

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR E DA REALIMENTAÇÃO NO
CRESCIMENTO E METABOLISMO ENERGÉTICO DE JUVENIS DE PACU
(*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**

Valéria Leão Souza

Orientadora: *Profª Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati*

Tese apresentada ao Centro de Aqüicultura da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aqüicultura (Área de Concentração em Aqüicultura).

**JABOTICABAL
Estado de São Paulo - Brasil
AGOSTO - 1998**

Souza, Valéria Leão

S719_e Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no crescimento e metabolismo energético de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) / Valéria Leão Souza. – Jaboticabal, 1998

XII, 118 p. : il. ; 28 cm

Tese (Doutor)-Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 1998

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Elisabete Maria Macedo Viegas, Dalton José Carneiro, Laurelúcia Orives Lunardi, José Alberto Mello de Oliveira

Bibliografia

1. Pacu-restrição alimentar-realimentação. 2. Pacu-crescimento-metabolismo energético. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3 : 636.085

Ficha Catalográfica elaborada pelo SATI-SBD



COMO UM RIO

Ser capaz, como um rio
que leva sozinho
a canoa que se cansa,
de servir de caminho
para a esperança.
E de lavar do límpido
a mágoa da mancha,
como o rio que leva, e lava.

Crescer para entregar
na distância calada
um poder de canção,
como o rio decifra
o segredo do chão.

Se tempo é de crescer,
reter o dom da força
sem deixar de seguir.
E até mesmo de sumir
para, subterrâneo,
aprender a voltar
e cumprir, no seu curso,
o ofício de amar.

Como um rio, aceitar
essas súbitas ondas
feitas de águas impuras
que afloram a escondida
verdade nas funduras.

Como um rio, que nasce
de outros, saber seguir
junto com outros sendo
e noutros se prolongando
e construir o encontro
com águas grandes
do oceano sem fim.

Mudar em movimento,
mas sem deixar de ser
o mesmo ser que muda.
Como um rio.

Thiago de Melo

Aos meus avós, Oscar Valeriano Leão e Wanda Arantes Leão, exemplos de vida, que me ensinaram a amar e a respeitar a natureza;

Aos meus tios, João Antônio (*in memoriam*), Vânia, Irma, Oscar e Honorina, que sempre estiveram presentes e unidos em todos os momentos de minha vida,

OFEREÇO

À minha mãe, Zelma Arantes Leão, pelo seu apoio, confiança e oportunidade a mim concedida para que pudesse voar em busca de sonhos, mesmo tendo que abandonar o ninho;

À minha irmã, Raquel Leão Souza, que junto comigo cresceu e hoje segue a sua busca por novos horizontes,

DEDICO

Existem pessoas especiais neste mundo de meu Deus!
Pessoas alegres e cheias de vida,
que sofrem, que choram como qualquer outro ser.
Mas que são graciosas em seus movimentos,
sabem admirar o sol em dias chuvosos,
semeiam flores em tempo de seca
e colhem frutos maravilhosos!
Pessoas assim, guiadas pelas estrelas,
são únicas em cada existência
e brilham naturalmente, sem o menor esforço.
Felizes aqueles que conviveram e acompanharam
alguns de seus passos, assimilando os ensinamentos
e espalhando o seu canto.

Beth, continue sendo sempre essa pessoa iluminada.
Que Deus a abençoe!

Ah! O tempo passa...

Mas as pessoas deixam suas marcas.

**Aos amigos, Lúcia Helena Vasques, Elenise Gonçalves Oliveira, Coléte
Fonseca, Sérgio Fonseca Zaiden, Marcos Antonio Vasques e Waldir José
Machado, pessoas queridas que participaram desse meu caminhar ajudando-
me a crescer como pessoa e profissionalmente, deixo-lhes o meu carinho.**

**"Não se pode fechar os olhos
Não se pode olhar pra trás
Sem se aprender alguma coisa"**

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

- À Prof^ª Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela amizade e orientação segura e carinhosa com que conduziu os meus passos ao longo desses anos.
- À Prof^ª Dra. Laurelúcia Orives Lunardi, pessoa admirável pelo seu carisma e profissionalismo, que sempre esteve aberta para me receber e ajudar.
- Ao Prof. Dr. José Alberto Mello de Oliveira, pela maneira carinhosa de me receber e transmitir, pacientemente, seus valiosos conhecimentos.
- Aos Profs. Drs. Dalton José Carneiro e Elisabete Maria Macedo Viegas, pela amizade e sugestões apresentadas para melhoria do presente trabalho.
- Ao Prof. Ruberval Armado Lopes (FORP/USP), por permitir a utilização do fotomicroscópio.
- À Prof^ª Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pela amizade e ajuda prestada durante a execução deste trabalho.
- Ao Centro de Aqüicultura da UNESP - Câmpus de Jaboticabal, pelo aprimoramento científico, e seu quadro funcionários, pelo apoio técnico.
- Aos queridos companheiros de trabalho, Damares, Euclides, Coelho, Orandi (Depto. de Morf. e Fisiol. Animal - FCAV/UNESP), Neusa, Maria Antonieta (Depto. de Bioquímica - FMRP/USP), Lia (Depto. de Patologia - FAVJ/UNESP) e Maria Paula (Depto. de Patologia - FMRP/USP), pelo apoio técnico nas análises laboratoriais.
- A todos os funcionários do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, pelo carinho e convívio durante essa minha jornada.
- A todos os meus colegas de curso, pela convivência.
- À FAPESP, pelo auxílio concedido na forma de bolsa de estudo.
- E a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. O metabolismo dos peixes e a privação alimentar	6
3.2. A realimentação	20
3.3. A influência da temperatura no metabolismo e desenvolvimento do peixe	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Animais e alimentação	24
4.2. Instalações	25
4.3. Delineamento estatístico	26
4.4. Amostragens	26
4.5. Métodos utilizados para obtenção dos dados	27
4.5.1. Glicose sangüínea	27
4.5.2. Glicogênio hepático	28
4.5.3. Ácidos graxos livres plasmáticos	29

4.5.4. Lipídios totais do fígado	29
4.5.5. Proteína total plasmática	30
4.5.6. Triiodotironina (T ₃) e Tiroxina (T ₄)	30
4.5.7. Índice hepato-somático (IHS)	30
4.5.8. Índice gordura-viscero-somático (IGVS)	30
4.5.9. Morfologia e morfometria dos hepatócitos	31
4.5.10. Ultraestrutura do glicogênio	31
4.5.11. Histoquímica do glicogênio	32
4.5.12. Histoenzimologia do metabolismo intermediário	33
4.5.13.1. Leitura das reações histoenzimológicas	35
4.5.13. Composição corporal	36
5. RESULTADOS	39
5.1. Condições climáticas locais e temperatura da água dos tanques	39
5.2. Desenvolvimento dos peixes	43
5.3. Composição corporal	44
5.4. Variáveis metabólicas	47
5.5. Morfologia e Morfometria dos hepatócitos	50
5.6. Ultraestrutura do glicogênio	55
5.7. Histoquímica do glicogênio	59
5.8. Histoenzimologia do metabolismo intermediário	61
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	87
8. ABSTRACT	88
9. LITERATURA CITADA	90
10. APÊNDICE	105

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Valores diários obtidos para temperatura ambiente e umidade relativa do ar no período experimental	40
2. Valores diários obtidos para precipitação pluviométrica e insolação no período experimental	41
3. Valores diários obtidos para temperatura da água do tanque 1 (controle) e do tanque 2 (experimental) no período de estudo	42
4. Fotografia de um exemplar de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) juvenil	43
5. Fotografia fígado do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) juvenil	51
6. Fotomicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	52
7. Fotoeletronmicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>). Utilização do processo rotineiro para microscopia eletrônica e da técnica de ósmio redução na marcação do glicogênio	56
8. Fotoeletronmicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>), processados pela técnica de ósmio redução, no dia zero, 2 dias de restrição alimentar e 7 dias de restrição alimentar	57
9. Fotoeletronmicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>), processados pela técnica de ósmio redução, aos 30 dias de restrição alimentar, 60 dias de restrição alimentar, 7 dias de realimentação e 30 dias de realimentação	58

