UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Respostas imune inatas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com β-glucano em protocolos de alimentação pulsada e desafiados com LPS

Dayanne Raule Jordão

Jaboticabal, São Paulo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Respostas imune inatas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com β-glucano em protocolos de alimentação pulsada e desafiados com LPS

Dayanne Raule Jordão

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2022

Jordão, Dayanne Raule
J82r Respostas imune inatas de pacus (Piaractus mesopotamicus) alimentados com dieta suplementada com β-glucano em protocolos de alimentação pulsada e desafiados com LPS / Dayanne Raule Jordão. – – Jaboticabal, 2022
vi, 81 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2022
Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Raphael Barbetta de Jesus, Mariana Maluli Marinho de Mello
Bibliografia

1. Protocolo alimentar. 2. Imunoestimulantes. 3. β-glucano. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Respostas imune inatas e metabólicas de pacus (Piaractus mesopotamicus) juvenis alimentados com dieta suplementada com β-glucano em protocolos de alimentação pulsada e desafiados com LPS

AUTORA: DAYANNE RAULE JORDÃO
ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP

Dr. RAPHAEL BARBETTA DE JESUS (Participação Virtual)/Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP

Profa. Dra. MARIANA MALULI MARINHO DE MELLO (Participação Virtual)/SESI, Ribeirão Preto-SP

Jaboticabal, 29 de julho de 2022

Centro de Aqüicultura da Unesp
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal SP Brasil
Tel 55 16 32032110 ramal 214 fax 55 16 32032268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

DEDICATÓRIA

À minha avó e minha mãe que me ensinaram, com amor, muito sobre a vida. E sempre estiveram e estarão ao meu lado, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos meus Orixás por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço à minha avó, minha mãe, meu pai e meu irmão por todo apoio durante esta jornada.

A minha família e amigos próximos, em especial Rita e Geraldo que se fizeram sempre presentes.

À professora Elisabeth Urbinati por todo carinho e ensinamentos nestes anos de mestrado por ter me acolhido como aluna, sido tão compreensiva e paciente em todos momentos. Ela é, sem dúvidas, um exemplo a ser seguido.

Agradeço aos amigos do LAFIPE, Adriana, Áurea, Allan, Beatriz, Camila, Eduardo, Fábio, Juliana, Raíssa, Thais Daltoso, Thais Lucato que foram fundamentais durante minha caminhada, obrigada por todos ensinamentos e momentos juntos, aprendi muito com cada um, foi incrível. E é claro a nossa técnica Damares, sempre nos fazendo sorrir.

A todos funcionários da UNESP e CAUNESP, que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

A todos os professores da instituição que tanto me ensinaram nestes 2 anos.

A todos professores que passaram pela minha vida, por todos ensinamentos.

A todos professores e colegas do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) do curso de veterinária, pela qual me formei e tenho muito carinho.

Ao meu amigo de infância e hoje meu professor de inglês, Willy, meu agradecimento por ter ficado ao meu lado neste projeto desde antes do início.

A todos meus amigos que estão ao meu lado sempre, por serem tão compreensivos, acolhedores e claro, divertidos. Em especial, Bruno, Camila Diego, João, Matheus, Raphael, Rita, Samantha, Taísa.

Dos amigos que o mestrado me deu, eu não poderia deixar de fazer um agradecimento especial para eles que me acompanharam diariamente, literalmente em baixo de sol e chuva, que fizeram coletas e inúmeras análises e não cansaram de falar “calma Day”, “respira”. Obrigada por tanto ensinamentos e

pela eterna amizade. Obrigada pela amizade dentro e fora da faculdade, que levarei para a vida. Amo vocês, Beatriz Ullian, Camila Faria e Fábio Gonçales.

A empresa “Prevet – Sanidade Aquicola” a qual me concedeu estágio durante a graduação, em especial a Andressa e Breno que tanto me ensinaram.

A empresa Biorigin pelo β-glucano utilizado na pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA **4**
AGRADECIMENTOS **5**
APOIO FINANCEIRO **7**
RESUMO **10**
ABSTRACT **11**
REVISÃO DE LITERATURA **12**
1. Panorama da aquicultura no Brasil 12
2. Pacu 12
3. Sistema imune de peixes 13
4. Imunoestimulantes 14
REFERÊNCIAS **17**
CAPÍTULO 1 ..... **23**
RESUMO **24**
ABSTRACT **25**
1. INTRODUÇÃO **26**
2. MATERIAIS E MÉTODOS **27**
2.1 Animais e delineamento experimental 27
2.2. Dieta experimental 28
2.3. Amostragens 29
2.3. Métodos de análises 29
2.3.1. Determinação de indicadores de estresse 29
2.3.2. Indicadores de imunidade inata 30
2.3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos 30
2.3.2.2. Atividade sérica da lisozima 30
2.3.2.3. Atividade do sistema complemento 30
2.3.2.4 Perfil de células sanguíneas circulantes 31
2.3.3. Indicadores metabólicos 31
2.3.3.1 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol 31

2.4. Análise estatística..... 31
3. RESULTADOS 31
3.1.1. Concentrações plasmáticas de glicose e cortisol..... 32
3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL), atividade sérica da lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC_{50})..... 33
3.3.1. Contagem total de leucócitos e linfócitos 36
3.4.1 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol..... 38
4. DISCUSSÃO.....40
5. CONCLUSÃO 41
6. REFERÊNCIAS 42
7. ANEXO 1 45

RESUMO

A procura por uma alimentação mais saudável influencia o crescimento do cultivo de peixes. O pacu *(Piaractus mesopotamicus),* uma espécie nativa de peixes redondos, é um dos mais vendidos no mercado nacional. O cultivo de peixes em cativeiro capacita a criação de um número maior de animais em menor espaço, o que por si só é estressante, e, somado aos manejos diários, pode resultar em imunossupressão e maior susceptibilidade a doenças. Por isso indica-se o uso de imunoestimulantes para aumentar a resistência dos peixes às doenças, tais como o β-glucano que é capaz de melhorar a resposta imune dos animais. Por isso, o presente estudo avaliou protocolos de administração do imunoestimulante, na dose 0,1%, adicionado a ração comercial. Os tratamentos foram: 1- alimentação contínua com ração comercial por 28 dias; 2- alimentação contínua com ração suplementada com β-glucano por 28 dias; 3- alimentação alternada / uma semana com β-glucano e uma semana sem; 4- alimentação alternada / uma semana sem e semana com; 5-duas semanas seguidas com imunoestimulante e duas últimas sem; 6- alimentação alternada / duas semanas sem e duas com. Ao final do período experimental, os peixes foram amostrados para coleta de sangue e tecidos e determinação de indicadores do estresse (cortisol plasmático e glicose), indicadores da imunidade inata (atividade sérica da lisozima, atividade sérica do sistema complemento, atividade respiratória de leucócitos) e metabólicos (colesterol, triglicerídeos e gordura). Após uma amostragem (inicial), os peixes foram inoculados com injeção intraperitoneal com 1,5 mg kg^{-1} de LPS (*E. coli*) e amostrados 3, 6 e 24 horas depois. Os resultados mostraram que os protocolos e o β-glucano não modificaram os níveis de glicose no sangue, mas apenas a inoculação aumentou estes níveis, 6 h depois. Os níveis de cortisol oscilaram sem um padrão definido, mas tenderam a diminuir, em geral, 24 h após o LPS. As oscilações observadas nos indicadores imunológicos não apresentam padrão claro ou definido. Houve leucopenia e linfopenia após inoculação do LPS, bem como aumento nos valores de triglicerídeos e colesterol circulantes. A oferta de β-glucano nos diferentes protocolos, seguindo um padrão pulsado não mostrou vantagem de nenhum deles.

Palavras chave: Aquicultura, protocolos alimentares, imunoestimulantes, lipopolissacarídeo, β-glucano.

ABSTRACT

The demand for a healthier diet influences the growth of fish farming. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a native species of round fish, is one of the most important in the national market. The farming of fish enables a larger number of animals in a smaller space, which is stressful, and, in addition to daily management, can result in immunosuppression and greater susceptibility to diseases. Therefore, it is indicated the use of immunostimulants to increase the resistance of fish to diseases, such as the β-glucan which can improve the immune response of animals. Thus, the present study evaluated protocols of immunostimulant administration (0.1%) added to the commercial feed. The treatments were: 1- continuous feeding with commercial feed for 28 days; 2- continuous feeding with feed supplemented with β-glucan for 28 days; 3- alternating feeding / one week with β-glucan and one week without; 4- Alternating feeding/ one week without and week with; 5-two weeks in a row with immunostimulant and last two without; 6- Alternate feeding / two weeks without and two with. At the end of the experimental period, the fish were sampled for collection of blood and tissues and determination of stress indicators (plasma cortisol and glucose), indicators of innate immunity (serum lysozyme activity, serum activity of the complement system, respiratory activity of leukocytes) and metabolic (cholesterol, triglycerides and fat). After sampling (initial), the fish were inoculated with intraperitoneal injection with 1.5 mg kg^{-1} of LPS (*E. coli*) and sampled 3, 6 and 24 h after. The results showed that the protocols and the β-glucan did not modify blood glucose levels, but only inoculation increased the levels 6 h later. The cortisol levels fluctuated without a clear pattern, but they tended to decrease in general 24 h after LPS. The oscillations observed in the immunological indicators did not show a clear or defined pattern. There was leukopenia and lymphopenia after LPS inoculation, as well as an increase in circulating triglyceride s and cholesterol values. The supply of β-glucan in the different protocols, following a pulsed pattern showed no advantage of any of them.

Key words: Aquaculture, feeding protocol, immunostimulants, lipopolysaccharide, β-glucan.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Panorama da aquicultura no Brasil

Por ser uma fonte de proteína de qualidade e alto valor nutricional, o peixe tem maior procura a cada ano (Jensen et al., 2014; Peixe BR 2021) e contribui diretamente para a segurança alimentar em diversas regiões do mundo (FAO, 2006), gerando renda para cerca de 20 milhões de pessoas em todo planeta (FAO, 2020). A aquicultura é uma prática milenar, que vem crescendo no mundo todo, inclusive no Brasil, panorama diferente da pesca extrativista, cujo crescimento está estagnado nos últimos anos. A aquicultura ultrapassou a pesca extrativista em produção, atingindo 114,5 milhões de toneladas em 2020 (FAO, 2021). A proteína oriunda de animais aquáticos foi responsável por 17% da alimentação mundial no último ano, enquanto em alguns países asiáticos e africanos estes valores se aproximam de 50%, representando um recorde na produção de peixes, que atingiu 214 milhões de toneladas em 2020 (FAO, 2022).

Em 2020, a aquicultura brasileira produziu 802 mil toneladas de peixe, um aumento de 5,9% em relação ao ano anterior (Peixe BR 2021), enquanto a exportação apresentou um crescimento de 71% em relação ao ano anterior resultando em um lucro de 5,7 milhões de reais, tornando o Brasil um dos maiores produtores e exportadores, sendo o 4 colocado no ranking mundial (Peixe BR 2021). O mercado brasileiro de peixes é complexo e diversificado, tendo em vista a grande variedade de espécies. Os peixes redondos se destacam dentre os mais cultivados (Flores e Pedroza-Filho, 2014) e, particularmente, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com destaque nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Peixe BR 2021).

2. Pacu

Da família *Characidae*, o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), é um peixe de água doce, nativo da América do Sul. Possui hábito alimentar onívoro, preferencialmente frutívoro. A espécie desempenha a importante função de dispersar sementes e contribuir para regeneração ambiental (Urbinati e Takahashi, 2020). Ela é muito estudada e produzida no Brasil, pois apresenta

ótimas características nutricionais e sensoriais, além de bom crescimento em cativeiro e grande importância comercial (Valladão et al., 2018). Seu cultivo em cativeiro é facilitado pela boa aceitação de ração comercial (Urbinati e Takahashi, 2020), porém a produção intensiva pode provocar situações estressantes, ocasionando perdas na produção.

A produção em larga escala de peixes pode acarretar sérios problemas se não realizada da maneira adequada. O estresse, devido a manipulações frequentes e necessárias na piscicultura, pode causar diminuição da imunidade, o que afeta a susceptibilidade a doenças (Urbinati e Carneiro, 2004). Com o crescimento da produção, os riscos de doenças aumentam e o desenvolvimento de um pacote tecnológico é uma realidade necessária. O uso de diversos imunoestimulantes se destaca na criação de peixes, pois apresentam resultados satisfatórios na prevenção de doenças (Ciji et al., 2021)

3. Sistema imune de peixes

O sistema imune dos peixes é dividido em dois subsistemas, o sistema imune inato e o adquirido (Smith et al., 2019; Sahoo et al., 2021). Os peixes contam com a imunidade inata ou inespecífica para defendê-los na primeira exposição contra o patógeno (Bols et al., 2001), enquanto a imunidade adquirida é desenvolvida algum tempo após a exposição ao patógeno em função da especificidade e memória (Carey et al., 1999). A resposta imune inata em peixes é mais importante que a adquirida, quando comparada a mamíferos pela interação com o meio ambiente e patógenos presentes (Uribe et al., 2011).

Em ambientes com equilíbrio sanitário adequado, a imunidade inata é suficiente para proteção animal (Ellis, 1999), e em ambientes muito afetados por poluição, estressores ou bactérias, esse sistema é de fundamental importância para uma primeira defesa, mas também para criação da imunidade adquirida (Rombout et al., 2011).

Os mecanismos de defesa primária e morfologia celular em peixes são homólogos aos dos mamíferos, com raras exceções (Ainsworth, 1994; Rauta et al., 2012). Peixes não possuem medula óssea nem linfonodos, por isso essa

função protetora é realizada pelos tecidos e órgãos linfoides, como baço, rins e tecidos linfoides (Biller-Takahashi et al., 2014).

A defesa primária conta com componentes físicos, dentre os quais: pele, brânquias, escamas, muco e epitélio intestinal, e também componentes celulares como trombóticos, leucócitos (macrófagos e granulócitos, como basófilos e eosinófilos) e células citotóxicas (natural killers) (Ellis, 1999; Raulet, 2004; Secombes, 1996). No processo de fagocitose dos patógenos, há aumento do consumo do oxigênio, por aumento da atividade respiratória dos leucócitos e ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), com a redução de O_2 a H_2O_2. Esses radicais livres são responsáveis pela destruição do patógeno (Verlhac, 1997; Rauta et al., 2012; Biller-Takahashi et al., 2014).

Além dos componentes descritos, o sistema imune inato tem componentes humorais, como as proteínas do sistema complemento, enzimas antimicrobianas e mediadores não específicos como interferons e interleucinas (Ellis, 1999).

As proteínas do sistema complemento se encontram circulando inativas no sangue. Quando são ativadas, migram para o local da lesão e participam da destruição do patógeno, o que ocorre em “cascata” (Boshra et al., 2006) pela via alternativa, clássica ou via das lectinas (Biller-Takahashi et al., 2014). O sistema complemento também é importante na ligação entre os sistemas inato (via alternativa) e sistema adquirido (via clássica).

Lisozimas são proteínas que atuam como indicadores de imunidade, e são produzidas pelos leucócitos (Ellis, 1999; Saurabh e Sahoo, 2008). Trata-se de agente do sistema imune inespecífico, com atividade lítica bacteriana. Está presente no muco, pele, tecido linfático e plasma (Saurabh e Sahoo, 2008), e pode ter a atividade alterada conforme a espécie, qualidade da água, estresse e imunoestimulantes (Lie et al., 1989; Saurabh e Sahoo, 2008).

4. Imunoestimulantes

Os imunoestimulantes são substâncias capazes de preparar o sistema imune frente a doenças, atuam no sistema imune inato, e possuem capacidade de ativar a fagocitose de leucócitos. Atuam se ligando a receptores dos leucócitos e ativando ação dos neutrófilos, monócitos e macrófagos (Biller-Takahashi et al.,

2014). Os imunoestimulantes podem ser adicionados na alimentação de peixes para reduzir os danos causados pelo estresse diário (Zhou et al., 2010; Akhter et al., 2015) e os resultados variam conforme a dose e tempo de administração (Meena et al., 2013). Funcionam como alternativa ao uso de antibióticos, que na piscicultura nem sempre são utilizados com controle adequado, como ferramenta de prevenção de doenças (Biller-Takahashi et al., 2014).

A vacinação e o uso de quimioterápicos são alternativas para prevenir doenças, mas nem sempre são maneiras viáveis, por isso a administração de imunoestimulantes é recomendada, por tratar-se de um método mais seguro que quimioterápicos e mais abrangente que a vacinação (Sakai, 1999). O custo do produto também deve ser levado em conta (Guselle et al., 2010).

5. β-glucano

Um prebiótico frequentemente utilizado na aquicultura é o β-glucano, um polissacarídeo estrutural, extraído da parede de fungos, bactérias e alguns cereais. Ele possui capacidade de induzir fagocitose refletindo positivamente na imunidade inata e adquirida e melhora a sobrevivência e crescimento dos animais (Meena et al., 2013). O β-glucano está diretamente ligado à defesa do organismo e sobrevivência, pois possui capacidade de se ligar a receptores específicos das membranas de leucócitos, ativando e potencializando a ação dos macrófagos, monócitos e neutrófilos (Sakai, 1999). Os peixes alimentados com o prebiótico apresentam níveis de imunidade específica aumentados em desafios com bactérias comuns no ambiente de cultivo (Sahoo et al., 2001).

