES & AKERBOOM, 1984). Nota-se que foi observado que, quando houve um aumento na relação GSH / GSSG, a atividade da enzima peroxidase diminuiu.

O resultado anátomo-histopatológico do fígado, juntamente com as provas de quantificação de proteínas, fenóis, glicogênio e de atividades enzimáticas, e da quantificação da relação glutathione GSH / GSSG, devem ser analisadas associadas às outras lesões presentes nos demais órgãos, além de exames complementares, e junto com o histórico do caso para poder se chegar a um diagnóstico preciso da causa da doença / mortalidade. Este estudo bioquímico pode ser também voltado para um aprimoramento da formulação da ração, escolha da melhor composição e matérias-primas, melhorando o desempenho nutricional da rã-touro.

Fica difícil fazer comparações, pois não existem dados sobre a rã-touro, e mesmo que houvessem, os estudos seriam baseados em situações totalmente diferentes das nossas criações intensivas de rã-touro. Esta falta de informações foi um dos motivos primordiais para se conhecer estes dados bioquímicos.

CONCLUSÃO

O conhecimento destes resultados bioquímicos comparados com os encontrados em outras situações de doença / mortalidade, diferentes ou não destas, ou comparados com dados de animais sadios, servirão de balizadores para um melhor desenvolvimento do complexo evento que é a nutrição da rã-touro e consequentemente maior crescimento da ranicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.V.M.A. 1993 Report of the A.V.M.A. Panel for euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.202, n.2, p.229-249, 1993.
- HIPOLITO, M. Alterações hepáticas: problemas nutricionais? In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 11., 2001. Bragança Paulista, SP. *Anais. Bragança Paulista: ABETRA / Ranário Beija-Flor*, 2001. p.49.
- HIPOLITO, M. Deficiência protéica e demais patologias associadas ao fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Bol. Tec. Inst. Pesca*, v.34, p.29-33, 2003.
- HIPOLITO, M.; LEME, M.C.M.; BACH, E.E. Lesões anátomo-histopatológicas em rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) associadas à deterioração da ração. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.68, n.1, p.111-114, 2001.
- HIPOLITO, M.; LEME, M.C.M.; MALLOZZI, M.A.B. Micotoxicose pela Aflatoxina B₁ em rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.64, n.2, p.81-86, 1997.
- HIPOLITO, M.; MARTINS, B.S.; BACH, E.E. 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, 7., ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3., 2002. Foz do Iguaçu, PR. *Resumos. Foz do Iguaçu: ABRAPOA*, 2002. p.33.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-274, 1951.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, p.426-428, 1959.
- MOERSCHBACHER, B.M.; HECK, B.; KOEGL, K.H.; OBST, O.; REISNER, H.J. An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Z. Naturforsch.*, v.41, p.32-37, 1986.
- ROBERTS, R.J. The pathophysiology and systematic pathology of Teleosts. In: ROBERTS, R.J. (Ed.). *Fish pathology*. London: Bailliere Tindall, 1978. p.55-91.
- SIES, H. & AKERBOOM, T.P. Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol.*, v.105, p.445-451, 1984.
- SOUTHERTON, S.G. & DEVERALL, B.J. Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. *Plant Pathol.*, v.39, p.223-230, 1990.
- SRIVASTAVA, S.K. Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid, and their implication in disease resistance. *J. Phytopathol.*, v.120, p.249-254, 1987.
- STÉFANI, M.V. *Metabolismo e crescimento de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) alimentadas com níveis crescente de carboidratos*. Jaboticabal: 1996. 92 p. [Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Est. Paulista].

- STEINER, A.A.; PETENUSI, S.O.; BRENTAGANI, L.G.; BRANCO, L.G. The importance of glucose for the freezing tolerance / intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. *Rev. Bras. Biol.*, v.60, n.2, p.321-328, 2000.
- STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.29, p.1715-1733, 1996.
- SWAIN, R. & HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, v.10, p.63-68, 1959.
- THE MERCK VETERINARY MANUAL. Rahmay: Merck, 1973. 1056p.
- YU, J.-C.; JIANG, Z.-M.; LI, D.-M. Glutamine: a precursor of glutathione and its effects on liver. *World J. Gastroenterol.*, v.5, n.2, p.143-149, 1999.
- Recebido em 13/4/04
Aceito em 13/5/04