10. Fotomicrografia da histoquímica do glicogênio (PAS) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	60
11. Fotomicrografia da histoquímica da fosfofrutoquinase (PFK) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	64
12. Fotomicrografia da histoquímica da fosfoglucomutase (PGM) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	65
13. Fotomicrografia da histoquímica da glicose-6-fosfatase (G6P-A) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	66
14. Fotomicrografia da histoquímica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	67
15. Fotomicrografia da histoquímica da 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	68
16. Fotomicrografia da histoquímica da lactato desidrogenase (L-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	69
17. Fotomicrografia da histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo – tetrazólio redutase (NADH ₂ -TR) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) .	70
18. Fotomicrografia da histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – tetrazólio redutase (NADPH ₂ -TR) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	71
19. Fotomicrografia da histoquímica da succinato desidrogenase (L-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	72

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Análise de variância obtida para o desenvolvimento dos peixes	44
2. Valores médios de peso corporal, comprimento padrão, índice hepato-somático (IHS) e índice gordura-víscero-somático (IGVS) dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados (n = 7)	44
3. Análise de variância obtida para a composição corporal dos peixes	46
4. Valores médios dos teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas na carcaça dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados (n = 7)	46
5. Análise de variância obtida para variáveis metabólicas dos peixes	47
6. Valores médios dos níveis de glicogênio hepático, glicose sangüínea, proteína total plasmática, lipídio total do fígado, ácidos graxos livres plasmáticos e triiodotironina (T ₃) dos peixes, no estudo dos fatores estudados (n = 7).....	48
7. Análise de variância obtida para a morfometria dos hepatócitos dos peixes	53
8. Valores médios da área do citoplasma, área do núcleo, volume do citoplasma e volume do núcleo dos hepatócitos dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados (n = 7)	54
9. Intensidade da reação de PAS em hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) (n = 4)	59
10. Atividade enzimática em hepatócitos de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)61	

1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da restrição alimentar e da realimentação sobre o crescimento e o metabolismo energético de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criados em cativeiro durante época de temperaturas ambientais altas, através de avaliações bioquímicas, histoenzimológicas e estruturais. O experimento foi conduzido no Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, no período de 17/10/95 a 16/01/96. Foram utilizados 98 peixes, com peso entre 200 e 300 g, divididos em dois grupos: controle e experimental. Os animais do grupo experimental foram amostrados aos 0, 2, 7, 30 e 60 dias de restrição alimentar e aos 7 e 30 dias de realimentação. Os do grupo controle foram alimentados diariamente e amostrados nos mesmos períodos que os do experimental. Para análise de variância foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado no esquema fatorial 2x7 (Alimentação x Períodos), com 7 repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados demonstraram que o peso corporal e comprimento padrão dos peixes foram inferiores durante o período de restrição alimentar, mas se recuperaram após a realimentação, apesar de não alcançarem os valores dos controles. O IHS (índice hepato-somático) e o IGVS (índice gordura-víscero-somático)

apresentaram diminuição na restrição alimentar e a recuperação, após a realimentação, levou a valores semelhantes aos dos controles. A restrição alimentar provocou diminuição de matéria seca e extrato etéreo da carcaça dos animais, com aumento na porcentagem de água sem, contudo, afetar os teores de proteína bruta e cinzas. Após a realimentação, os valores foram semelhantes aqueles dos controles. Os níveis de glicose sanguínea diminuíram em ambos os grupos, controle e experimental, ao longo do tempo, embora no experimental tenham sido registrados picos durante a restrição alimentar. Ocorreu, também, diminuição nos valores de glicogênio hepático em ambos os grupos, mas foi mais pronunciada no experimental. Os níveis de proteína total plasmática, lipídio total do fígado e T₃ (triiodotironina) foram menores nos animais experimentais em relação aos controles. Os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos aumentaram gradativamente durante a restrição alimentar e restabeleceram seus valores após a realimentação. A área do citoplasma e núcleo, volume do citoplasma e núcleo dos hepatócitos diminuíram durante a restrição alimentar e foram recuperados após a realimentação, equiparando-se aos controles. A desorganização estrutural do tecido hepático observada durante a restrição alimentar recuperou-se com a realimentação. As respostas obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão e da avaliação histoquímica de enzimas envolvidas no metabolismo energético corroboraram as alterações encontradas na análise bioquímica, referentes à dinâmica dos metabólitos, durante a restrição alimentar e realimentação.

2. INTRODUÇÃO

Enquanto os animais endotérmicos não podem sobreviver mais do que poucos dias ou semanas sem alimento, os ectotérmicos são capazes de se manter vivos por longos períodos de tempo sob esta condição (ABRAHAM *et al.*, 1984; SHERIDAN & MOMMSEN, 1991). Assim, muitas espécies de peixes estão bem adaptadas a mobilizar constituintes do corpo e sobreviver a longos períodos naturais de jejum, como por exemplo durante o inverno, nas flutuações sazonais do suprimento alimentar ou no processo migratório da reprodução (MACHADO *et al.*, 1989; SUMPTER *et al.*, 1991; MEHNER & WIESER, 1994).

O jejum envolve uma complexidade de alterações para promover o ajuste biológico do animal e suas conseqüências finais são altamente dependentes da espécie considerada, da idade do peixe e das condições experimentais, tais como temperatura da água, fotoperíodo, dieta pré-jejum, etc (LOVE, 1980; WEATHERLEY & GILL, 1987; BLASCO *et al.*, 1991).

Nos peixes, uma importante fonte de energia é o carboidrato estocado no fígado na forma de glicogênio. Diante da solicitação energética, é degradado e distribuído ao corpo pela corrente sanguínea, como glicose, cuja concentração é normalmente mantida constante, em

muitas espécies submetidas a longos períodos de jejum, às expensas do glicogênio hepático (RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1988). Mas, a fonte energética utilizada pelos peixes durante a restrição alimentar pode variar entre as espécies, pois algumas se utilizam principalmente do glicogênio, outras de lípidios e outras, ainda, de proteínas (SHERIDAN & MOMMSEN, 1991).

Vários fatores alteram o metabolismo dos peixes, mas o principal fator que afeta os processos fisiológicos e bioquímicos, entre os quais taxa de crescimento e desenvolvimento do animal, é a temperatura da água. Geralmente, os peixes são mais susceptíveis às alterações ocorridas no jejum em temperaturas altas (MOON *et al.*, 1985; ANGELINI *et al.*, 1992).

Muitos autores sugerem que os ajustes metabólicos ocorrem devido a alterações na quantidade e/ou qualidade das taxas limitantes de enzimas. Entretanto, formas independentes e diferentes de alterações enzimáticas são encontradas em diversos tecidos de peixes e, conseqüentemente, o controle da atividade metabólica difere de um órgão para outro. No músculo, o grau de adaptação da atividade enzimática e metabolismo oxidativo geralmente corresponde a uma compensação do metabolismo total do animal. Já no fígado, a forma de adaptação não se reflete necessariamente no metabolismo total, indicando que o metabolismo hepático não é controlado exclusivamente pela demanda da produção de energia (JANKOWSKY *et al.*, 1984).

Segundo MOON (1983), o combustível e o mecanismo de equilíbrio metabólico em um tecido pode ser estimado medindo o nível de atividade enzimática.

A histoquímica permite a interpretação de fenômenos biológicos em termos que transcendem os limites da morfologia, sem abandonar seus princípios básicos e, neste campo, a histoenzimologia contribui com um rico acervo de técnicas para o estudo do metabolismo celular. Desta forma, os métodos histoenzimológicos possibilitam o estudo da

identificação, localização e a maior ou menor atividade de determinada enzima a nível de tecidos, células e organelas (MELLO DE OLIVEIRA, 1986).