O β-glucano é amplamente estudado na medicina humana pois, além de suas capacidades imunomoduladoras, possui propriedades anti-tumorais, capazes de induzir apoptose; reduz a glicemia e a colesterolemia e tem propriedades anti-inflamatórias (Bai et al., 2019). Estudo recente mostrou que este imunoestimulante tem ação lipolítica, além da capacidade de estimular o sistema imune em peixes (Lopes et al., 2022). Quando associado à dieta, melhora o crescimento, a sobrevivência, a atividade das enzimas digestivas, respostas do sistema imunológico e integridade da barreira intestinal (Irianto e Austin, 2002).

Entretanto, essas respostas dependem da dosagem e duração da alimentação (Rodriguez et al., 2003).

O β-glucano vem sendo usado com muita frequência na alimentação de peixes por suas ações benéficas e muitos são os protocolos utilizados, os quais variam em relação a forma de administração, tempo de oferecimento e doses utilizadas. Bagni et al. (2005) utilizaram o produto (0,1%) na alimentação do robalo *(Dicentrarchus labrax)* por 15 dias e nos 45 dias seguintes ofereceram ração comercial aos peixes. Como desafio, os animais foram submetidos a baixa temperatura. Os autores observaram aumento da atividade do sistema complemento e da lisozima nos primeiros 15 dias, sem alteração após 30 e 45 dias.

Em outro estudo, com truta, Guselle et al. (2010) mostraram que diferentes tempos de administração de β-glucano (100 *µ*g) aumentaram a proteção contra o parasita *Loma salmonidae*. As trutas foram alimentadas por 3 semanas com β-glucano antes da exposição ao parasita; 1 semana antes da exposição; 3 semanas após a exposição e uma semana após a exposição. O imunoestimulante se mostrou eficaz em praticamente todos os tratamentos, mas a oferta prévia do produto foi a mais indicada.

A utilização de 0,1% de β-glucano durante 10 dias aumentou a resposta imunológica de pacus infectados com *Aeromonas hydrophila*. Na concentração de 0,1% adicionado a ração administrada por 7 dias melhorou a resistência a patógenos, enquanto utilizada por 10 dias aumentou a sobrevida. Já na dose de 1%, melhorou a atividade leucocitária e da lisozima (Biller-Takahashi et al., 2014). Períodos mais longos de administração resultaram em maior tempo de proteção imunológica e melhor desempenho de crescimento (Koch et al., 2021).

Efeitos positivos do β-glucano também foram observados por Mello et al. (2019), que alimentaram os peixes durante 15 dias com 0,1% de β-glucano suplementado na ração. Após os 15 dias, os animais foram transportados e inoculados com *A. hydrophila*. Nos grupos alimentados com β-glucano houve aumento do cortisol e da glicemia pós transporte, sendo normalizados após 24 horas. A atividade hemolítica do sistema complemento aumentou nos peixes que receberam β-glucano 24 h após inoculação da bactéria, bem como a lisozima.

Um protocolo alimentar diferente foi utilizado por Amphan et al. (2019). Neste estudo, os autores mostraram que a alimentação suplementada com β-glucano, oferecida à tilápias de maneira pulsada, promoveu efeitos positivos no sistema complemento, lisozima e atividade fagocitária após desafio bacteriano, A suplementação com glucano a cada 2 semanas apresentou melhores efeitos pois manteve os níveis de proteção mesmo após suspenção da oferta, assim como a oferta de 4 semanas seguidas, portanto é a mais indicada.

Considerando as informações da literatura, a escolha de nosso estudo foi testar protocolos de alimentação pulsada e contínua com β-glucano para investigar se diferentes tempos de oferta, intercalados com suspensão da oferta, poderia afetar a eficácia das respostas do sistema imune inato de pacu frente a desafio com LPS. O LPS (lipopolissacarídeo) é uma endotoxina que compõe a parede celular da maioria das bactérias gram negativas e algumas gram positivas. Segundo Swain et al. (2008), o LPS é uma alternativa para indução de desafios bacterianos, já que simula a presença de patógenos e melhora a imunidade mediada por células, sem ocasionar doenças ou mortalidade. Vários estudos com peixes utilizam o LPS como forma de ativação do sistema imune (Shepherd et al., 2018; Mello et al., 2019; Nguyen et al., 2022).

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, A. J. A β-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, n. 1-2, p. 141-152, 1994.

AKHTER, N.; WU, B.; MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733–741, 2015.

AMPHAN, S.; UNAJAK, S.; PRINTRAKOON, C.; AREECHON, N. Feeding-regimen of β-glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology,** v. 87, p. 120-128, 2019.

BAGNI, M.; ROMANO, N., FINOIA, M.G., ABELLI, L., SCAPIGLIATI, G., TISCAR, P.G., SARTI, M., MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast b-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology** v.18, p. 311-325, 2005.

BAI, J.; REN, Y.; LI, Y.; FAN, M.; QIAN, H.; WANG, L.; WU, G.; ZHANG, H.; QI, X.; XU, M.; RAO, Z. Physiological functionalities and mechanisms of β-glucans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 57–66, 2019.

BILLER-TAKAHASHI, J.; TAKAHASHI, L.; MARZOCCHI-MACHADO, C.; ZANUZZO, F.; URBINATI, E. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β-glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 698–703, 2014.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25. p. 853-873, 2001.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunol**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibians declines: an immunological perspective. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p.459-472, 1999

CIJI, A.; AKHTAR, M.S. Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2190-2247, 2021.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.9, p.291-308, 1999.

FAO – **FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION**. 2006. State of world aquaculture 2006. Roma: FAO, Fisheries Technical Paper 500

FAO. ***The State of World Fisheries and Aquaculture*** *2020*. *Sustainability in action*. Rome.

FAO. **National Aquaculture Sector Overview - Brazil. 2021.** FAO Fisheries & Aquaculture, 2021.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture** 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. https://doi.org/10.4060/cc0461en

FLORES, R.M.V.; PEDROZA-FILHO, M.X. Is the internal market able to accommodate the strong growth projected for Brazilian aquaculture. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 4, p. 407-417, 2014.

GUSELLE, N. J.; SPEARE, D. J.; MARKHAM, R. F., PATELAKIS, S. Efficacy of intraperitoneally and orally administered ProVale, a yeast β-(1, 3)/(1, 6)-d-glucan product, in inhibiting Xenoma formation by the microsporidian *Loma salmonae* on rainbow trout gills. **North American Journal of Aquaculture**, v. 72, n. 1, p. 65-72, 2010.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 11, p. 633-642, 2002.

JENSEN, F.; NIELSEN, M.; NIELSEN, R. Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth? **Fisheries Research**, v. 159, p. 25-33, 2014.

KOCH, J.F.A.; OLIVEIRA, C.A.F.; ZANUZZO, F.S. Dietary β-glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56-63, 2021.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study of lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 1-5, 1989.

LOPES, L.M.F., MELLO, M.M.M., URBINATI, E.C. Dietary yeast β-glucan reduces cortisol plasma levels, enhances respiratory burst of leukocytes and serum lysozyme levels after *Aeromonas hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 546, p. 737411, 2022

MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMMAR, S.; MANDAL, S. C.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K.; Mukherjee, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431-457, 2013.

MELLO, M.M.M.; FARIA, C.F.P; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. β-glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated

with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.93, p.1076-1083, 2019.

NGUYEN, T. M., AGBOHESSOU, P. S., NGUYEN, T. H., THI, N. T. T., & KESTEMONT, P. Immune responses and acute inflammation in common carp *Cyprinus carpio* injected by E. coli lipopolysaccharide (LPS) as affected by dietary oils. **Fish & Shellfish Immunology**, v.122, p.1-12, 2022.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. ANUÁRIO Peixe BR da Piscicultura 2021. Disponível em: < https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Acesso em: 28 de 03 de 2022.

RAULET, D.H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 996-1002, 2004.

RAUTA, P.R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, n. 148, p. 23-33. 2012.

RODRÍGUEZ, F.; ESTEBAN, M.; MESEGUER, J.; BRAVO, M.; GÓMEZ, G.; ROJAS; LUNA, T.; JIMÉNEZ, G.; BALCÁZAR, J. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA, p. 624-654, 2003.

ROMBOUT, J.H.W.M.; ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.; KIRON, V. Teleost intestinal immunology. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 5, p. 616-626, 2011.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary β-1, 3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 8, p. 683-695, 2001.

SAHOO, S.; BANU, H.; PRAKASH, A., TRIPATHI, G. Immune System of Fish: An Evolutionary Perspective. In **Antimicrobial Immune Response**, ORTEGA-VILLAIZAN, M.M.; CHICO, C. (eds), Cap. 1, 2021. Intech Open. DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99541

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1–2, p. 63–92, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.) **The Fish Immune System**: Organism, Pathogen and Environment. San Diego: Academic Press, p.63-103, 1996.

SHEPHERD, B.S.; SPEAR, A.R.; PHILIP, A.M.; LEAMAN, D.W.; STEPIEN, C.A.; SEPULVEDA-VILLETE, O.J.; PALMQUIST, D.E.; VIJAYAN, M.M. Effects of cortisol and lipopolysaccharide on expression of select growth-, stress- and immune-related genes in rainbow trout liver. **Fish & Shellfish Immunology** v. 74, p. 410–418. 2018 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.003.

SMITH, NICOLE C.; RISE, MATTHEW L.; CHRISTIAN, SHERRI L. A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. **Frontiers in Immunology**, p. 2292, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K.; NANDA, P. K, DASH. S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. **Fish & Shellfish immunology**, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: J.E.P. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi; Castagnolli N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.171-194, 2004.

URBINATI, E.C.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2020.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRÍQUEZ, R.; MORAN, G. J. V. M. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486, 2011.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018.

VERLHAC V., GABAUDAN J., The effect of vitamin C on fish health. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.

ZHOU, X., TIAN, Z., WANG, Y. AND LI, W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501-509, 2010.

CAPÍTULO 1

Respostas imune inatas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com β-glucano em protocolos de alimentação pulsada e desafiados com LPS

RESUMO

A aquicultura apresenta crescimento constante, por isso estratégias para otimizar os sistemas de criação são necessárias. O cultivo de mais peixes em um menor espaço aumenta a susceptibilidade a doenças. Como prevenção, o uso de imunoestimulantes é indicado, como é o caso do β-glucano adicionado a ração, utilizado para aumentar a imunidade e a saúde animal em piscicultura. Em nosso estudo, 192 peixes, distribuídos em 24 caixas (8 peixes cada) foram alimentados por 4 semanas, com ração contendo β-glucano, num regime de alimentação pulsada, sendo os seguintes tratamentos: 1- alimentação contínua com ração comercial por 28 dias; 2- alimentação contínua com ração com β-glucano por 28 dias; 3- alimentação alternada / uma semana com β-glucano e uma semana sem; 4- alimentação alternada / uma semana sem e semana com β-glucano; 5- alimentação alternada / duas semanas seguidas com β-glucano e duas últimas sem; 6- alimentação alternada / duas semanas sem e duas com β-glucano. Após 28 dias, foram realizadas coletas de sangue e tecidos para avaliar indicadores do estresse (cortisol e glicose plasmáticos), indicadores da imunidade inata (atividade sérica da lisozima, atividade sérica do sistema complemento, atividade respiratória de leucócitos) e metabólicos (triglicerídeos e colesterol). Dois peixes de cada caixa foram retirados para a primeira coleta (inicial), enquanto os peixes restantes foram inoculados com 1,5 mg kg^{-1} de LPS (*E. coli*) e amostrados 3, 6 e 24 horas após a inoculação. Os resultados mostraram que os protocolos e o β-glucano não modificaram os níveis de glicose no sangue, mas apenas a inoculação aumentou estes níveis, 6 h depois. As oscilações nos níveis de cortisol não mostraram um padrão definido, apenas tenderam a diminuir, em geral, 24 h após o LPS. As oscilações observadas nos indicadores imunológicos não apresentaram padrão claro ou definido. Houve leucopenia e linfopenia após inoculação do LPS, bem como aumento nos valores de triglicerídeos e colesterol circulantes. A oferta de β-glucano nos diferentes protocolos, seguindo um padrão pulsado, não mostrou vantagem de nenhum deles.

Palavras-chave: aquicultura, imunestimulação, manejo alimentar, indicadores de estresse, LPS.

ABSTRACT

Aquaculture has shown constant growth, thus strategies to optimize farming systems are necessary. Raising more fish in a smaller space increases susceptibility to disease. As a prevention, the use of immunostimulants is indicated, such as the β-glucan added to the feed to increase immunity and health in fish farming. In our study, 192 fish, distributed into 24 boxes (8 fish each) were fed for 4 weeks, with diet containing β-glucan, in a pulsed feeding regime, following the treatments: 1- continuous feeding with commercial feed for 28 days; 2- continuous feeding with feed with β-glucan for 28 days; 3- alternating feeding / one week with β-glucan and one week without; 4- alternating feeding / one week without and week with β-glucan; 5- alternating feeding / two weeks in a row β-glucan and last two without; 6- Alternating feeding / two weeks without and two with β-glucan. After 28 days, blood and tissue samples were collected to evaluate stress indicators (plasma cortisol and glucose), indicators of innate immunity (serum lysozyme concentration, serum complement system activity, leukocytes respiratory activity) and metabolic (triglycerides and cholesterol). Two fish from each box were firstly sampled (initial sampling), while the remaining fish were inoculated with 1.5 mg kg-1 of LPS (*E. coli*) and sampled 3, 6 and 24 h after inoculation. The results showed that the protocols and β-glucan did not modify blood glucose levels, but only inoculation increased these levels 6 h later. The oscillations in cortisol levels did not show a clear pattern, but only tended to decrease 24 h after LPS. The oscillations observed in the immunological indicators do not present a clear or defined pattern. There was leukopenia and lymphopenia after LPS inoculation, as well as an increase in triglyceride and cholesterol values

Key words: aquaculture, immunestimulation, food management, stress indicators, LPS.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura garante uma fonte de proteína de ótima qualidade o que contribui para a segurança alimentar mundial (FAO, 2020) e atende uma elevada demanda de produção (Peixe BR 2021). Segundo a FAO (2022), a proteína oriunda do pescado foi responsável por 17% da alimentação mundial em 2021, chegando a 50% em alguns países asiáticos e africanos.

Entre as diversas espécies nativas brasileiras, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um dos mais estudados e consumidos (Flores e Pedroza-Filho, 2014) com destaque nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Peixe Br 2021). Trata-se de um peixe onívoro, com preferência frutívora, capaz de realizar dispersão de sementes (Urbinati e Takahashi, 2020), que se adapta bem à criação em cativeiro e aceita bem alimentação comercial (Urbinati e Takahashi, 2020). Porém, a produção intensiva pode provocar situações estressantes, ocasionando perdas na produção. A produção em larga escala pode gerar problemas aos animais. O estresse causado pela manipulação frequente pode acarretar a diminuição da imunidade, aumentando a susceptibilidade a doenças (Urbinati e Carneiro, 2004). Com isso, o desenvolvimento de um pacote tecnológico para criação da espécie é uma realidade necessária. O uso de imunoestimulantes na dieta é uma opção de melhoria nos protocolos de criação (Ciji et al., 2021).

Imunoestimulantes são substâncias capazes de modular o sistema imune para uma defesa a patógenos mais eficiente. São moléculas que se ligam a receptores de leucócitos e ativam neutrófilos monócitos e macrófagos para realização de fagocitose (Biller-Takahashi et al., 2014). Um importante imunoestimulante para a aquicultura é o β-glucano, um prebiótico, polissacarídeo natural encontrado em leveduras, algumas bactérias, fungos, algas marinhas e cereais (Rop et al., 2009). Os peixes alimentados com o prebiótico apresentam níveis de imunidade aumentados perante desafios. A eficácia do produto pode variar conforme dose e tempo de administração (Meena et al., 2013; Sahoo et al., 2001). As respostas divergem em relação às diferentes espécies, protocolos de administração, tempo de oferecimento e concentrações do produto (Bagni et al., 2005; Guselle et al., 2010; Biller-Takahashi et al., 2014; Mello et al., 2019; Sabioni et al., 2020). Um

protocolo, em particular, foi utilizado por Amphan et al. (2019), que testaram a oferta de β-glucano de maneira pulsada. Assim, nosso objetivo foi comparar diferentes protocolos de alimentação do pacu com a suplementação do β-glucano e avaliar a eficácia do imunoestimulante em peixes inoculados com LPS (lipopolissacarídeo presente na parede celular da maioria das bactérias), para simular a presença de patógenos e induzir imunidade inata, método que se mostrou eficiente em outros estudos, é muito utilizado e apresenta resultados positivos (Swain et al., 2008; Shepherd et al., 2018; Mello et al., 2019; Nguyen et al., 2022).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o Protocolo 2258/21 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

O experimento foi realizado no Biotério de Peixes, Departamento de Morfologia e Fisiologia, campus de Jaboticabal.