Como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie de águas essencialmente tropicais, de hábito alimentar onívoro e que tem sido sistematicamente cultivada e testada em experimentação piscícola, viu-se a necessidade de estudar a estratégia metabólica utilizada por este peixe quando submetido a períodos de restrição alimentar.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da restrição alimentar e da realimentação sobre o crescimento e o metabolismo energético de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criados em cativeiro durante época de temperaturas ambientais altas, através de avaliações bioquímicas, histoenzimológicas e estruturais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O METABOLISMO DOS PEIXES E A PRIVAÇÃO ALIMENTAR

A homeostase dos carboidratos em vertebrados superiores é realizada através da ação de alguns hormônios, incluindo os peptídeos pancreáticos, insulina e glucagon. Em mamíferos bem alimentados, os níveis de glicose e insulina no sangue são altos. A glicose é, então estocada como glicogênio no fígado e músculo. Quando os estoques de glicogênio estão repletos, o restante da glicose é transformado, através da glicólise, em lactato e ácidos graxos (BAANANTE *et al.*, 1991). Mamíferos submetidos a curtos períodos de jejum (poucos dias) apresentam níveis de glucagon elevados, enquanto os de insulina permanecem inalterados ou diminuem (Gilfant & Sherwin, 1983 citados por MOON *et al.*, 1989). Assim, o aumento na proporção de glucagon/insulina e o conseqüente aumento da produção de glicose hepática e glicemia, pela ativação da glicogenólise e gliconeogênese, ocorrem, principalmente, pela elevação nos níveis de glucagon (Cherrington & Vranic, 1986, citados por MOON *et al.*, 1989). Um jejum prolongado (semanas) resulta em uma leve queda nos

níveis de glucagon e promove uma diminuição ou relativa estabilidade nos níveis de insulina (RUDERMAN, 1975). Essas variações nos hormônios alteram significativamente o fluxo metabólico, especialmente no fígado e também o fornecimento de outros metabólitos para o mesmo, promovendo em todo o corpo a homeostase de carboidrato.

A glicose é um importante combustível metabólico nos vertebrados e vários mecanismos atuam para assegurar um constante suprimento para os tecidos glicose-dependentes, tais como células vermelhas do sangue, testículos, porção medular do rim, sistema nervoso, entre outros (Newsholme & Start, 1973 citados por SUAREZ & MOMMSEN, 1987). Ela pode originar-se do intestino durante a digestão e absorção de carboidratos ingeridos além de ser produzida pelo fígado e rins por glicogenólise, ou através da gliconeogênese a partir de lactato, aminoácidos e glicerol. Entretanto, nos animais que estão se alimentando normalmente a gliconeogênese é poupada, sendo ativada apenas durante o jejum, especialmente quando há diminuição nos estoques de glicogênio no fígado (SUAREZ & MOMMSEN, 1987).

A visão geral estabelecida para o metabolismo dos peixes é que a glicose é necessária para manter a produção basal de insulina, mas a sua função no metabolismo de carboidrato é mais direcionada para oxidação de glicose do que para ser estocada como glicogênio (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988). Em peixes bem alimentados, a insulina também estimula processos metabólicos, aumentando a glicólise e diminuindo a glicogenólise no fígado (OTTOLENGHI *et al.*, 1985). O glucagon aumenta a glicogenólise e a gliconeogênese nos hepatócitos de teleósteos (MOMMSEN & SUAREZ, 1984). Apesar da semelhança com mamíferos na ação dos hormônios, os processos ocorridos durante o jejum são muito diferentes (BAANANTE *et al.*, 1991).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o metabolismo em peixes apresenta peculiaridades que tornam o animal apto a suportar, por exemplo, prolongados períodos de

jejum; sejam decorrentes da indisponibilidade de alimentos ou por ocasião da época reprodutiva. Essa habilidade do peixe tem sido atribuída à baixa taxa metabólica ou à ativação do fluxo gliconeogênico (MOON, 1988).

Segundo NAGAI & IKEDA (1971), as alterações que ocorrem nos estoques de carboidrato, como o glicogênio, durante o jejum em peixes, são pequenas, contrastando com mamíferos. Geralmente, o glicogênio hepático e muscular é utilizado como fonte de energia em situações de estresse (MORATA *et al.*, 1982b; VIJAYAN & MOON, 1992). Durante a privação alimentar, os principais combustíveis utilizados são as reservas de lipídio (MOON & JOHNSTON, 1980; VIJAYAN *et al.*, 1993), mas o jejum prolongado pode aumentar a proteólise no músculo e fígado (MOMMSEN *et al.*, 1980). Entretanto, as respostas metabólicas decorrentes desta situação variam consideravelmente entre os teleósteos (WEATHERLEY & GILL, 1987; BASTROP *et al.*, 1991).

Sabe-se que não ocorre severa hipoglicemia como resultado de jejum prolongado. Algumas espécies de peixe, como *Carassius auratus* (CHAVIN & YOUNG, 1970), *Anguilla rostrata* (LEWIS & EPPLE, 1984), *Oncorhynchus kisutch* (SHERIDAM & MOMMSEN, 1991), *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990; BLASCO *et al.*, 1992), *Salmo trutta fario* (NAVARRO *et al.*, 1992) e *Piaractus mesopotamicus* (SOUZA, 1994) mantêm as concentrações de glicose no sangue próximas às de animais alimentados, depois de semanas ou meses de jejum. Entretanto, alguns autores (LARSSON & LEWANDER, 1973; FLETCHER, 1984; MACHADO *et al.* 1988, 1989; FOSTER & MOON, 1991; SHIKATA *et al.*, 1993; SOENGAS *et al.*, 1996) encontraram valores mais baixos deste metabólito em peixes privados de alimento.

A utilização dos estoques de glicogênio também apresenta diferentes respostas diante desta situação. Resultados de pesquisas (MACHADO *et al.*, 1988; SHIMENO *et al.*; 1990; PASTOUREAUD (1991); FOSTER & MOON, 1991; BLASCO *et al.*, 1992, NAVARRO *et al.*, 1992; SOUZA, 1994; COLLINS & ANDERSON, 1995; SOENGAS *et al.* 1996) revelaram

que há mobilização do glicogênio hepático para suprir o déficit energético no organismo do animal. O glicogênio muscular também pode ser mobilizado, embora em menor magnitude (BLACK & LOVE, 1986; FOSTER & MOON, 1991 e NAVARRO *et al.*, 1992). Entretanto, algumas espécies de peixe, como *Anguilla anguilla* (DAVE *et al.*, 1975) e *Oncorhynchus kisutch* (SHERIDAN & MOMMSEN, 1991) conservam total ou parcialmente o glicogênio hepático utilizando, principalmente, os estoques de lipídio como fonte energética.

Os lipídios exercem várias funções nos vertebrados, dentre elas, a de ser fonte energética e componente principal das membranas celulares. Nos peixes, os principais sítios de estoque de lipídio são o fígado, tecido adiposo e músculo esquelético. Mas o principal órgão utilizado varia muito entre os teleósteos (McCLELLAND *et al.*, 1995). Segundo Sheridan (1988), citado por McCLELLAND *et al.* (1995), as diferenças nos sítios de estoque de lipídio podem ser atribuídas ao estilo de vida, ou seja, peixes sedentários tendem a estocar lipídio no fígado e/ou tecido adiposo, enquanto os mais ativos utilizam o músculo.

Os estudos biológicos dos lipídios como combustível energético no metabolismo dos peixes têm revelado sua importância durante períodos de estresse, especialmente no jejum. As respostas metabólicas obtidas diante desta situação mostraram que, para algumas espécies de peixe, tais como *Clarias lazera* (YANNI, 1962), *Salmo gairdneri* (JEZIERSKA *et al.*, 1982), *Gadus morhua* (BLACK & LOVE, 1986), *Rhamdia hilarii* (MACHADO *et al.*, 1988), *Salmo trutta fario* (NAVARRO *et al.*, 1992), *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990; BLASCO *et al.*, 1992), *Piaractus mesopotamicus* (SOUZA, 1994) e *Ictalurus punctatus* (WEBSTER *et al.*, 1994), a quantidade de lipídio, tanto no fígado quanto em outros tecidos diminui, revelando que este metabólito tem contribuição substancial para o fornecimento de energia durante o jejum. Entretanto, para outras espécies, como *Carassius auratus* (STIMPSON, 1965) e *Anguilla rostrata* (LARSSON & LEWANDER, 1973), a proteína muscular é a principal fonte energética.