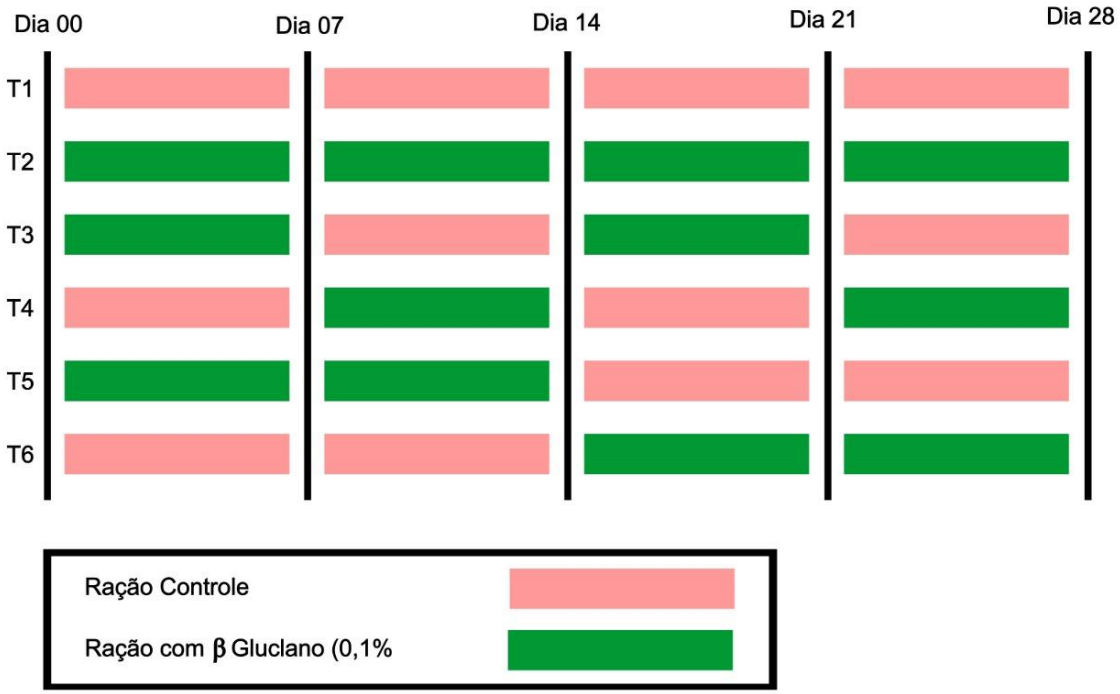
2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 192 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com 160g ± 30,76 e 19,5cm ± 1,07, oriundos de piscicultura comercial. Os peixes foram divididos em 24 caixas de 130 litros (8 peixes/caixa) em um sistema com fluxo contínuo de água e areação suplementar. Durante o período experimental, a água das caixas apresentou temperatura de 29,9ºC ± 0,6, concentração de oxigênio dissolvido de 4,48 ± mg L^{-1}, pH 7,9 e a amônia não ionizada 0,19 ± 0,02 mg L^{-1}. O fotoperíodo foi de 12 horas luz: 12 horas escuro.

Os peixes foram aclimatados ao sistema, durante 7 dias, sendo alimentados com ração comercial. Os animais foram alimentados 2 vezes ao dia (as 8h00 e as 16h00) com 2% do peso vivo (cálculo previamente realizado). Após esse período, foram oferecidas as rações experimentais. O experimento foi dividido em 6

tratamentos, cada tratamento com 4 réplicas. Os tratamentos são descritos a seguir:

T1 – Alimentação contínua com ração comercial ao longo do período experimental (4 semanas). T2 - Alimentação contínua com ração comercial + β-glucano (Macrogard, 0,1%) ao longo do período experimental (4 semanas). T3 - Alimentação alternada (1 semana β-glucano, 1 semana controle) por quatro semanas. T4 - Alimentação alternada (1 semana controle, 1 semana β-glucano) por quatro semanas. T5 - Alimentação alternada (2 semanas β-glucano, 2 semanas controle). T6 - Alimentação alternada (2 semanas controle, 2 semanas β-glucano).



Delineamento experimental

Fonte: Arquivo pessoal

2.2. Dieta experimental

A ração comercial Nutripiscis com 28% de proteína bruta foi utilizada para a confecção das dietas. À ração farelada, foi adicionado 0,1% de β-glucano (Biorigin, MacroGard, código Q519252). Em seguida foram adicionados 40% de

água e a mistura passada em moedor manual para produção de grânulos, que foram secos a 40ºC, por 24 h. A ração controle passou pelo mesmo procedimento descrito para a ração experimental.

2.3. Amostragens

Para as coletas, os peixes foram anestesiados com eugenol (1 g 10^{-1} L água) e o sangue colhido por punção do vaso caudal. O sangue foi adicionado em microtubos, um com o anticoagulante Heparina (Heptar 5000Ul/ mL) (15 µl para 120 µl de sangue), outro com anticoagulante Glistab (Labtest, 6g/dl), e em um tubo de vidro sem anticoagulante para separação do soro, logo após a retirada são aguardadas 3 horas em temperatura ambiente e em seguida centrifugado na rotação 3 mil rpn por 10 minutos. Uma gota foi separada para confecção de lâminas de extensão e contagem celular. Após a coleta de sangue, os animais foram medidos e pesados.

Após 28 dias de alimentação, 2 peixes de cada caixa foram amostrados para análises de indicadores estresse (cortisol e glicose plasmáticos), da imunidade inata (atividade respiratória de leucócitos, atividade do sistema complemento – via alternativa, atividade sérica de lisozima e contagem de leucócitos) e metabólicos (triglicerídeos, colesterol). Em seguida, os peixes restantes foram inoculados via intraperitoneal com 1,5 mg kg^{-1} de LPS (*E. coli*, O127:B8, Sigma, código L3129, lote 039M4049V) dissolvidos em solução salina a 0,6%, em volume 0,01 ml g^{-1} (Mello, 2021) e amostrados 3, 6 e 24 horas após a inoculação.

2.3. Métodos de análises

2.3.1. Determinação de indicadores de estresse

O cortisol foi mensurado por ensaio imunoenzimático utilizando kit comercial (DRG-ELISA - EIA 1887) e a glicose utilizando kit comercial (Labtest – Ref. 133).

2.3.2. Indicadores de imunidade inata

2.3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos circulantes seguiu o protocolo de Biller-Takahashi et al. (2013). Uma alíquota de 50 µL sangue com heparina foi adicionada ao microtubo, e adicionados 50 µL NBT. A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Após a incubação, 50 µL desta suspensão foram adicionados a tubos de vidro contendo 1 ml de N, N-dimetilformamida e, em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm e a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV –Vis), a 540 nm.

2.3.2.2. Atividade sérica da lisozima

A determinação da atividade da lisozima foi realizada de acordo com (Zanuzzo et al., 2017). Foram pipetados 25 µL de soro em microplacas de acrílico estéril de 96 poços, seguido da adição de 75 µL de tampão fosfato de sódio e de 100 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. Após a mistura, utilizando um leitor de microplacas (ThermoPlate Reader MN), a cada 5 minutos durante 10 minutos (inicial, 5 min e final), a 450 nm, foi feita a leitura da atividade sérica da lisozima

2.3.2.3. Atividade do sistema complemento

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada no soro usando a via alternativa do complemento (ACH50) segundo Zanuzzo et al. (2017). Hemácias foram isoladas de sangue de coelho e a suspensão foi adicionada ao soro, num volume fixo de 400µl de solução de hemácias + 100µl de soro combinado com 100 µl de tampão EGTA Mg2+, relação determinada em análise prévia feita misturando-se um pool de todas as amostras de soro. Em seguida, a atividade hemolítica do complemento foi medida como o tempo (em segundos)

necessário para lisar 50% de hemácias, em ensaio cinético, a 700 nm usando um espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV –Vis).

2.3.2.4 Perfil de células sanguíneas circulantes

Com o sangue total coletado, foram feitas extensões sanguíneas, coradas com panóptico e observadas em microscópio óptico para contagem total e diferencial de leucócitos. As células vermelhas serão contadas em câmara de Neubauer, com sangue diluído em tampão formaldeído citrato.

2.3.3. Indicadores metabólicos

2.3.3.1 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol

As concentrações de triglicerídeos e colesterol foram mensuradas utilizando os Kits Labtest Ref. 87 e Ref. 76, respetivamente.

2.4. Análise estatística.

Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homoscedasticidade (Brown-Forsythe) e o experimento foi analisado em um delineamento inteiramente casualizado, em um delineamento fatorial 6 (protocolos alimentares) x 4 (amostragens). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando as diferenças foram significativas ($P<0,05$) foi aplicado o teste Duncan para comparação das médias utilizando o software SAS (versão 9.3). Os resultados também foram analisados em análises individuais, comparando tratamentos agrupados com o objetivo de se visualizar diferenças pontuais. Os indicadores da resposta de estresse, de imunidade inata e metabólicos foram comparados em cada tratamento nos quatro tempos de amostragem (inicial, 3, 6 e 24h) utilizando o teste Duncan no software SAS 9.0 ($p<0,05$). Não houve mudanças em relação aos resultados observados na análise em esquema fatorial.

3. RESULTADOS

3.1 Indicadores de estresse

3.1.1. Concentrações plasmáticas de glicose e cortisol

Os protocolos alimentares aplicados por 28 dias não alteraram as concentrações de glicose no plasma (Fig. 1A). Três horas após inoculação do LPS, os peixes do tratamento T4 apresentaram aumento das concentrações de glicose (p= 0,0028), as quais voltaram aos valores iniciais em 24 h. Seis horas após a inoculação de LPS, os peixes dos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 apresentaram os maiores valores de concentração de glicose (p=0,4523), com redução às 24 h.

Os protocolos alimentares não alteraram as concentrações de cortisol (Fig. 1B) após 28 dias, mas após a inoculação dos peixes com LPS houve redução dos valores no grupo T4, às 6 h, e no grupo T5, às 24 h (p=0,0495; p=0,0185, respectivamente) (Fig. B).

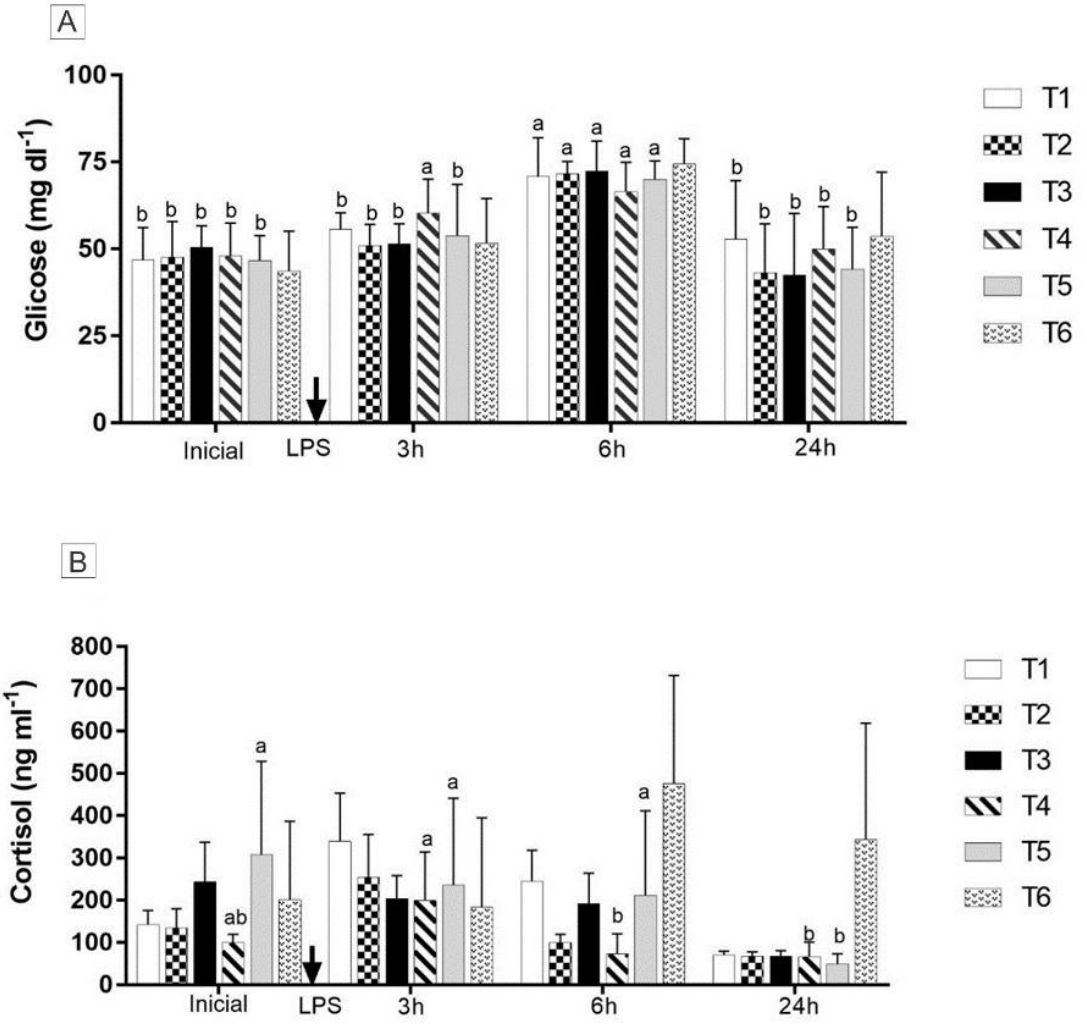


Fig. 1. Concentrações plasmáticas de glicose e cortisol de pacus alimentados com dietas contendo 0,1 % de β-glucano durante 28 dias, administradas em diferentes protocolos. T1 – Alimentação contínua com ração comercial por 4 semanas; T2 - Alimentação contínua com ração comercial + β-glucano (Macrogard, 0,1%) por 4 semanas; T3 - Alimentação alternada (1 semana β-glucano, 1 semana controle) por quatro semanas. T4 - Alimentação alternada (1 semana controle, 1 semana β-glucano) por quatro semanas. T5 - Alimentação alternada (2 semanas β-glucano, 2 semanas controle). T6 - Alimentação alternada (2 semanas controle, 2 semanas β-glucano). Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos em um mesmo tratamento, pelo teste de Duncan ($p<0,05$). A seta indica momento da inoculação com LPS. Os valores das barras são média ± desvio padrão da média. (n=8).

3.2 Indicadores de imunidade inata

3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL), atividade sérica da lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC_{50})

Os protocolos de oferta do β-glucano não modificaram a ARL como observado na amostragem inicial (Fig.2 A). Somente 24 h após a inoculação, a atividade oscilou entre os grupos de peixes, com diferença significativa somente entre os peixes T2 e T4, com maior atividade no grupo T4 (p=0,2949).

Os protocolos alimentares aplicados por 28 dias não alteraram a atividade da lisozima, que apresentou aumento nos peixes T3, 6h após inoculação do LPS (p=0,0306) e nos peixes controle (T1) e T2, às 24 h (p=0,0815; p=0,0285) respectivamente (Fig. 3B).

As respostas do sistema complemento diferiram entre os grupos apenas após a inoculação do LPS (Fig. 3C). Observamos ativação do sistema nos peixes controle (T1) às 6 e 24 h em relação à amostragem de 3h (p=0,0053), enquanto às 3 e 6 h observamos oscilações entre os grupos sem um padrão claro. Às 3 h, a maior ativação ocorreu nos peixes T4 em relação ao T1 (p=0,5895) e, às 6 h, a maior ativação ocorreu nos peixes T1 em relação aos peixes T2 (p=0,6492).