Como o transporte dos lipídios dos depósitos de gordura para os sítios de utilização é realizado pelos ácidos graxos livres plasmáticos, mobilizados em consequência da quebra de triglicerídeos, estes parecem ser a fração metabolicamente mais ativa de lipídios no plasma. A mobilização de ácidos graxos durante o jejum é muito importante para o controle do nível glicêmico. O aumento dos ácidos graxos livres plasmáticos inibe a utilização de glicose pelo tecido periférico e a liberação de glicose pelo fígado. Por outro lado, o aumento da captação de ácidos graxos livres plasmáticos pelo fígado favorece mais o metabolismo de gordura do que o de carboidratos (PLISETSKAYA, 1980).

LEWIS & EPPLE (1984), ZUIM *et al.* (1984), MACHADO *et al.* (1988, 1989), SHIMENO *et al.* (1990); SHERIDAN & MOMMSEN (1991) e SOUZA (1994) demonstraram que os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos de peixes aumentaram quando submetidos a períodos de jejum. Diferentemente, INCE & THORPE (1976) e FARBRIDGE *et al.* (1992) não encontraram alterações nos níveis deste metabólito em *Esox lucius* e *Oncorhynchus mykiss*, respectivamente.

O metabolismo de proteína ocorre em muitos órgãos, mas os mais importantes são o fígado e os músculos. Contudo, muitas vias catabólicas de aminoácidos estão localizadas no fígado, o que o torna o maior sítio catabólico do corpo. Da mesma forma, o controle dos níveis de proteína plasmática também ocorre no fígado e estes podem definir padrões característicos de funcionamento deste órgão em peixes (JANKOWSKY *et al.*, 1984; HEPHER, 1988).

Estudos realizados com *Gadus morhua* (KAMRA, 1966), *Salmo trutta* (Carbery, 1970 citado por LOVE, 1980) e *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990) revelaram que os níveis de proteína total plasmática diminuem durante o jejum. Entretanto, segundo outros pesquisadores (LARSSON & LEWANDER, 1973; DAVE *et al.*, 1975; INCE & THORPE, 1976;

BLACK & LOVE, 1986; SOUZA, 1994), os valores obtidos para este parâmetro permaneceram inalterados durante o jejum.

Assim, definir a estratégia metabólica utilizada por uma determinada espécie de peixe durante o jejum não é fácil. Segundo NEWSHOLME *et al.* (1978) e MOON (1983), o combustível e o mecanismo de equilíbrio metabólico em um tecido pode ser estimado medindo o nível de atividade enzimática.

A glicólise é a principal via de utilização da glicose e ocorre em todos os tecidos. É uma via singular, podendo utilizar o oxigênio (aeróbica), quando disponível, ou funcionar na ausência dele (anaeróbica).

Em peixes, todas as enzimas da glicólise tem sido encontradas. Estas enzimas são similares em peixes e mamíferos, quanto ao substrato específico e mecanismo de regulação. Em mamíferos, a glicólise é regulada pela quantidade de energia, estado nutricional e modulação hormonal. Entretanto, os conhecimentos a respeito das funções destes mecanismos regulatórios em peixes ainda são limitados (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988).

Como muitas espécies de peixe passam por períodos naturais de escassez de alimento, vários estudos tem tentado definir as respostas metabólicas dessas espécies sujeitas a este tipo de estresse (FOSTER & MOON, 1991).

Durante o jejum, a atividade das enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase no fígado de peixes encontra-se diminuída (FIDEU *et al.*, 1983; FOSTER & MOON, 1991). MOON & JOHNSTON (1980) notaram uma diminuição significativa na atividade dessas três enzimas no músculo branco de *Pleuronectes platessa* submetido a 4 meses de jejum. Diminuições similares, mas menores, das mesmas enzimas foram observadas também, no músculo vermelho e fígado. Segundo MOON (1983), a atividade da hexoquinase no fígado, músculo vermelho e branco, durante o jejum, é variável mas

geralmente baixa, fato que pode limitar a utilização de glicose por estes tecidos. A hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase tiveram atividades semelhantes e qualquer uma pode limitar o fluxo glicolítico. Das três enzimas, somente a fosfofrutoquinase tem demonstrado características regulatórias no fígado dos peixes. SHIKATA *et al.* (1993) não encontraram alterações na atividade da piruvatoquinase em *Cyprinus carpio*. As respostas obtidas por SOENGAS *et al.* (1996) revelaram uma diminuição na atividade da fosfofrutoquinase no fígado de *Salmo salar* num período superior a 7 dias de jejum.

Algumas informações sobre a influência de diferentes dietas na atividade das enzimas glicolíticas são disponíveis. A atividade da hexoquinase aumenta na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) submetida à dietas ricas em carboidrato, enquanto que dietas ricas em proteína diminuem a atividade da hexoquinase e fosfofrutoquinase (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988). As diferentes fontes de carboidratos testadas por LIN & SHIAU (1995), em tilápias (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*), não afetaram as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase, da via glicolítica.

A gliconeogênese é uma via biossintética responsável pela síntese *de novo* de glicose (a síntese de glicogênio geralmente está incluída) a partir de precursores incluindo lactato, aminoácido, glicerol e frutose. Várias das reações da via gliconeogênica são possíveis através da ação de enzimas que são facilmente reversíveis, comumente tidas como glicolíticas. Estas enzimas são: fosfoglicoisomerase, aldolase, triose fosfato-isomerase, gliceraldeído fosfato desidrogenase, fosfogliceratoquinase, fosfogliceratomutase e enolase. Entretanto, três enzimas da glicólise (hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase) são essencialmente irreversíveis e devem ser “superadas” para que ocorra fluxo gliconeogênico em sentido contrário. Para isto, os tecidos gliconeogênicos possuem enzimas específicas que catalizam reações no sentido gliconeogênico. Estas enzimas são: glicose-6-fosfatase, frutose 1,6 difosfatase, piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. A atividade dessas

enzimas está relacionada com a produção de glicose (SUAREZ & MOMMSEN, 1987; MOON, 1988).

Diferente da glicólise, que ocorre em todos os tecidos, em vertebrados a gliconeogênese é restrita a certos tecidos, incluindo o fígado e os rins, (Cahill, 1986 citado por MOON, 1988). O músculo esquelético pode produzir glicogênio, a partir do lactado, durante o exercício, mas não há evidências de que este processo contribui para o “pool” de glicose (Connett, 1979 e McLane & Holloszy, 1979 citados por MOON, 1988).

A gliconeogênese é afetada pela composição da dieta e pelo estado nutricional do peixe. COWEY *et al.* (1977) observaram aumento na atividade das enzimas gliconeogênicas em truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) alimentada com dietas ricas em proteína, comparativamente às dietas ricas em carboidrato. Uma diminuição na incorporação do C¹⁴ da alanina à glicose foi observada em peixes alimentados com dietas ricas em carboidrato. Estes efeitos também foram encontrados por HIGUERA & CARDENAS (1985), indicando uma certa capacidade da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) em regular a gliconeogênese de acordo com as alterações da dieta. LIN & SHIAU (1995) observaram que a glicose-6-fosfatase não foi afetada por diferentes fontes de carboidrato, em tilápias (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*).

O jejum geralmente aumenta o fluxo gliconeogênico em peixes como ocorre em mamíferos (MOON, 1988), mas para que se possa observar alguma alteração na atividade das enzimas gliconeogênicas é necessário um jejum prolongado (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988). MORATA *et al.* (1982a) observaram um aumento na atividade da frutose difosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), depois de 2 meses de jejum. MOON & JOHNSTON (1980) notaram um grande aumento na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase no *Pleuronectes platessa*, depois de 4 meses de jejum, embora não tenham encontrado alterações na atividade da piruvato carboxilase e

frutose difosfatase. A atividade da glicose-6-fosfatase foi aumentada durante o jejum, em *Salmo gairdneri* (NAGAYAMA *et al.*, 1972), *Leuciscus idus melanotus* (SEGNER & BRAUNBECK, 1988) e *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990). FOSTER & MOON (1991) encontraram aumento na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase em *Perca flavescens*, depois de 7 meses de jejum.

Em mamíferos, a atividade da glicose-6-fosfatase aumenta durante o jejum acentuando a gliconeogênese, como também foi observado em *Salmo gairdneri* por SCHÄR *et al.* (1985). Entretanto, Macha *et al.* (1982), citados pelos autores anteriores, encontraram diminuições na atividade desta enzima em outros teleósteos.

O glicogênio é a principal forma de armazenamento de carboidrato nos animais e ocorre principalmente no fígado e músculos. No músculo, ele atua como fonte de unidades de hexose para a glicólise. Já o glicogênio hepático está grandemente relacionado com a exportação de unidades de hexose para a manutenção da glicose sangüínea.

Os mecanismos de regulação intracelular envolvem tanto a síntese como a degradação da molécula do glicogênio. A reação de síntese é catalisada pela enzima uridina difosfo-glicose glicogênio transferase. Esta enzima existe sob duas formas, sendo que uma delas, a uridina difosfo-glicose glicogênio transferase (D), depende da concentração de glicose-6-fosfato do citosol. O aumento da concentração de glicose-6-fosfato ativa a enzima e acelera a síntese do glicogênio, enquanto a redução na sua concentração inibe a enzima e reduz o processo de síntese. A forma I é mais ativa que a D para catalisar a síntese de glicogênio (MELLO DE OLIVEIRA, 1986).

Em peixes, a glicogênio sintetase foi primeiramente encontrada na truta arco-íris, *Salmo gairdneri* (INGRAM, 1970), sendo que sua atividade no fígado e músculo vermelho foi idêntica e 15 vezes maior do que no músculo branco. O salmão do Pacífico (CHANG & IDLER, 1960) não mobilizou os estoques de glicogênio do fígado durante a migração para a

desova. Esta mesma inércia dos estoques de glicogênio no fígado foi vista em outros peixes, sendo a carpa o exemplo mais extremo. A carpa (*Cyprinus carpio*) pode permanecer em jejum por mais de 100 dias sem esgotar o glicogênio hepático (NAGAI & IKEDA, 1971). Na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), MORATA *et al.* (1982a) encontraram uma redução de 80% no glicogênio do fígado, após 20 dias de jejum. Prolongando o jejum, não houve redução no conteúdo do mesmo. Pelo contrário, o glicogênio aumentou até certo ponto e permaneceu constante durante o período de jejum (60 dias). Em truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) submetida ao estresse físico, MORATA *et al.* (1982b) observaram uma diminuição rápida no glicogênio hepático, com uma redução máxima de 40%, após 30 minutos. Depois disso, a síntese *de novo* recuperou os níveis de glicogênio aos seus valores originais em 45 minutos, permanecendo assim até o final do período experimental. No músculo, a quebra de glicogênio durante o estresse foi mais rápida e a síntese não foi observada nos 60 minutos do período experimental. Isto indica que o glicogênio hepático é um estoque de emergência e é mobilizado somente durante os primeiros minutos de uma situação crítica. Entretanto, o glicogênio muscular está mais prontamente disponível e especialmente no músculo branco, o glicogênio é rapidamente quebrado a lactato quando este músculo é requerido para trabalho de alta intensidade (Stevens & Black, 1966 citados por CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988) como, por exemplo, na captura de presa ou fuga de predadores.

O desdobramento do glicogênio inicia-se pela ação da fosforilase, que é uma enzima específica para o rompimento fosforolítico dos laços 1,4 do glicogênio, para dar glicose-1-fosfato. No fígado, a fosforilase existe nas formas a (ativa) e b (inativa) (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1988). MORATA *et al.* (1982b) encontraram somente a forma a na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*).

Durante o jejum, a atividade da enzima glicogênio fosforilase, assim como a fosfofrutoquinase e piruvatoquinase, diminui (FOSTER & MOON, 1991). Os resultados

obtidos por SUNDBY *et al.* (1991), com salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e bacalhau (*Gadus morhua*), demonstraram que a atividade da hexoquinase estava aumentada no fígado do salmão e diminuída no bacalhau. Encontraram, ainda, que a atividade da glicogênio fosforilase e fosfofrutoquinase estava aumentada no salmão. Entretanto, no bacalhau, o jejum provocou diminuição ou não alterou a atividade da fosforilase. SOENGAS *et al.* (1996) não encontraram alterações significativas na atividade da glicogênio fosforilase total no fígado do salmão do Atlântico (*Salmo salar*), em fase inicial de jejum (7 dias), mas a partir da segunda semana a atividade desta enzima aumentou significativamente em relação aos peixes controles. Quanto à atividade da glicogênio fosforilase a, houve um aumento aos 7 e 14 dias de jejum.

A combinação do jejum com o nado contínuo, em *Oncorhynchus kisutch*, não alterou a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio hepático (glicogênio fosforilase, glicogênio sintetase, piruvatoquinase, ou seus estados fosforilados, e lactato desidrogenase) quando comparado com peixes em repouso e alimentados (VIJAYAN *et al.*, 1993).

Outras enzimas da via da pentose fosfato, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas envolvidas na síntese de lipídio, diminuem no fígado de peixes durante o jejum, indicando uma redução na formação de lipídio (LOVE, 1980). Yamauchi *et al.* (1975) citados por CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR (1988) também encontraram diminuição na atividade dessas enzimas, no fígado de *Salvelinus fontinalis*, após uma semana de jejum. Em *Leuciscus idus melanotus*, a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi diminuída durante o jejum (SEGNER & BRAUNBECK, 1988).

A lactato desidrogenase é uma enzima glicolítica que catalisa a reação final, ou seja, a conversão de piruvato a lactato sob condições anaeróbicas (Maekawa, 1988 citado por

JAVED *et al.*, 1995). No salmão do Atlântico, *Salmo salar*, a atividade desta enzima foi maior durante o jejum quando comparada com a dos peixes alimentados (SOENGAS *et al.*, 1996).

A mobilização das reservas dos tecidos, durante o jejum prolongado, também resulta em alterações pronunciadas na sua estrutura. Nos hepatócitos, o efeito do jejum pode ser notado através da diminuição da área e volume celular, aparecimento de uma cadeia de fibras colágenas, acúmulo de partículas contendo ferro, mudanças no posicionamento e forma do núcleo, espaços intercelulares reduzidos e desaparecimento da organização celular. Além disso, o citoplasma apresenta baixa afinidade tintorial, o núcleo mostra uma coloração mais escura e há diminuição nos estoques de glicogênio e lipídio. Essas e outras alterações foram observadas por THEILACKER (1978), LOVE (1980), STORCH *et al.* (1983), STORCH & JUARIO (1983), WATANABE (1985), SOUZA *et al.* (1995) e BISBAL & BENGTON (1995).

O jejum afeta a atividade metabólica e durante esse período os processos essenciais são mantidos através das reservas energéticas endógenas, resultando em perda de peso (WEATHERLEY & GILL, 1987). Este efeito aparece claramente em vários órgãos, especialmente no fígado, o qual desempenha um papel central no metabolismo intermediário, visto que nele se realizam importantes vias metabólicas, como é o caso da síntese de glicogênio, gliconeogênese, lipogênese, β oxidação e outras essenciais à sobrevivência do organismo. Quando o animal é submetido a algum estresse crônico, como é o caso do jejum prolongado, a atividade de muitas enzimas diminui, como resultado de uma diminuição do potencial total do fígado (FOSTER & MOON, 1991).