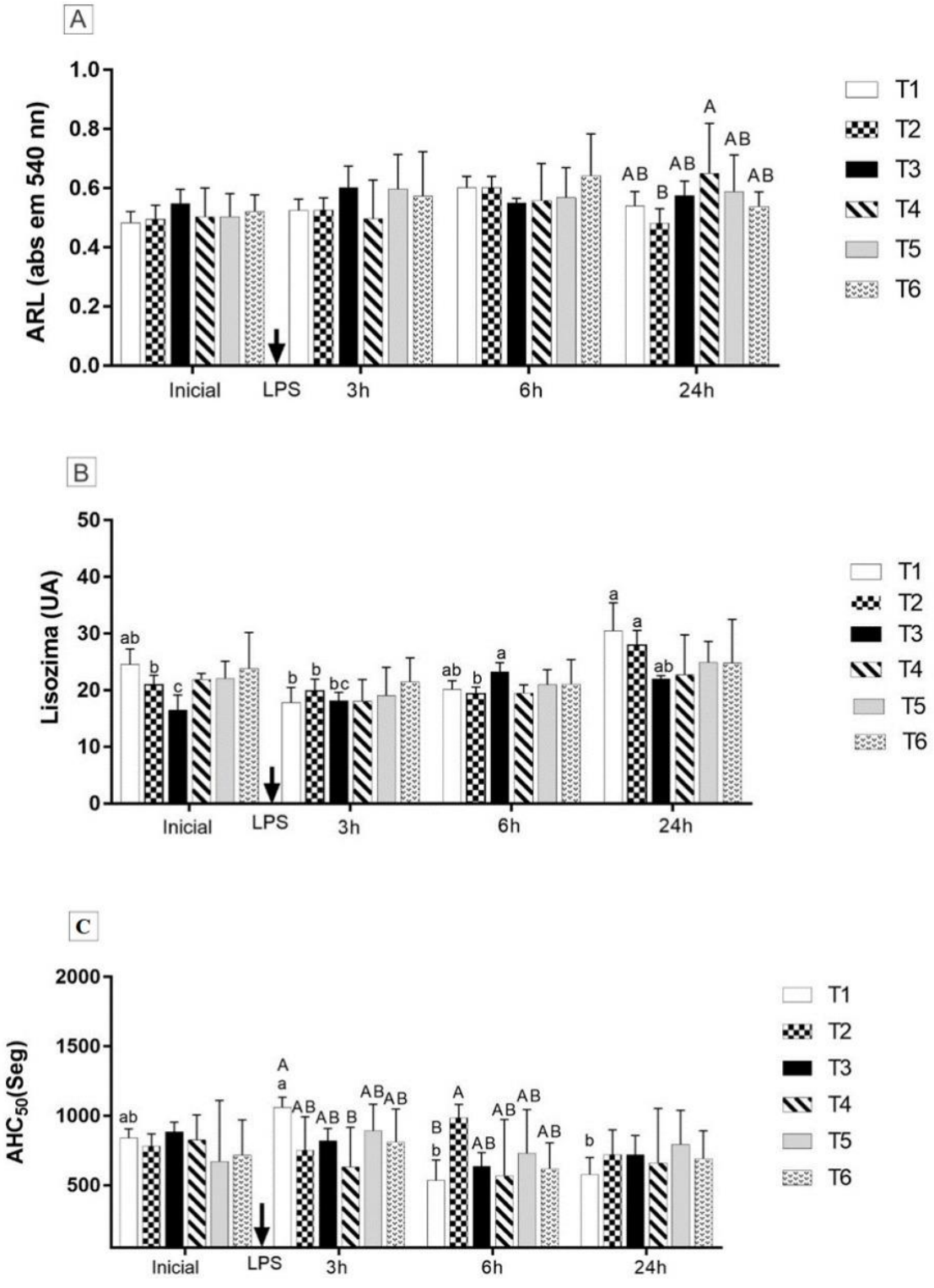


Fig. 2. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (A), atividade sérica da lisozima (B) e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC_{50}) (C) de pacus alimentados com dietas contendo 0,1 % de β-glucano durante 28 dias, administradas em diferentes protocolos. T1 – Alimentação contínua com ração comercial por 4 semanas; T2 - Alimentação contínua com ração comercial + β-glucano (Macrogard, 0,1%) por 4 semanas; T3 - Alimentação alternada (1 semana β-glucano, 1 semana controle) por quatro semanas. T4 - Alimentação alternada (1 semana controle, 1 semana β-glucano)

por quatro semanas. T5 - Alimentação alternada (2 semanas β-glucano, 2 semanas controle). T6 - Alimentação alternada (2 semanas controle, 2 semanas β-glucano). Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos em um mesmo tratamento, pelo teste de Duncan ($p<0,05$). A seta indica momento da inoculação com LPS. Os valores das barras são média ± desvio padrão da média. (n=8).

3.3 Perfil das células sanguíneas circulantes

3.3.1. Contagem total de leucócitos e linfócitos

De forma geral, em peixes de todos os tratamentos, houve redução do número de leucócitos 6 h após a inoculação de LPS ($p=0,6800$), exceto no grupo T6 que apresentou o mesmo perfil de alteração, mas sem significância estatística (Fig. 3A). Às 24 h, os valores retornaram (T1) ou começaram a retornar (T2, T3, T4 e T5) aos valores iniciais ($p=0,0019$).

Em relação aos linfócitos, no tempo inicial, houve aumento no número destas células nos peixes do T4 em relação ao T2, e, de forma geral, uma queda após a inoculação com LPS ($p=0,1237$) (Fig. 3B).

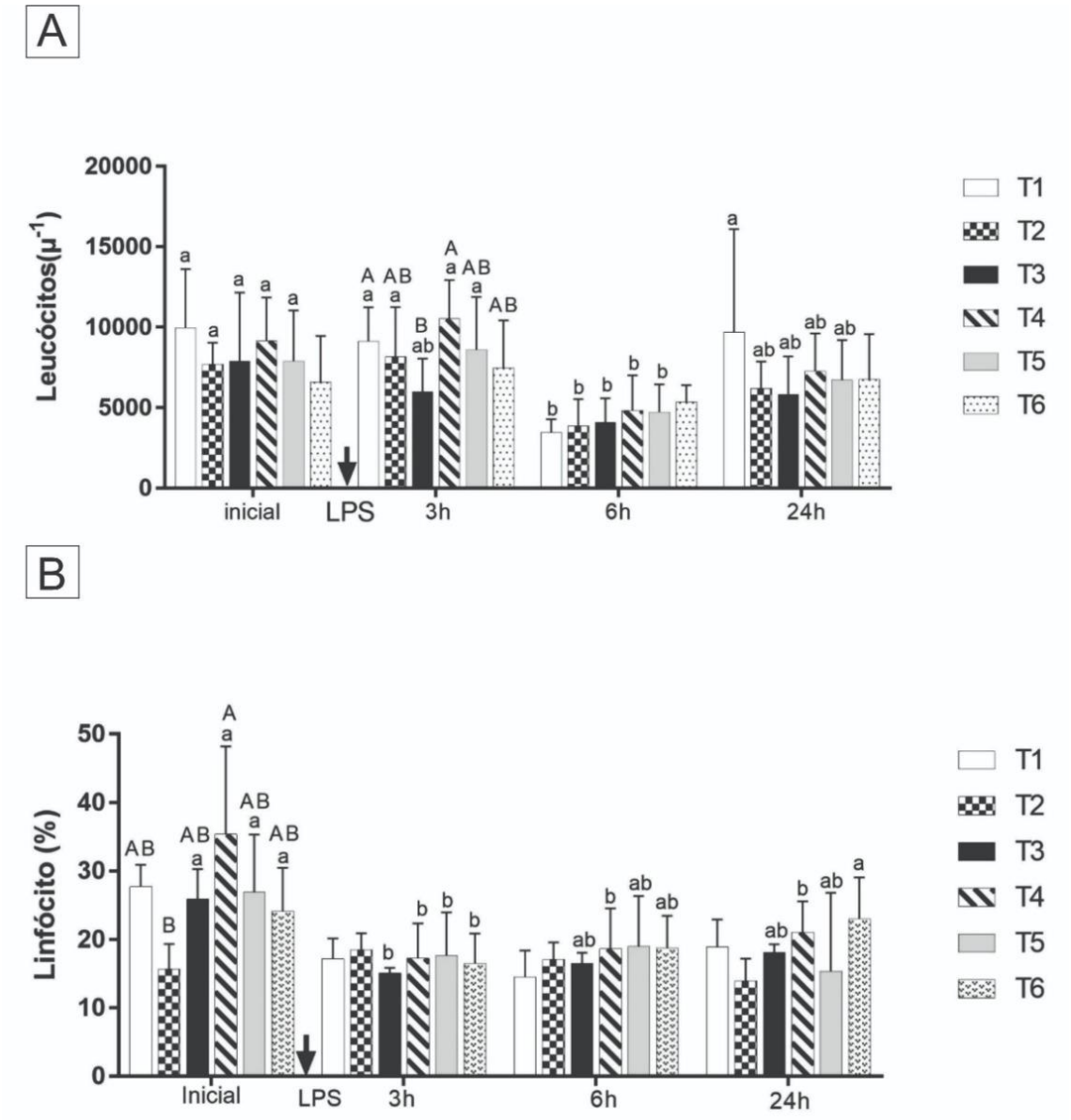


Fig. 3. Número de leucócitos (A) e linfócitos (B) de pacus alimentados com dietas contendo 0,1 % de β-glucano durante 28 dias, administradas em diferentes protocolos. T1 – Alimentação contínua com ração comercial por 4 semanas; T2 - Alimentação contínua com ração comercial + β-glucano (Macrogard, 0,1%) por 4 semanas; T3 - Alimentação alternada (1 semana β-glucano, 1 semana controle) por quatro semanas. T4 - Alimentação alternada (1 semana controle, 1 semana β-glucano) por quatro semanas. T5 - Alimentação alternada (2 semanas β-glucano, 2 semanas controle). T6 - Alimentação alternada (2 semanas controle, 2 semanas β-glucano). Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos em um mesmo tratamento e Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo tempo, pelo teste de Duncan ($p<0,05$).

Símbolo “seta” indica período que houve inoculação. seta indica momento da inoculação com LPS Os valores das barras são média ± desvio padrão da média. (n=8).

3.4 Indicadores metabólicos

3.4.1 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol

De forma geral, houve aumento das concentrações 6 h após a inoculação do LPS (p=0,1784), exceto nos peixes do grupo T1 (Fig. 4A). Nesta amostragem, as maiores concentrações foram observadas nos peixes T6 que diferem de T1 (p=0,0016). Em seguida, às 24 h, os valores se normalizaram, em níveis semelhantes aos iniciais.

Seguindo o perfil observado em relação aos triglicerídeos, houve um aumento do colesterol, de forma geral, 6 h após a inoculação do LPS (p=0,0819) (Fig. 4B). Esse aumento já foi observado às 3 h nos peixes T4 (p=0,4832). Às 24, os valores retornaram aos valores iniciais.

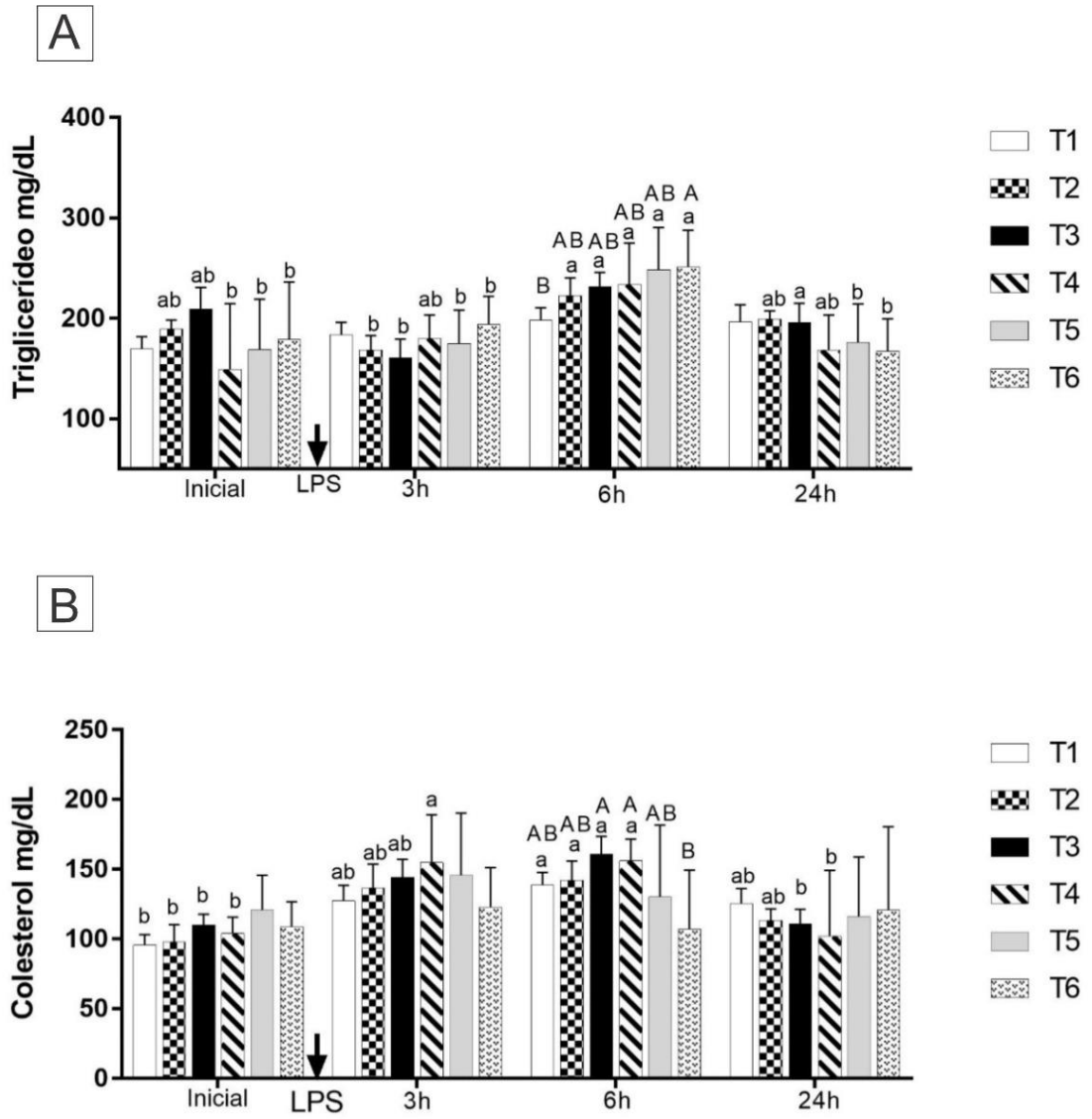


Fig. 4. Concentrações plasmáticas de triglicerídeos (A) e colesterol (B) de pacus alimentados com dietas contendo 0,1 % de β-glucano durante 28 dias, administradas em diferentes protocolos. T1 – Alimentação contínua com ração comercial por 4 semanas; T2 - Alimentação contínua com ração comercial + β-glucano (Macrogard, 0,1%) por 4 semanas; T3 - Alimentação alternada (1 semana β-glucano, 1 semana controle) por quatro semanas. T4 - Alimentação alternada (1 semana controle, 1 semana β-glucano) por quatro semanas. T5 - Alimentação alternada (2 semanas β-glucano, 2 semanas controle). T6 - Alimentação alternada (2 semanas controle, 2 semanas β-glucano). Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo tempo, pelo teste de

Duncan ($p<0,05$). Símbolo seta indica momento da inoculação com LPS. Os valores das barras são média ± desvio padrão da média. (n=8).

4. DISCUSSÃO

O β-glucano se destaca como potente imunoestimulante em peixes, mas ainda existem dúvidas em relação a seu tempo de administração (Sahoo et al., 2001; Meena et al., 2013). Por isso, este estudo investigou protocolos de administração por 28 dias com alternância de oferta a cada sete ou 15 dias, avaliando as respostas após período de suspensão e período de oferta, visando esclarecer qual melhor forma de administrar a dieta nas pisciculturas. Após 28 dias de aplicação dos protocolos, o LPS de *E. coli* (1,5 mg kg^{-1}) foi utilizado como desafio imunológico para os peixes para aferir a capacidade imunoestimulante do produto.

Foram realizadas análises de indicadores de estresse, considerando que a inoculação pode atuar como estressor (Liu et al., 2012), de imunidade, pois o β-glucano é um conhecido imunoestimulante (Rop et al., 2009; Meena et al., 2013) e metabólicas, visto que dados prévios mostraram que o produto apresentou respostas moduladoras de metabolismo energético (Lopes et al., 2022).

A aplicação dos protocolos de alimentação pulsada e a suplementação dietária com o β-glucano, oferecido por 28 dias, nos diferentes tempos testados, não afetaram os indicadores biológicos testados, diferentemente do estudo de Amphan et al. (2019) no qual o β-glucano apresentou respostas positivas com uso por 2 semanas consecutivas. As respostas encontradas foram causadas pela inoculação do LPS. A glicose plasmática se elevou após a inoculação, independente do tratamento, sugerindo que o procedimento atuou como estressor da mesma forma que observado em pacu, que apresentou aumento de glicemia após infecção por *Aeromonas hydrophila* (Meldau et al., 2022). Entretanto, a resposta de estresse não foi confirmada pelo cortisol, cujas respostas oscilaram sem um padrão claro. Foi possível observar elevação nas concentrações de cortisol, 3 h após a inoculação do LPS, mas apenas numericamente, em peixes de alguns tratamentos. Por outro lado, houve redução dos valores de cortisol após 6 h da inoculação nos peixes que receberam β-glucano em semanas alternadas,

incluindo a última semana, e nos peixes que receberam β-glucano por 15 dias e não receberam nos últimos 15 dias, o que mostra a falta de um padrão nas respostas. Redução de cortisol por ação do β-glucano foi previamente descrito em pacu (Lopes et al., 2022).

A maior demanda por energia, provocada pela resposta de ajuste metabólico à inoculação, se refletiu nos indicadores metabólicos. Após a inoculação, ocorreu uma mobilização dos triglicerídeos e colesterol circulantes, com aumento das concentrações destes dois metabólitos. São poucos os dados disponíveis sobre perfil metabólico em relação à inoculação bacteriana, mas os dados existentes diferem dos encontrados neste estudo. Assis e Urbinati (2020) descreveram, em pacu, redução de triglicerídeos 3 h após inoculação de *A. hydrophila*, e aumento de colesterol 24 h depois.

Os indicadores de imunidade inata, atividade respiratória de leucócitos, atividade sérica da lisozima, atividade hemolítica do sistema complemento, normalmente utilizados como indicadores da atividade imunológica em peixes (Zanuzzo et al., 2017), não apresentaram alterações importantes nas respostas, após os 28 dias recebendo β-glucano, sugerindo que a alternância na oferta do imunoestimulante afetou as respostas normalmente descritas do produto (Meena et al., 2013), igualando as respostas àquelas observadas nos peixes controle. Após a inoculação do LPS, o comportamento dos tratamentos foi semelhante.

Em relação ao comportamento das células sanguíneas, apenas a inoculação do LPS promoveu alterações. Houve redução do número de leucócitos 6 h após a inoculação e redução dos linfócitos 3 h depois, sugerindo migração destas células para o tecido foco da presença do antígeno. Leucopenia e linfopenia são alterações observadas em quadros de respostas infecciosas (Clauss et al., 2008) e confirmaram a reação imunológica à inoculação do lipopolissacarídeo.

5. CONCLUSÃO

A utilização de alimentação pulsada e o β-glucano, oferecido por 28 dias, nos diferentes tempos testados, não afetaram as respostas encontradas. As respostas observadas foram relacionadas à inoculação do LPS (glicemia, cortisol, leucopenia, linfopenia, aumento de triglicerídeos e colesterol).

6. REFERÊNCIAS

AI, Q.; MAI, K., ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W., XU, W.; & LI, H. Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 4, p. 394-402, 2007.

AMPHAN, S.; UNAJAK, S.; PRINTRAKOON, C.; AREECHON, N. Feeding regimen of β-glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.87, p.120-128, 2019.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V., GIMBO, R. Y. URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Brazilian Journal of Biology, vol. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J.; TAKAHASHI, L.; MARZOCCHI-MACHADO, C.; ZANUZZO, F.; URBINATI, E. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β-glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 698–703, 2014.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

CIJI, A.; AKHTAR, M.S. Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2190-2247, 2021.

DE PAIVA, M. J. T. R.; DE PÁDUA, S. B., TAVARES-DIAS, M.; & EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013. p. 35–45.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

FAO. National Aquaculture Sector Overview - Brazil. 2021**.** FAO Fisheries & Aquaculture, 2021.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome*, FAO.

FLORES, R.M.V.; PEDROZA-FILHO, M.X. Is the internal market able to accommodate the strong growth projected for Brazilian aquaculture. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 4, p. 407-417, 2014.

LIU, B.; GE, X.; XIE, J.; XU, P.; HE, Y.; CUI, Y.; MING, J.; ZHOU, Q.; PAN, L. Effects of anthraquinone extract from Rheum officinale Bail on the physiological responses and HSP70 gene expression of *Megalobrama amblycephala* under *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v.32, p.1-7, 2012.

MELLO, M.M.M.; FARIA, C.F.P; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. β-glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.93, p.1076-1083, 2019.

MELLO, M.M.M. Estresse, imunidade, sistema antioxidante e metabolismo em peixes em condições simuladas comuns da criação. 2021. Tese. Doutorado. Pós-graduação em Aquicultura. Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP. Jaboticabal. 2021.

MEENA, D. K.; DAS, P., KUMMAR, S., MANDAL, S. C., PRUSTY, A. K., SINGH, S. K; Mukherjee, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431-457, 2013.

MONTOYA, L.N.F.; FAVERO, G.C.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. Distinct β-glucan molecules modulate differently the circulating cortisol levels and innate immune responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 83, p. 314-320, 2018.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. ANUÁRIO Peixe BR da Piscicultura 2021. Disponível em: < https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Acesso em: 28 de 03 de 2022.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutrition Reviews**, v.67, n. 11, p. 624–631, 2009.

SABIONI, R.; ZANUZZO, F.S.; GIMBO, R.Y., URBINATI, E.C. β-Glucan enhances respiratory activity of leukocytes suppressed by stress and modulates blood glucose levels in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiology and Biochemistry** v. 46, n.2, p 629-640, 2020.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary β-1, 3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 8, p. 683-695, 2001.

SECOMBES, C. J.; WANG, T. The innate and adaptive immune system of fish. In: **Infectious disease in aquaculture**. Woodhead Publishing, 2012. p. 3-68.

SWAIN, P. et al. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.

SOPINKA, Natalie M. et al. Stress indicators in fish. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2016. p. 405-462.

URBINATI E. C.; CARNEIRO P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: J. E. P. Cyrino, E. C. Urbinati, D. M. Fracalossi, Castagnolli N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.171-194, 2004.

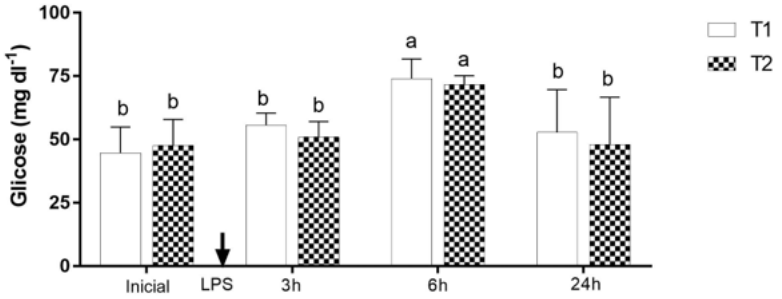
URBINATI E.C.; TAKAHASHI L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. de C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2020.

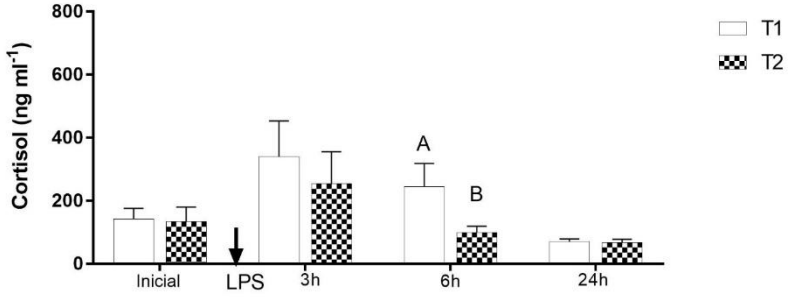
VERLHAC V.; GABAUDAN J., The effect of vitamin C on fish health. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.

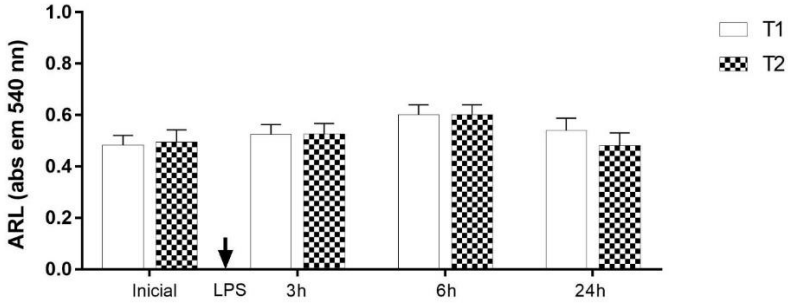
ZANUZZO, F.; URBINATI, E.C. *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 65, p. 198-205, 2017.

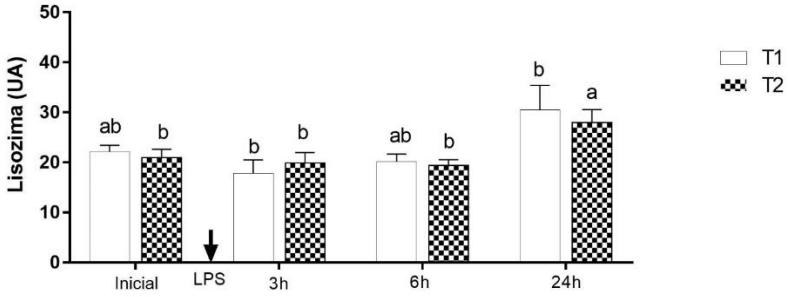
7. ANEXO 1

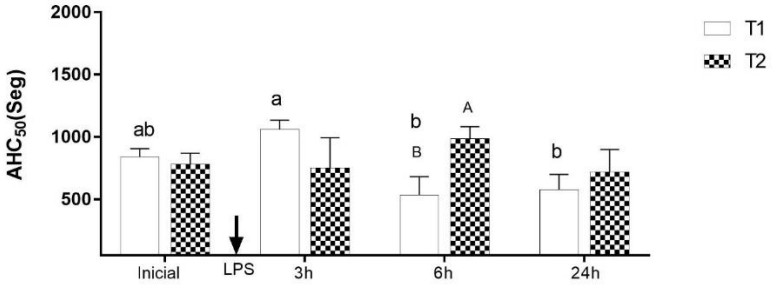
T1 x T2

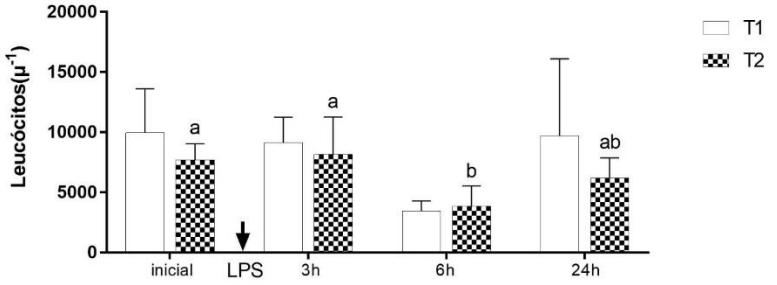


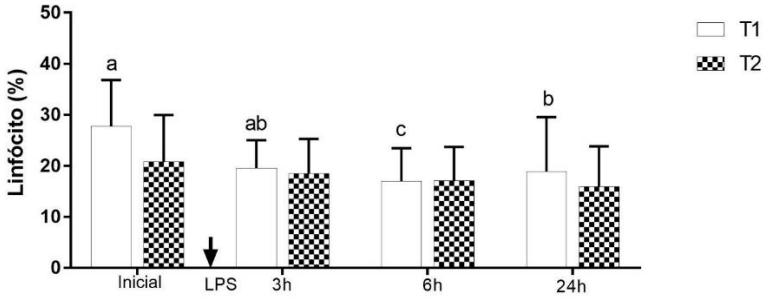


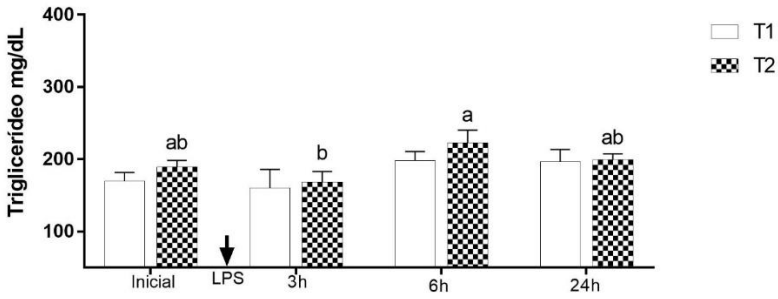


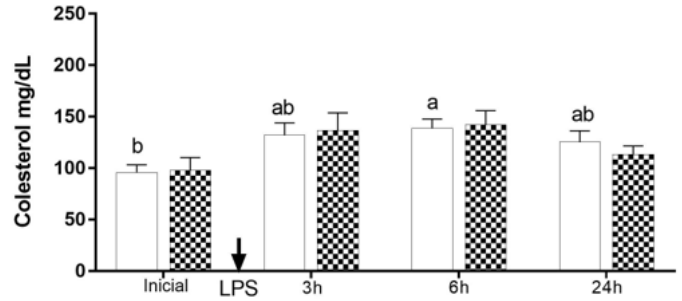



AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab
a
b
B
A
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2

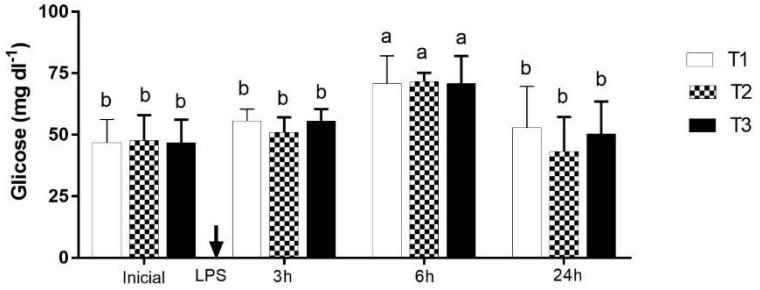

Leucócitos(µ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a
a
b
ab
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2

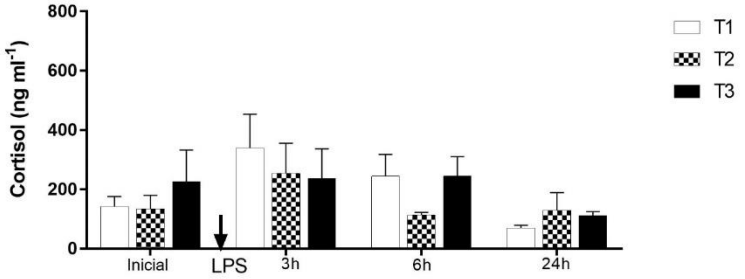

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
a
ab
c
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2

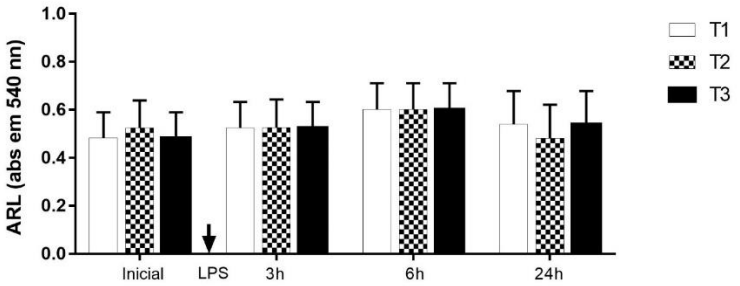

Triglicerídeo mg/dL
400
300
200
100
ab
b
a
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2

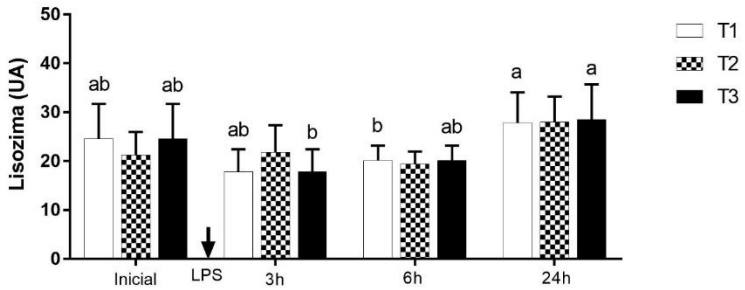

Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b
ab
a
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h

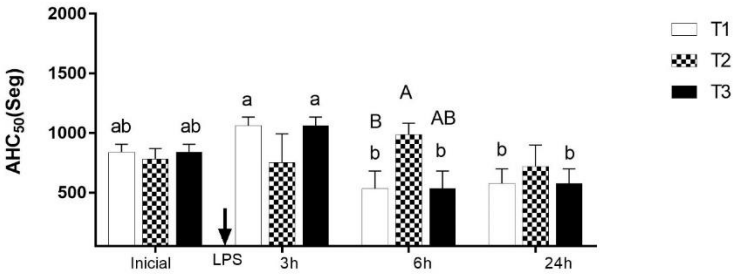
T1 x T2 x T3

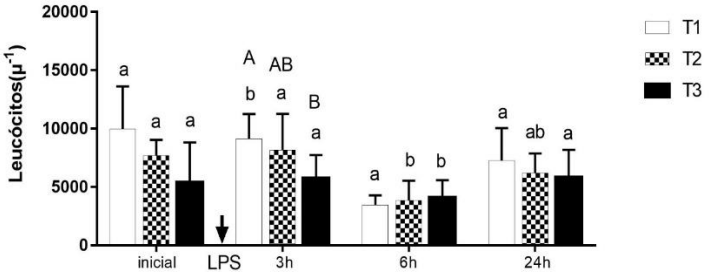

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b b b b b b a a a b b b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

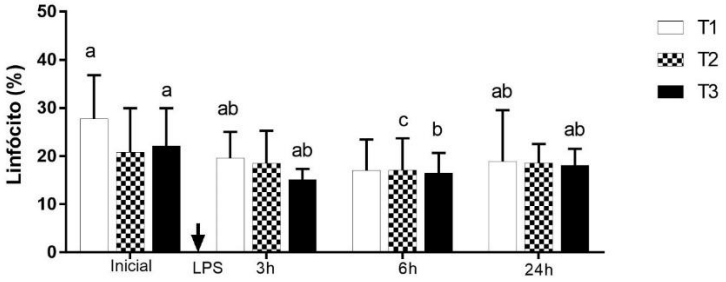

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

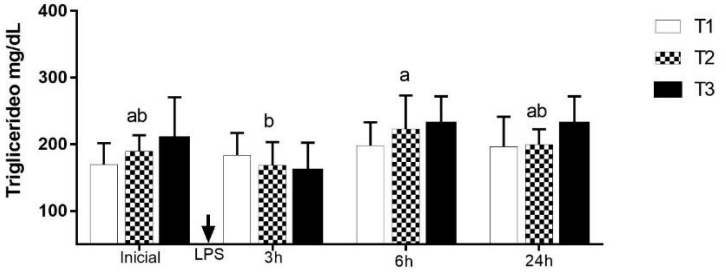

ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

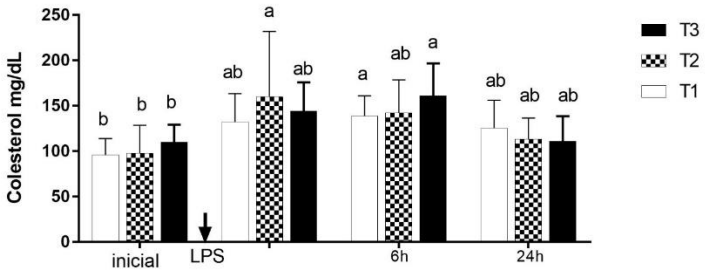

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab ab ab b b ab a a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab
ab
a
a
B
b
A
AB
b
b
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