Estudos têm demonstrado que o jejum provoca perda de peso corporal em *Cyprinus carpio* (BASTROP *et al.*, 1991), *Chanos chanos* (TZENG & YU, 1992), *Piaractus mesopotamicus* (SOUZA, 1994), *Perca fluviatilis* (MEHNER & WIESER, 1994), *Clarias gariepinus* (ZAMAL & OLLEVIER, 1995), *Anguilla anguilla* (OLIVEREAU & OLIVEREAU,

1997), *Acipenser transmontanus* (HUNG *et al.*, 1997), como também do fígado (JEZIERSKA *et al.*, 1982; MOON, 1983; MOON *et al.*, 1989; SHIMENO *et al.*, 1990; FOSTER & MOON, 1991; SOUZA, 1994; ZAMAL & OLLEVIER, 1995; SOENGAS *et al.*, 1996 HUNG *et al.*, 1997).

No peixe, a depleção de energia que ocorre durante o jejum indica que os vários constituintes do corpo podem ser mobilizados em diferentes taxas e que, estes substratos, apesar de semelhantes, podem ser utilizados de formas diferentes nos diversos tecidos do corpo. A tendência geral é conservar a proteína corporal, utilizando-se dos estoques de lipídio e glicogênio (WEATHERLEY & GILL, 1987).

A utilização dos constituintes do corpo leva à hidratação o tecido, isto é, aumenta o conteúdo de água. A diferença na perda de peso entre os peixes, durante o jejum, pode ser em parte, devido as alterações no conteúdo de água. Segundo LOVE (1970, 1980), num jejum moderado, o peso corporal é mantido pela água para compensar a perda de matéria orgânica. Entre os “peixes gordurosos”, há uma relação dinâmica inversa entre o conteúdo de lipídio e água no músculo, enquanto as espécies “não gordurosas” apresentam uma relação semelhante entre a proteína e a água.

A análise da composição corporal de algumas espécies de peixe revelou aumento no conteúdo de água e cinzas, sendo que os teores de lipídios e proteína diminuíram (STIRLING, 1976; REINITZ, 1983; ALLIOT *et al.*, 1984; UMINO *et al.*, 1991; ZAMAL & OLLEVIER, 1995). Os resultados obtidos por SOUZA (1994) foram semelhantes aos encontrados por estes pesquisadores, diferindo somente quanto à porcentagem de proteína na carcaça, a qual aumentou durante o jejum em *Piaractus mesopotamicus*. Esse aumento na porcentagem de proteína e cinzas foi provavelmente, decorrente da diminuição na concentração do lipídio e não de um aumento real desses componentes.

Os processos anabólicos, por meio dos quais os nutrientes absorvidos são convertidos nos tecidos durante o metabolismo, são regulados por hormônios os quais estão

entre os principais fatores que ajudam a promover o crescimento, associados a fatores genéticos e nutricionais (WEATHERLEY & GILL, 1987). Segundo esses autores, os hormônios tireoideanos podem influenciar no crescimento. Entretanto, ainda não está claro se o seu efeito promotor de crescimento é uma consequência de sua ação direta ou se eles potencializam a atividade anabólica de outros hormônios, especialmente o hormônio de crescimento (agindo sinergicamente ou com efeito permissivo), ou exercem alguma influência mais generalizada no metabolismo.

Segundo EALES & MacLATCHY (1989), a produção de T_3 é aumentada em estado anabólico (balanço energético positivo ou condições favoráveis ao crescimento somático; ingestão de alimento ou tratamento com andrógenos ou hormônio de crescimento) e é diminuída em estado catabólico (balanço energético negativo ou condições desfavoráveis ao crescimento somático; jejum, estresse ou altos níveis de estradiol associados com vitelogenese). Assim, em peixes, como em mamíferos, o estado tireoidal pode estar perfeitamente relacionado ao balanço energético e a produção completa de T_3 regula os processos de demanda de energia, que nos peixes incluem o crescimento somático, desenvolvimento e primeira maturação gonadal.

O jejum inibe a atividade da tireóide e as concentrações de T_3 existentes são afetadas primeiro do que as de T_4 (SUMPTER, 1992). Diminuições nos níveis de T_3 e T_4 foram mencionadas por FARBRIDGE *et al.* (1992), SCOTT-THOMAS *et al.* (1992) e YOUSON *et al.* (1994), em peixes privados de alimento.

Todas essas alterações sofridas pelo organismo do peixe durante o jejum e, conseqüentemente, a tolerância à fome, ocorre devido a uma reorganização metabólica, isto é, por adaptações bioquímicas reguladas pelo sistema endócrino e neural, no qual os hormônios pancreáticos e tireoideanos desempenham um importante papel (BASTROP *et al.*, 1991).

3.2. A REALIMENTAÇÃO

Quando o fornecimento de alimento é restabelecido, após um período de jejum, todos os processos passam a ser revertidos. Assim, os peixes utilizam primeiramente o alimento para suprir as necessidades energéticas na manutenção dos processos vitais e repor o catabolismo do tecido e, somente depois, o restante passa a ser usado para o crescimento (HEPHER, 1988).

Segundo LOVE (1980), a utilização de uma ração completa e de boa qualidade favorece a recuperação dos tecidos corporais e conseqüentemente, dos seus metabólitos, apresentando respostas satisfatórias para a realimentação dos peixes.

É interessante notar que as alterações nos metabólitos sangüíneos e tecidos são reversíveis e não patológicas como tem sido demonstrado em outros estudos durante a recuperação do crescimento na realimentação (WEATHERLEY & GILL, 1987). Muitos estudos têm demonstrado que a realimentação resulta em uma recuperação do glicogênio hepático e muscular, glicose sangüínea, aminoácidos, lipídio do fígado, ácidos graxos livres plasmáticos, proteína total plasmática, como também, da composição corporal, aos níveis normais (KAMRA, 1966; INCE & THORPE, 1976; LOVE, 1980; BLACK & LOVE, 1986; SHIMENO *et al.*, 1990; BLASCO *et al.*, 1991; SOUZA, 1994; BÖHM *et al.*, 1994; COLLINS & ANDERSON, 1995; HUNG *et al.*, 1997).

As concentrações de T_3 no plasma de peixes realimentados são rapidamente aumentadas (Higgs *et al.*, 1982, citados por SUMPTER, 1992), assim como os níveis de T_4 (HIMICK *et al.*, 1991), os quais são recuperados dentro de poucas horas.

Várias alterações na estrutura e ultraestrutura dos hepatócitos são também atribuídas às diferenças nas condições nutricionais. Entretanto, essas modificações em suas estruturas

resultantes do jejum podem ser revertidas após a realimentação (LOVE, 1980; STORCH & JUARIO, 1983).

Há evidências de que as enzimas da via glicolítica e gliconeogênica também retornem aos níveis originais após a realimentação (SEGNER & BRAUBECK, 1988; SHIMENO *et al.*, 1990; GARCÍA DE FRUTOS *et al.*, 1991; BAANANTE *et al.*, 1991).

Segundo Créac'h (1972) citado por LOVE (1980), as condições fisiológicas dos peixes em jejum parecem ser totalmente restabelecidas após dois meses de realimentação, e esses peixes podem ser diferenciados dos controles (alimentados) somente por suas elevadas concentrações de hemoglobina e seus fígados volumosos, os quais são muito ricos em glicogênio e potássio.

O retorno às condições alimentares adequadas seguidas de um período de privação alimentar ou má nutrição pode resultar num desenvolvimento rápido de crescimento denominado crescimento compensatório (DOBSON & HOLMES, 1984; JOBLING *et al.*, 1993). Em algumas espécies de peixes, tais como: *Salmo gairdneri* (WEATHERLEI & GILL, 1981; DOBSON & HOLMES, 1984), *Phoxinus phoxinus* (RUSSELL & WOOTTON, 1992), *Leuciscus cephalus*, *Chalcalburnus chalcoides*mento, *Scardinius erythrophthalmus* (WIESER *et al.*, 1992), *Salmo salar* (MORTENSEN & DAMSGÅRD, 1993), *Salvelinus alpinus* (MORTENSEN & DAMSGÅRD, 1993; JOBLING *et al.*, 1993), *Piaractus mesopotamicus* (SOUZA, 1994), e *Ictalurus punctatus* (KIM & LOVELL, 1995b) esse fenômeno foi observado.

Trabalhos realizados com animais domésticos têm evidenciado que as respostas quanto ao crescimento compensatório podem ser influenciadas por vários fatores, como a severidade da restrição alimentar imposta, a idade, sexo e estado de maturidade sexual do animal, temperatura e composição nutriente da dieta a ser fornecida durante a fase de realimentação. Entretanto, os possíveis efeitos desses fatores em peixes são quase desconhecidos (JOBLING *et al.* 1993).

3.3. A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO METABOLISMO E DESENVOLVIMENTO DO PEIXE

A temperatura da água é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento e sobrevivência dos peixes. Durante a aclimação térmica, muitos processos fisiológicos e bioquímicos são fundamentalmente reorganizados e esses incluem alterações na taxa metabólica, tolerância térmica, preferência de temperatura, função digestiva, eficiência de conversão alimentar, crescimento e desenvolvimento (WOO, 1990).

Muitos estudos têm documentado os efeitos da temperatura no metabolismo dos peixes, mas é difícil estabelecer um padrão de resposta, tendo em vista que as espécies respondem diferentemente ao estresse, seja ele nutricional ou térmico.

Para algumas espécies de peixes, tais como *Barbus holubi*, *Cyprinus carpio*, *Labeo umbratus*, *Labeo capensis* (Van VUREN & HATTINGH, 1978), *Sarotherodon mossambicus*, *Cyprinus carpio* (SMIT *et al.*, 1981) e *Chrysophrus major* (WOO, 1990), os níveis de proteína plasmática diminuíram em temperaturas mais baixas. Entretanto, em *Salmo gairdneri* (SMIT *et al.*, 1981) o mesmo não ocorreu. Já os níveis de glicose apresentaram respostas diferentes, podendo-se observar que para *Cyprinus carpio*, *Chrysophrus major* e *Salmo gairdneri* os valores foram maiores, enquanto que em *Sarotherodon mossambicus* isso ocorreu em uma temperatura intermediária (20°C).

A adaptação ao frio também resulta em uma imensa variedade de alterações no fígado. Por exemplo: reorganização metabólica que inclui diminuição na taxa de consumo de oxigênio (Moerland & Sidell, 1981 citados por MOON *et al.*, 1985), marcante hipertrofia do fígado, troca do lipídio pelo carboidrato como fonte de combustível e diminuição na atividade de algumas enzimas (WOO, 1990). Alguns mecanismos podem ser responsáveis pelas alterações na taxa desses processos metabólicos. A concentração e ativação de enzimas existentes pode ser variada, a síntese de novas formas de proteína pode ser induzida ou a

existência de enzimas micro-ambientais (pH citosólico, fluidez de lipídio da membrana) pode ser modificada (Hochachka & Somero, 1984, citados por MOON *et al.* 1985). Desta forma, o efeito da temperatura auxilia as espécies de peixe de clima temperado a suportar a falta de alimento, que geralmente ocorre no inverno (WEATHERLEY & GILL, 1987).

Como se sabe, os peixes têm um limite, alto e baixo, de tolerância térmica e “percebem” quando a temperatura é ótima para o crescimento, reprodução, conversão alimentar ótima e resistência à doenças. A maioria dos peixes de águas tropicais pára de se alimentar quando a temperatura atinge 17 a 18°C e atinge a taxa máxima em 28 e 30°C (BORGHETTI & CANZI, 1993). Desta forma, muitas espécies apresentam uma taxa de crescimento maior com o aumento da temperatura (CUI & WOOTON, 1988).

A temperatura também desempenha um papel crucial durante o jejum influenciando nas alterações dos componentes corporais (WEATHERLEY & GILL, 1987). Durante o verão foram observadas diminuições mais acentuadas nos níveis de glicose (OTTOLENGHI *et al.*, 1995), glicogênio hepático (MEHNER & WIESSER, 1994), peso do fígado (WALSH *et al.*, 1983; MEHNER & WIESER, 1994) e peso corporal (KIM & LOVELL, 1995a). Entretanto, a aclimação térmica, a baixas temperaturas, resultou em aumento na atividade de algumas enzimas durante o jejum (WALSH *et al.*, 1983).

Como pode-se notar, os efeitos do jejum, no verão, são mais severos do que no inverno, por ser a taxa metabólica mais alta (maior demanda energética) nesse período (WEATHERLEY & GILL, 1987).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido no Centro de Aqüicultura da UNESP e no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal (localizado a 21°15'22" de latitude sul, 48°18'58" de longitude oeste e a 595m de altitude, a 2 Km do perímetro urbano). A fase experimental de campo realizou-se no período de 17 de outubro de 1995 a 16 de janeiro de 1996.

4.1. ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 98 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), sem distinção de sexo, com peso inicial entre 200 e 300 g, procedentes do Centro de Aqüicultura. Estes animais foram divididos em dois grupos: controle (alimentado - A1) e experimental (restrição alimentar e realimentação - A2).

Os animais foram submetidos a um período de adaptação de sete dias nos tanques, antes de iniciar o período experimental.

A ração foi fornecida diariamente aos dois grupos durante o período de adaptação e, posteriormente, apenas um dos grupos (controle) continuou sendo alimentado diariamente. Foi utilizada ração comercial estrusada para crescimento e engorda Fri-Peixe nº 2, fabricada pela Rações Fri-Ribe S.A., contendo: 12% de umidade, 24% de proteína bruta, 3% de extrato etéreo, 8% de fibra bruta, 11% de matéria mineral, 1,8% de cálcio e 0,6% de fósforo, cuja composição básica consistia de: milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de vísceras, farinha de peixe, sal comum (NaCl), calcário calcítico e premix mineral vitamínico. A quantidade de ração fornecida variou 3 a 5% do peso corporal, de acordo com as oscilações da temperatura da água, conforme as indicações do fabricante. O arraçoamento foi feito diariamente, no período da manhã, em torno de 09:00 horas.

A temperatura da água dos tanques foi medida diariamente na sub-superfície, às 09:00 e 16:00 horas, utilizando-se um termômetro Incoterm, e os dados de temperatura ambiente, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e insolação foram obtidos através da Estação Agroclimatológica, do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP.

4.2. INSTALAÇÕES

Os animais do grupo controle (A1) e experimental (A2) foram mantidos em dois tanques distintos, cada um contendo inicialmente 49 animais, com área de 39,1 m², profundidade média de 1,10 m, vazão mínima de 5,4 l/min., abastecidos com água procedente de mina.

4.3. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Após a fase de adaptação, o grupo experimental foi amostrado aos 0 (P0), 2 (P1), 7 (P2), 30 (P3) e 60 (P4) dias de restrição alimentar e aos 7 (P5) e 30 (P6) dias de realimentação. O grupo controle foi alimentado diariamente e amostrado nos mesmos períodos que o grupo experimental.

Para a análise de variância foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) no esquema Fatorial 2x7 (Alimentação x Períodos), com 7 repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (STEEL & TORRIE, 1980):

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.
Alimentação (A)	1
Períodos (P)	6
Interação (A x P)	6
(Tratamentos)	(13)
Resíduo	84
TOTAL	97

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa ESTAT, desenvolvido na FCAV/UNESP.

4.4. AMOSTRAGENS

Sempre no dia anterior a cada período de amostragem, sete animais de cada grupo (controle e experimental) foram capturados, dos respectivos tanques, com rede arrasto e transferidos para aquários de alvenaria do Laboratório Didático do Centro de Aqüicultura.

Na amostragem, os animais foram retirados individual e cuidadosamente dos aquários, com auxílio de um puçá, anestesiados com benzocaína (1g/15L), pesados e medidos em balança de precisão e ictiômetro, respectivamente. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia caudal, com seringas heparinizadas, para as determinações bioquímicas. Posteriormente, tiveram a cavidade abdominal aberta para a retirada do fígado, que foi pesado, dividido em porções, embalado em papel alumínio, congelado em gelo seco e mantido em freezer a -20°C para posterior dosagem de glicogênio e lípidio. Fragmentos de aproximadamente 5 mm^3 foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido a -190°C para histoquímica e outros, fixados em Bouin a 4°C para análises histológicas. Alguns fragmentos foram fixados em solução de Karnovsky (KII), a 4°C , para microscopia eletrônica de transmissão.