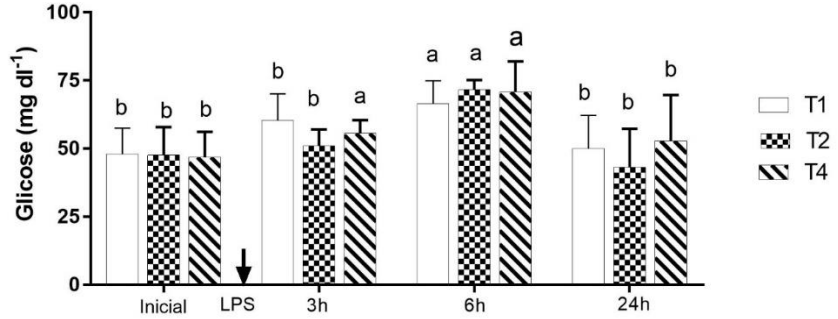

Leucócitos(µ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a
a
a
A
b
AB
a
B
a
a
b
b
a
ab
a
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

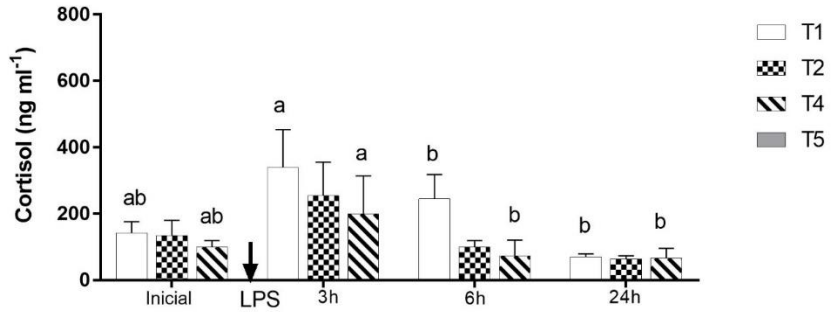

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
a
a
ab
ab
c
b
ab
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

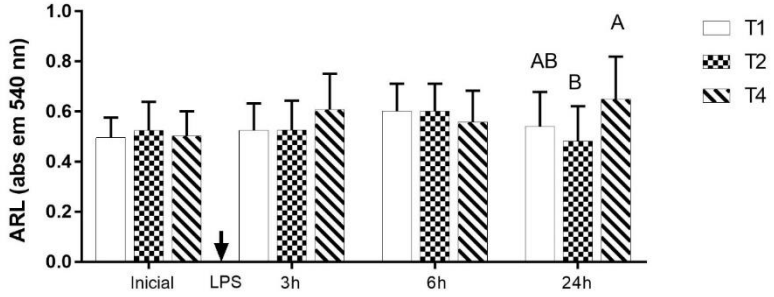

Triglicerideo mg/dL
400
300
200
100
ab
b
a
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3

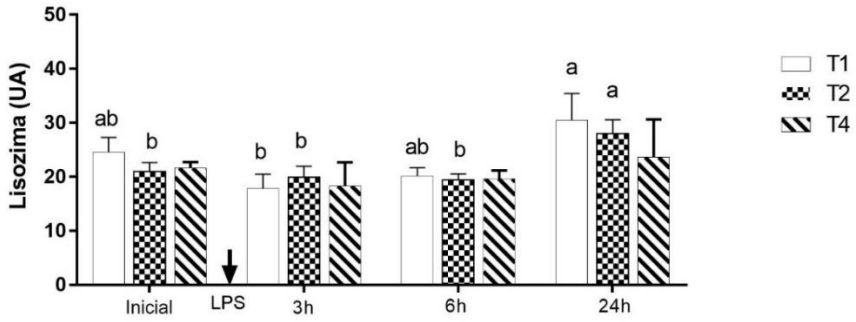

Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b b b ab a ab a ab a ab ab ab
inicial
LPS
6h
24h
T3
T2
T1

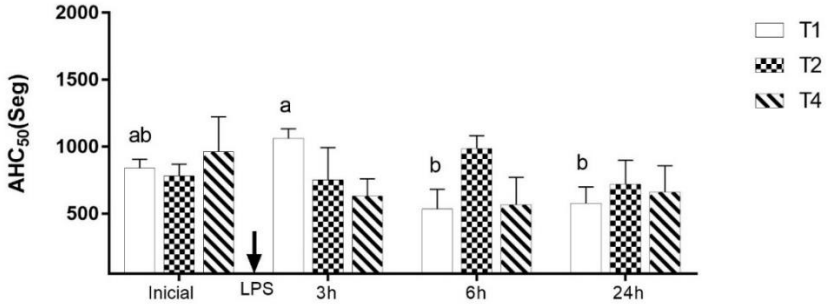
T1 x T2 x T4

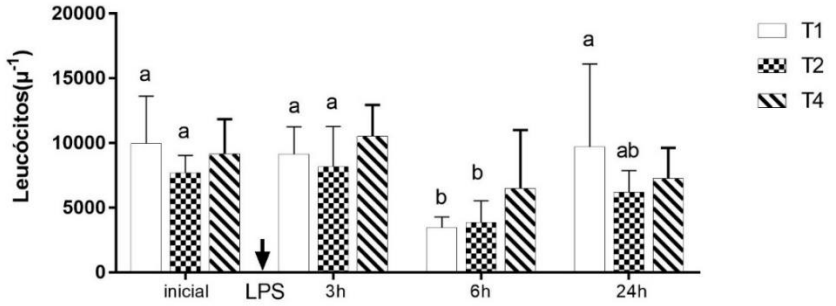

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b b b b b a a a a b b b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

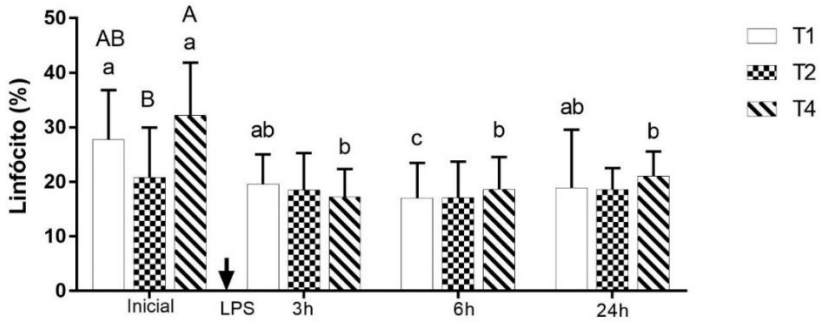

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
ab ab a a b b b b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5

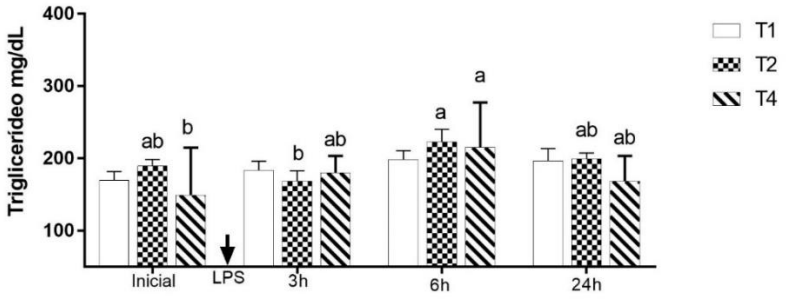

ARL (abs em 540 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AB B A
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

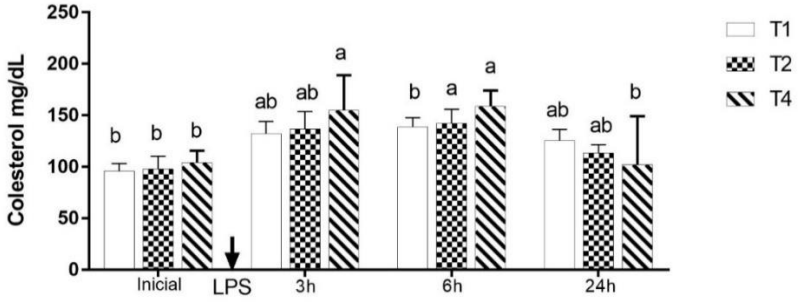

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab
b
b
b
ab
b
a
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab
a
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

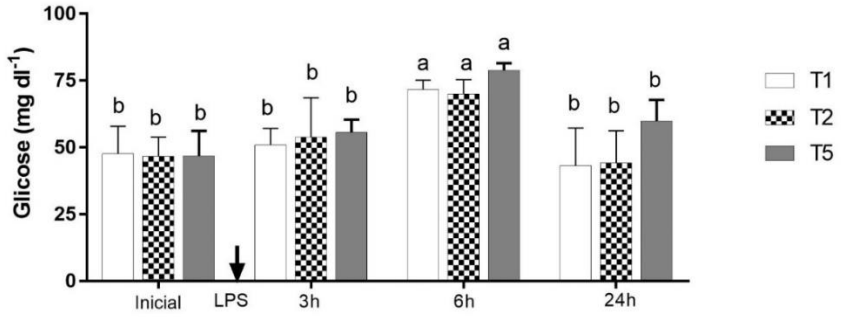

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a
a
a
a
b
b
a
ab
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

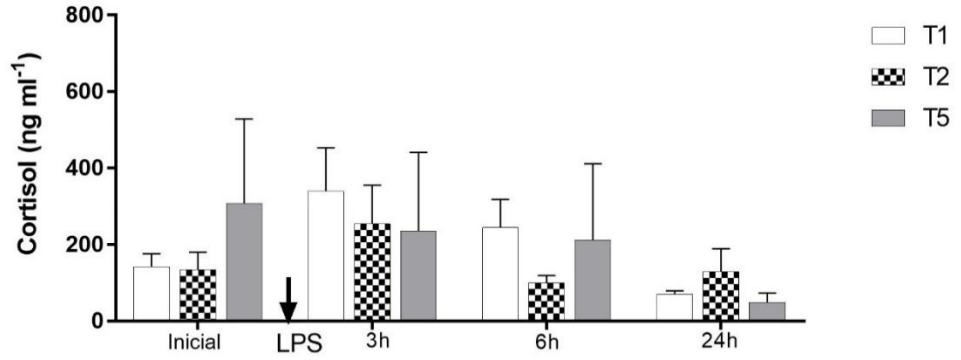

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
AB
a
B
A
a
ab
b
c
b
ab
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

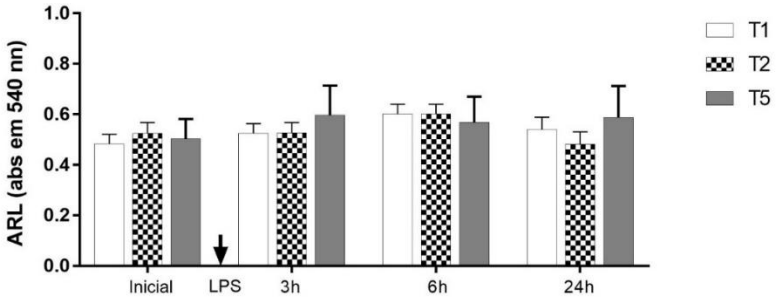

Triglicerídeo mg/dL
400
300
200
100
ab
b
b
ab
a
a
ab
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

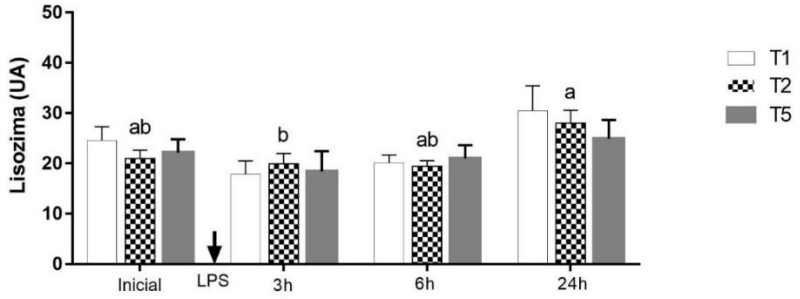

Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b
b
b
ab
ab
a
b
a
a
ab
ab
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4

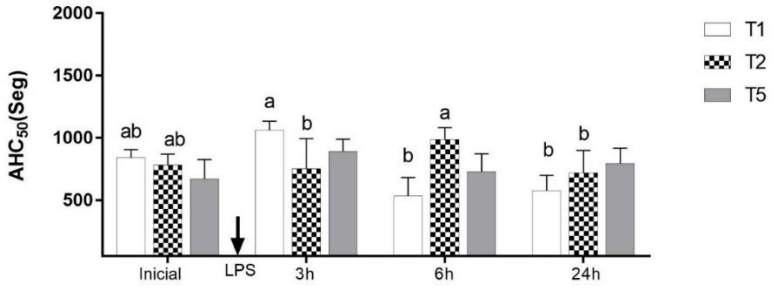
T1 X T2 X T5

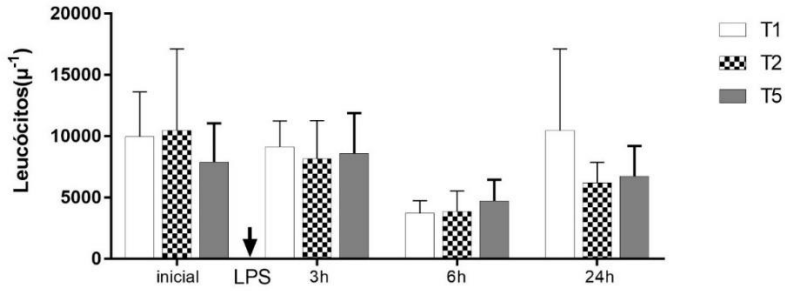

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b
b
b
b
b
b
a
a
a
b
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

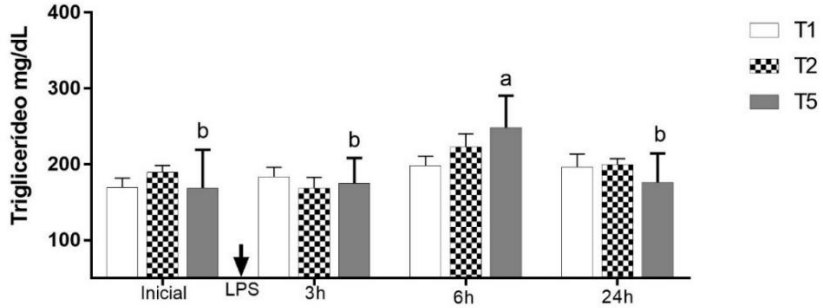

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5


ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

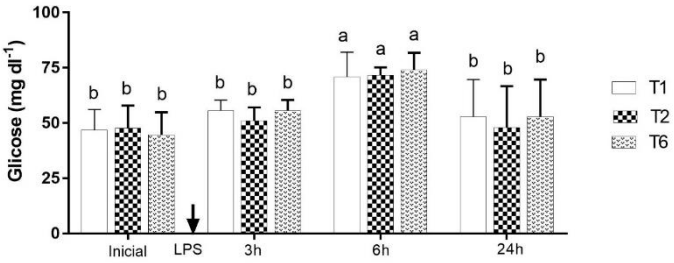

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab
b
ab
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

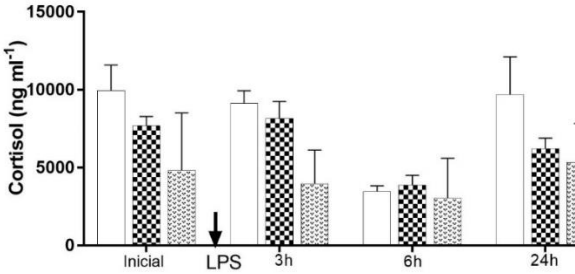

AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab
ab
a
b
b
a
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

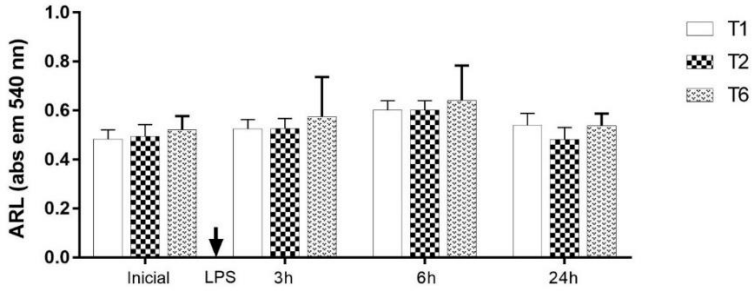

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

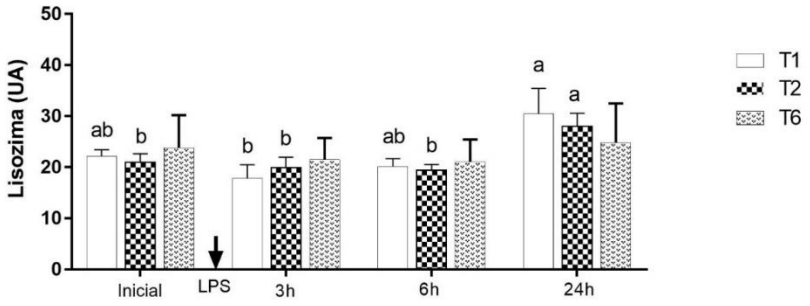

Triglicerideo mg/dL
400
300
200
100
b
b
a
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T5

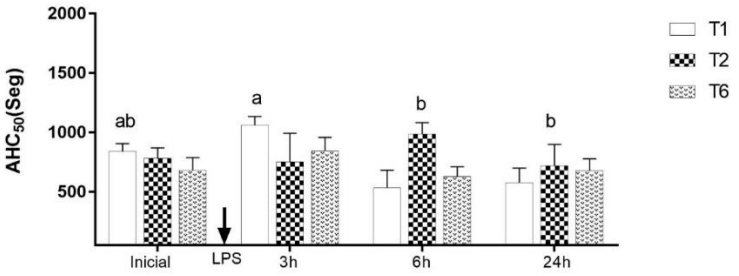
T1 x T2 x T6

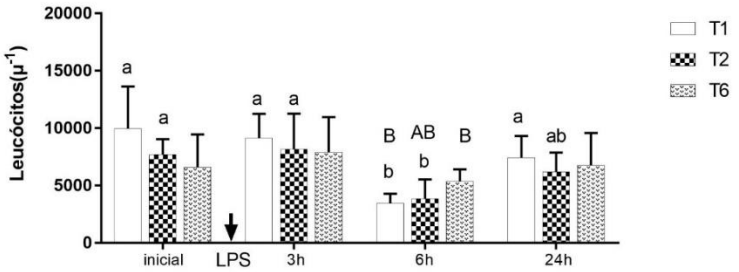

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b b b b b b a a a b b b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6

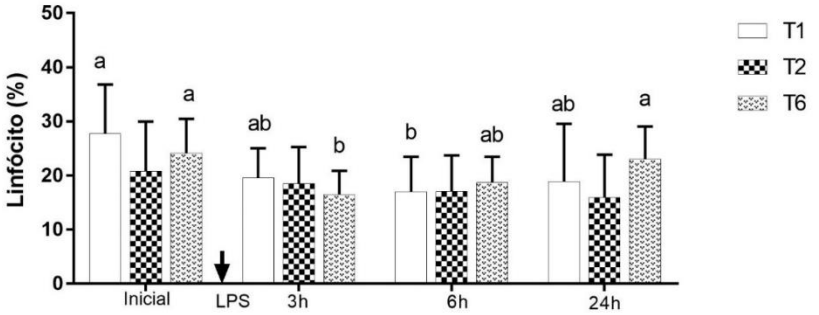

Cortisol (ng ml-1)
15000
10000
5000
0
Inicial
LPS
3h
6h
24h

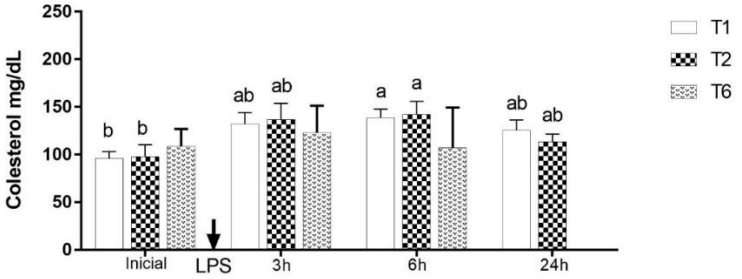

ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6

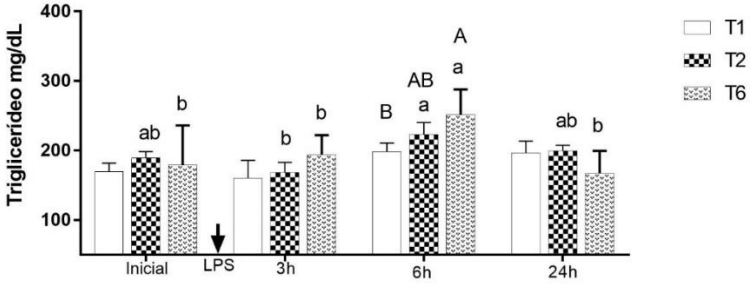

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab
b
b
b
ab
b
a
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab
a
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6

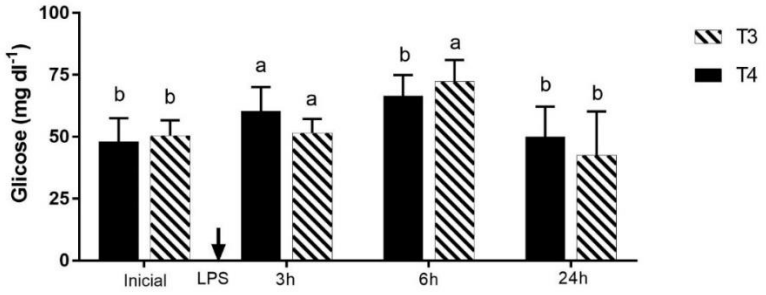

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a
a
a
a
B
AB
B
b
b
a
ab
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6

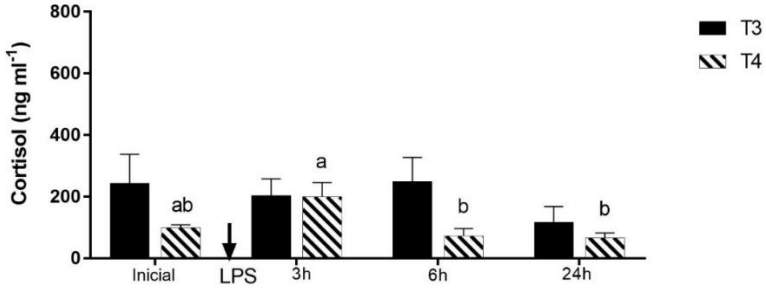

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
a
a
ab
b
b
ab
ab
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T6

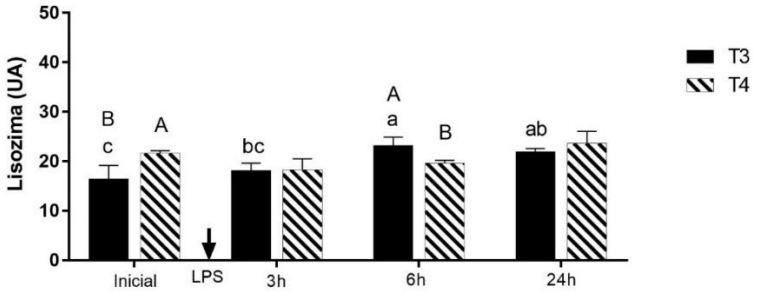

Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b b ab ab a a ab ab
Inicial LPS 3h 6h 24h
T1
T2
T6

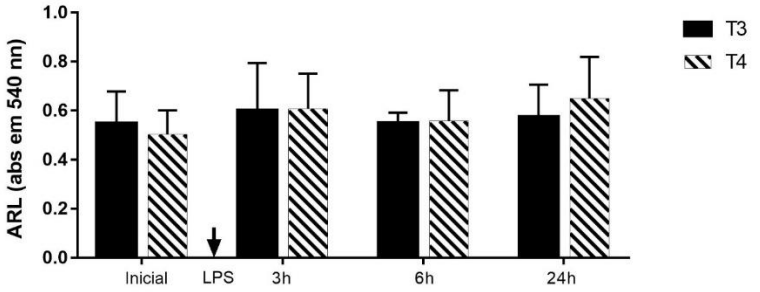

Triglicerideo mg/dL
400
300
200
100
b ab b b b B AB a A a ab b
Inicial LPS 3h 6h 24h
T1
T2
T6

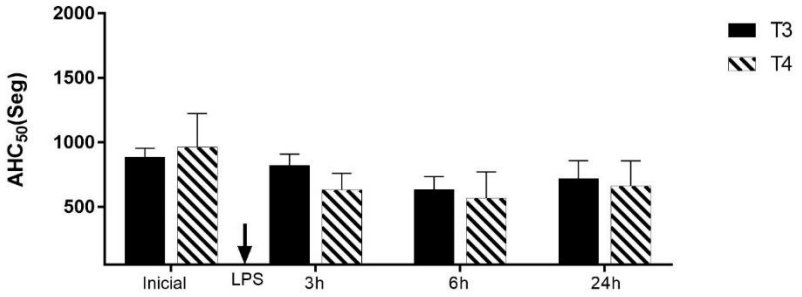
T3 x T4

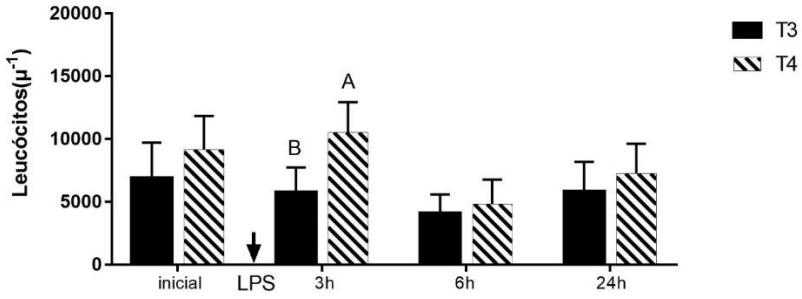

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b b a a b a b b
Inicial LPS 3h 6h 24h
T3
T4

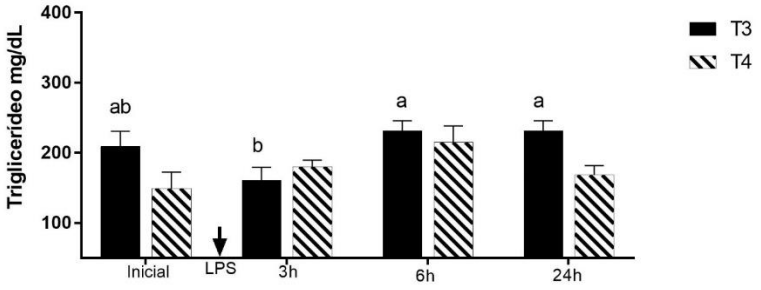

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
ab a b b
Inicial LPS 3h 6h 24h
T3
T4

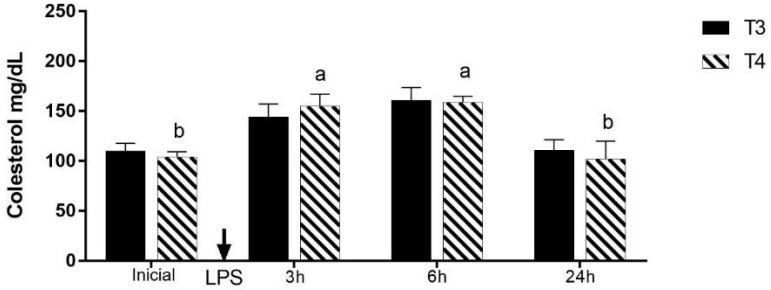

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
B
c
A
bc
A
a
B
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4


ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4

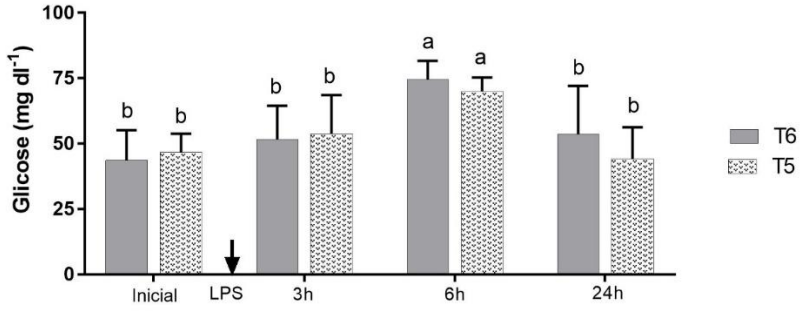

AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4

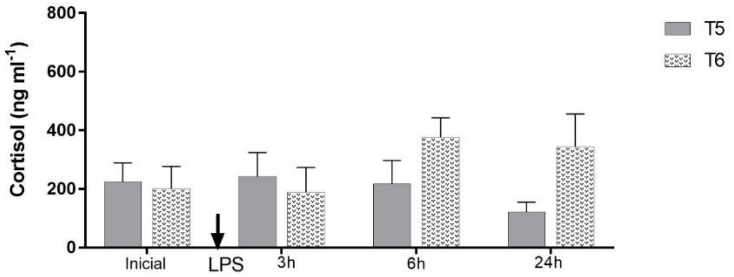

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
B
A
inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4

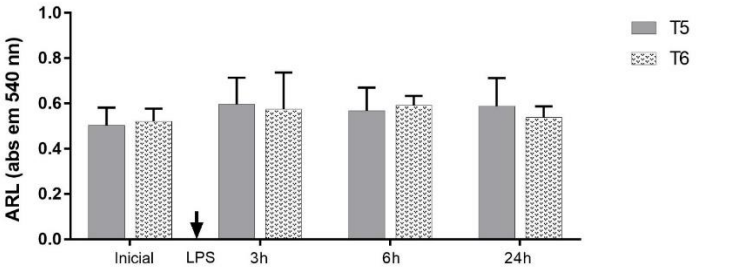

Triglicerídeo mg/dL
400
300
200
100
ab
b
a
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4

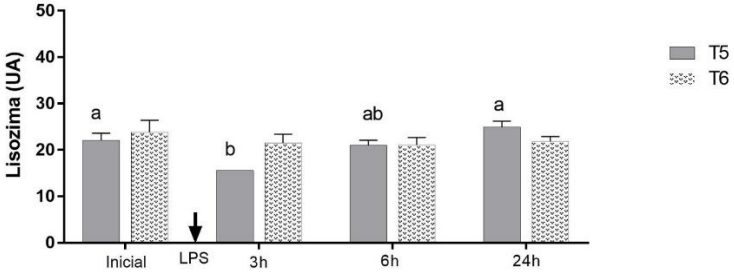

Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b
a
a
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T3
T4

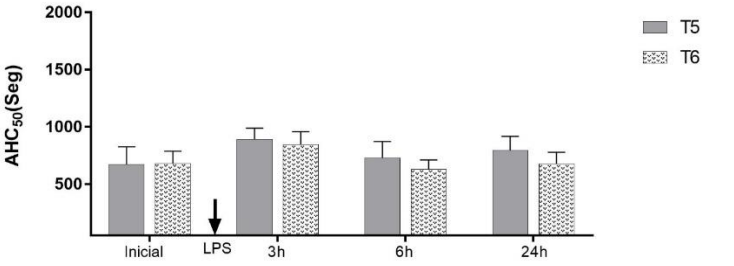
T5 x T6

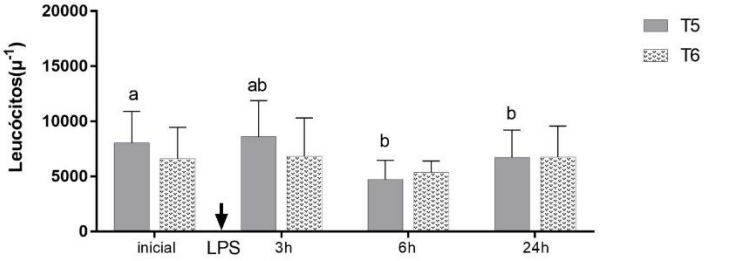

Glicose (mg dl-1)
100
75
50
25
0
b
b
b
b
a
a
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T6
T5

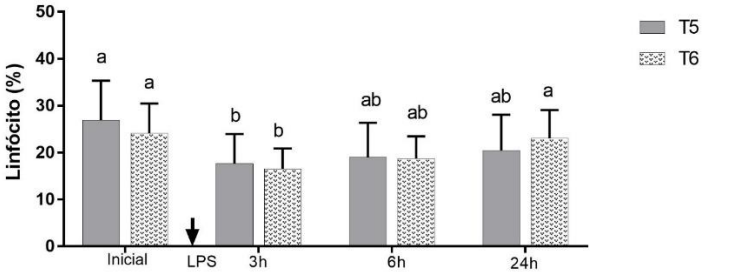

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6

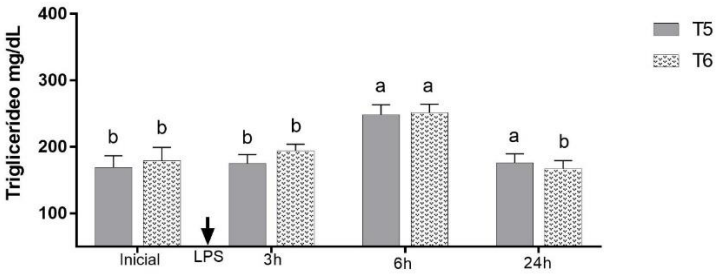

ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6

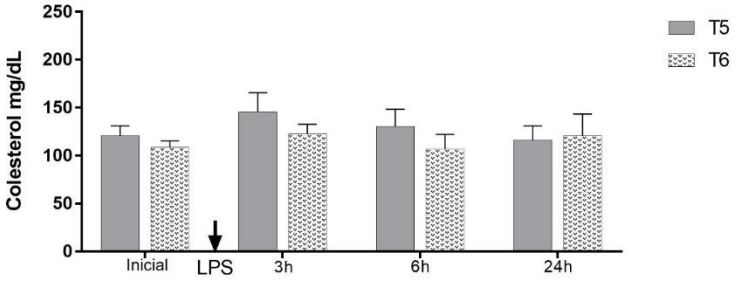

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
a
b
ab
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6

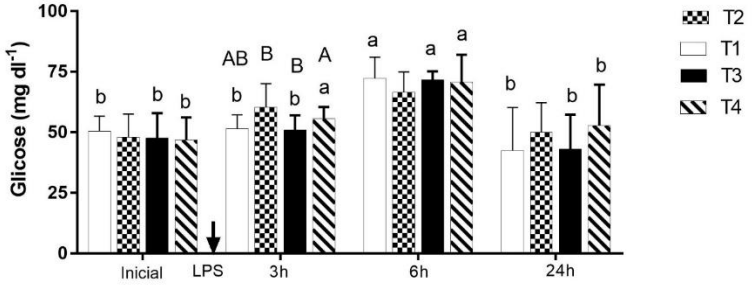

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a
ab
b
b
inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6

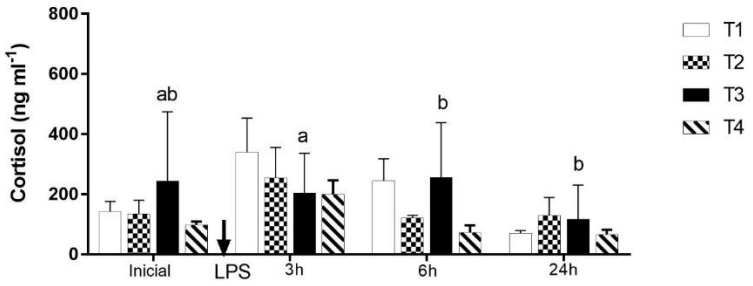

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
a
a
b
b
ab
ab
ab
a
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T5
T6

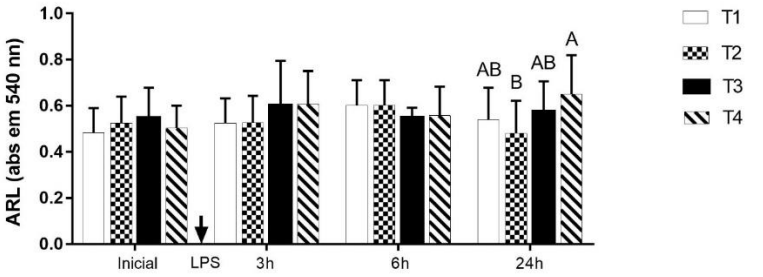


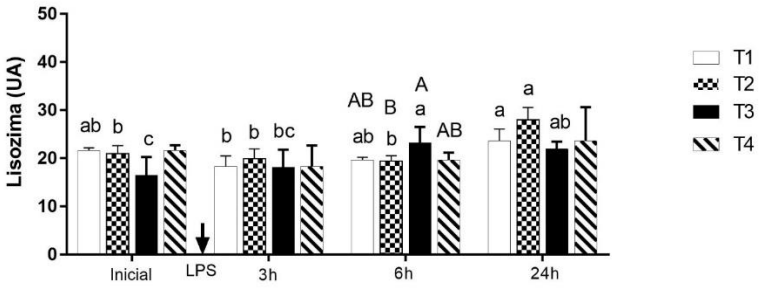


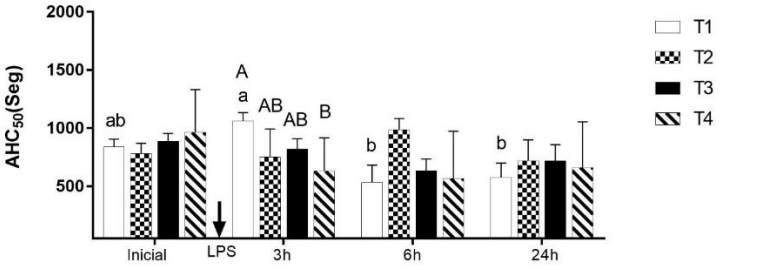
T1 X T2 X T3 X T4

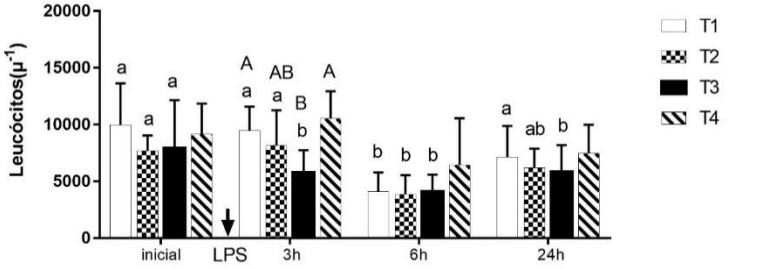


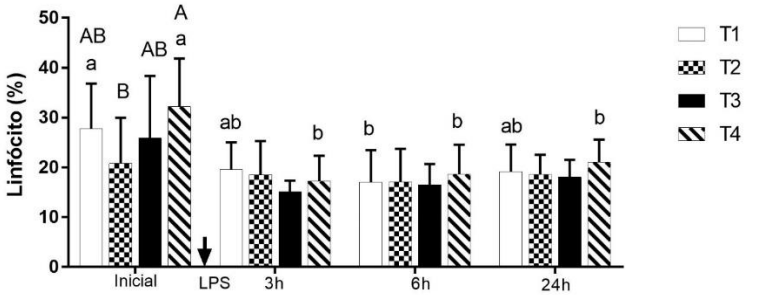


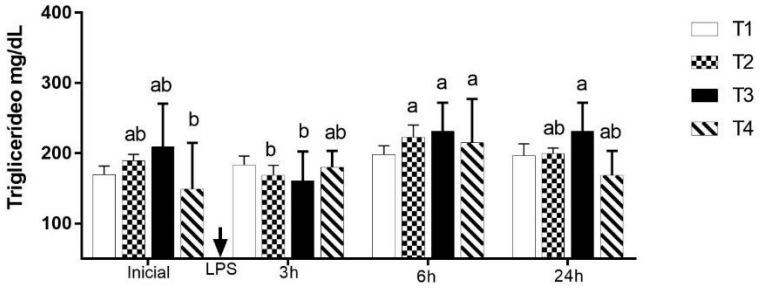

ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AB
B
AB
A
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3
T4

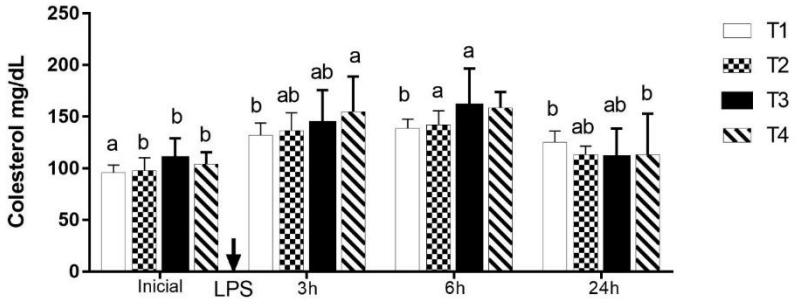

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab b c b b bc AB ab B b A a AB a a ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3
T4


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
ab A a AB AB B b b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3
T4

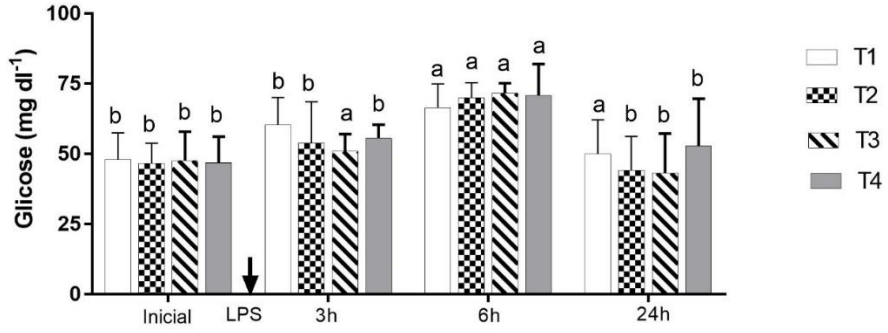

Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
a a a A a AB a B b A b b b a ab b
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3
T4

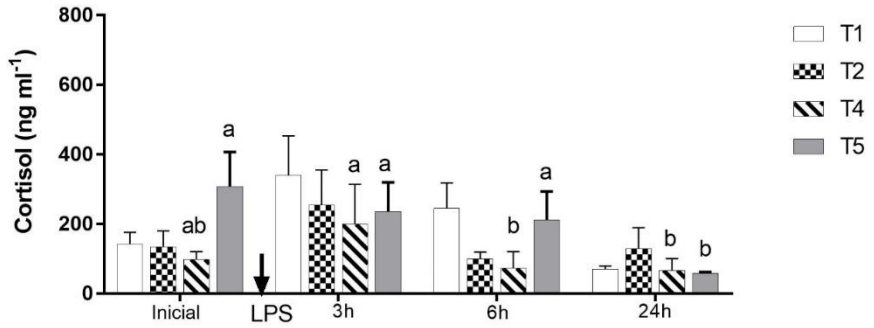

Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
AB a B AB A a ab b b b b ab b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T3
T4

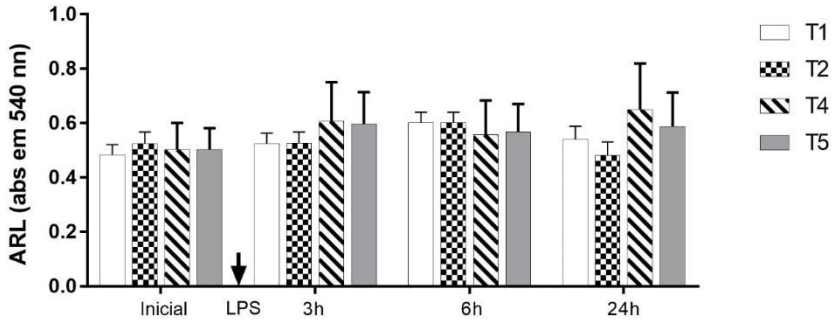


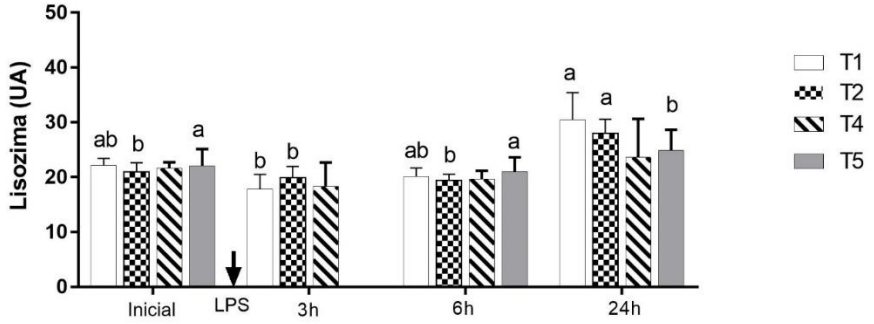


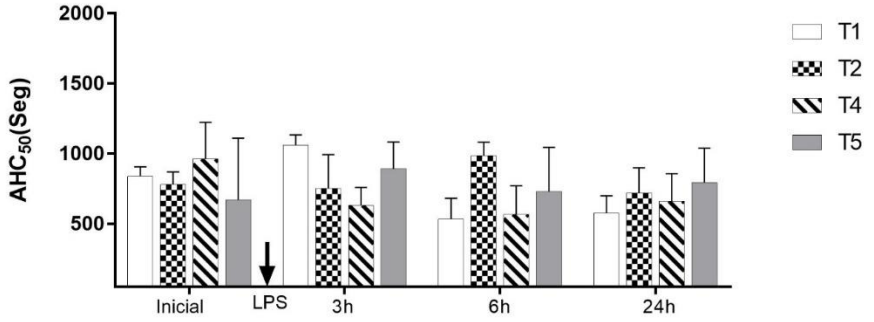
T1 X T2 X T4 X T5

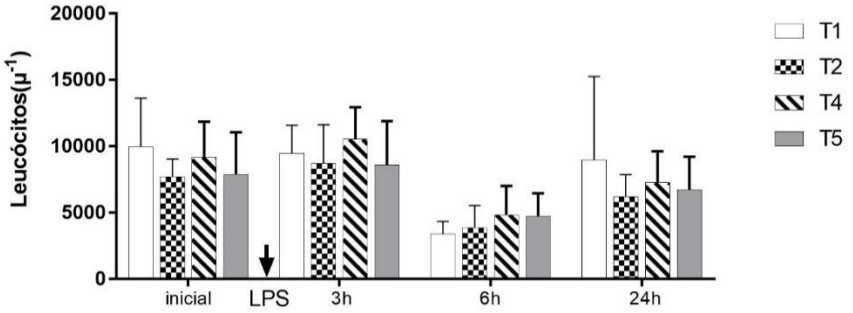


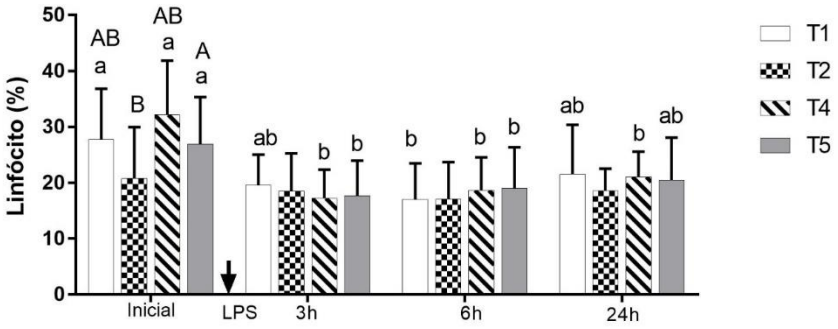

Cortisol (ng ml-1)
800
600
400
200
0
a
ab
a
a
b
a
b
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5

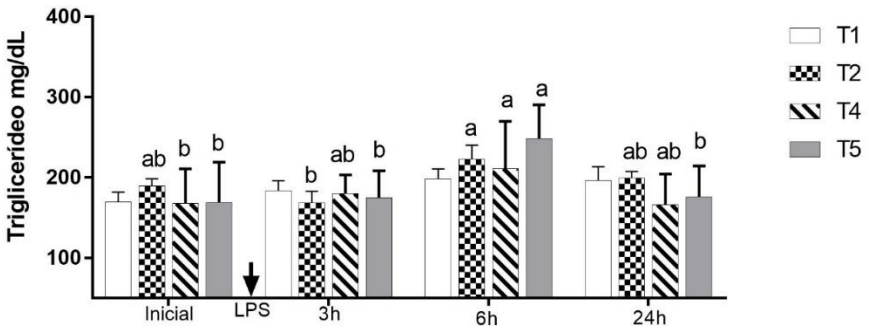

ARL (abs em 540 nn)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5

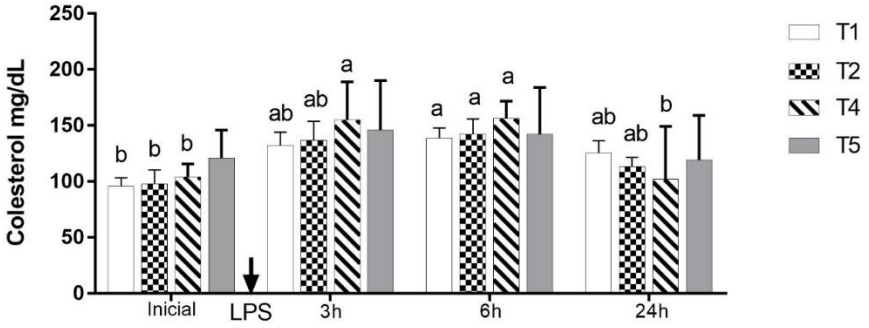

Lisozima (UA)
50
40
30
20
10
0
ab
b
a
b
b
ab
b
a
a
a
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5


AHC50(Seg)
2000
1500
1000
500
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5


Leucócitos(μ-1)
20000
15000
10000
5000
0
inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5


Linfócito (%)
50
40
30
20
10
0
AB
a
B
AB
a
A
a
ab
b
b
b
b
b
ab
b
ab
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5


Triglicerídeo mg/dL
400
300
200
100
ab
b
b
b
ab
b
a
a
a
ab
ab
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5


Colesterol mg/dL
250
200
150
100
50
0
b
b
b
ab
ab
a
a
a
a
ab
ab
b
Inicial
LPS
3h
6h
24h
T1
T2
T4
T5