A carcaça de todos os animais utilizados neste experimento foi congelada em freezer a -20°C para posterior análise de sua composição. Os peixes foram moídos inteiros (com vísceras, mas com o trato digestivo limpo de conteúdo e gordura), lavando-se a máquina a após moagem de cada indivíduo. Posteriormente, foram coletadas amostras da massa homogeneizada, liofilizadas a -40°C por 24 horas e utilizadas para determinação de matéria seca, umidade, proteína bruta, cinzas e extrato etéreo, realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Nutrição Animal e Pastagens da FCAV/UNESP.

4.5. MÉTODOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS DADOS

4.5.1. Glicose Sangüínea

Para a determinação da glicose sangüínea foi utilizado o método colorimétrico de KING & GARNER (1947), que consistiu, primeiramente, em misturar a 1,8 ml de solução

isotônica (sulfato de sódio e sulfato de cobre), 0,1 ml de sangue e 0,1 ml de solução de tungstato de sódio a 10%. Centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e mantido congelado a -20°C , em freezer, até a realização da análise, quando foi adicionado 1 ml de reagente cúprico e 3 ml de arsenomolibídico. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

4.5.2. Glicogênio Hepático

O teor de glicogênio hepático foi dosado pelo método de antrona, de acordo com CARROL *et al.* (1956).

Amostras de 500 mg de tecido foram colocadas em tubos de centrífuga contendo 2 ml de KOH a 30% e depois hidrolizadas em banho-maria a 100°C por 1 hora. Em seguida foram adicionadas 5 gotas de Na_2SO_4 saturado e 4,5 ml de álcool etílico a 95%. Essa mistura foi agitada com bastão de vidro e aquecida até a fervura em banho-maria. O bastão foi retirado e os tubos centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso com 2 ml de água destilada aquecida e adicionado 4,5 ml de álcool etílico 95%. Após quatro lavagens, o precipitado foi ressuspenso com 2 ml de água destilada aquecida e completado para 10 ml com água destilada. 0,1 ml desse volume foi transferido para um tubo, completado para 2 ml de água destilada, colocado em água com gelo, adicionando-se lentamente 4 ml do reagente de antrona dissolvido em H_2SO_4 a 95%. As leituras das amostras, em absorvância, foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm.

4.5.3. Ácidos Graxos Livres Plasmáticos

A dosagem de ácidos graxos livres plasmáticos foi realizada utilizando o método proposto por DOLE & MEINERTZ (1960).

Foi utilizado 0,2 ml de plasma para o processo de extração com heptana. Na titulação foi acrescentada uma solução indicadora, preparada com timol azul a 0,1% e o ponto de viragem (aparecimento da cor mostarda) foi obtido adicionando-se NaOH a 0,5 N em presença de nitrogênio.

4.5.4. Lipídios Totais do Fígado

A extração dos lipídios totais do fígado foi feita através da técnica de BLIGH & DYER (1959).

Utilizou-se 500 mg de tecido homogeneizado em 5 ml da mistura de extração com solvente orgânico (clorofórmio - metanol 2:1). Após a filtragem do homogenado foi acrescentada água destilada na proporção de 5:1, agitado e centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm para obtenção de camadas distintas, sendo uma contendo a fração lipídica (clorofórmio) e outra não lipídica (metanol). Através do isolamento da camada que continha o lipídio, cada amostra foi colocada em placas de Petri previamente pesadas e em seguida levadas a estufa à 100°C por 1 hora para evaporação. A diferença entre os pesos inicial e final das placas permitiu a realização dos cálculos para obtenção da porcentagem de lipídio em cada amostra.

4.5.5. Proteína Total Plasmática

A proteína total plasmática foi dosada pelo método de macrobiureto, de acordo com GORNALL *et al.* (1949), utilizando-se 0,1 ml de plasma e adicionando 0,9 ml de água destilada. Em seguida, adicionou-se 4 ml do reagente de biureto. Após 30 minutos, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro Hitachi U-2000, a 540 nm.

4.5.6. Triiodotironina (T₃)

A determinação dos níveis de T₃ no plasma foi realizada por radioimunoensaio (RIA), com kits Coat-A-Count T₃ Total da DPC. O limite mínimo de detecção para este hormônio foi de 0,18 ng/ml.

4.5.7 Índice Hepato-somático (IHS)

Foi estimado através da relação porcentual entre o peso do fígado (g) e o peso corporal (g).

$$\text{IHS} = \left[\frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso corporal}} \right] \times 100$$

4.5.8. Índice Gordura Viscero-somático (IGVS)

Foi estimado através da relação porcentual entre o peso da gordura visceral (g) e o peso corporal (g).

$$\text{IGVS} = \left[\frac{\text{peso da gordura visceral}}{\text{peso corporal}} \right] \times 100$$

4.5.9. Morfologia e Morfometria dos Hepatócitos

Para descrição estrutural dos hepatócitos foi utilizada a técnica de coloração de hematoxilina de Harris (HE), descrita por BEHMER *et al.* (1976). As amostras de fígado, após coletadas e fixadas em Bouin a 4°C, foram incluídas em parafina, microtomizadas com 5 µm de espessura e coradas por HE. Os cortes histológicos foram analisados por microscópio de luz, com objetiva de 40x, acoplado ao sistema analisador de imagem Kontron Elektronik (Videoplan) para análise morfométrica dos hepatócitos (área e volume do citoplasma e núcleo). De cada lâmina observada, procedeu-se a leitura de 30 hepatócitos e, posteriormente, calculou-se a média dos valores obtidos para cada parâmetro analisado.

Os cortes foram fotomicrografados no Fotomicroscópio Nikon Alphaphot-2 YS2.

4.5.10. Ultraestrutura do Glicogênio

Para a observação da distribuição de glicogênio nos hepatócitos, fragmentos de 1 mm³ de fígado foram fixados em solução de Karnovsky (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído, 0,25% CaCl₂, pH 7,4), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 2 horas a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram lavados no mesmo tampão e desidratados com passagens em soluções crescentes de acetona, nas seguintes concentrações: acetona 30% x 10 min., acetona 50% x 10 min., acetona 70% x 10 min., acetona 90% x 10 min., acetona 95% x 10 min. e acetona 100% 3 x de 20 min. cada. O procedimento seguinte foi a infiltração, iniciada com a imersão das amostras em uma mistura de araldite e acetona pura (1:1), por 2 horas, e depois colocadas em uma mistura de araldite e acetona (2:1), por 24 horas à temperatura ambiente. A inclusão foi feita em mistura plena de araldite na seguinte proporção: araldite 6005 resina 20 ml,

BDMA (acelerador) 1 ml, DDSA (endurecedor) 16 ml, dibutilftato (plastificador) 0,4 ml. O material incluído foi colocado na estufa de 60°C por 72 horas, para que se efetuasse a polimerização.

Para uma melhor visualização de glicogênio, as amostras, após a fixação, foram pós-fixadas em solução de ósmio a 1% + ferrocianeto de potássio a 1,5% em temperatura ambiente por 2 horas (técnica de ósmio redução - NOVIKOFF, 1971). Após essa etapa, o material foi transferido diretamente para acetona 30%, sem pré-lavagem. Em seguida, as amostras foram processadas rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão.

Os cortes foram fotoeletronmicrografados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL-100C.

4.5.11. Histoquímica do Glicogênio

Para a demonstração histoquímica do glicogênio na célula hepática foi utilizada a coloração pelo PAS (Ácido Periódico – Reativo de Schiff) associada com a coloração de cortes vizinhos previamente submetidos à digestão por α amilase (WEGMANN & VERNE, 1958). Foram utilizados fragmentos de fígado congelados e mantidos em nitrogênio líquido, os quais foram criotomizados a -14°C, com 5 μ m de espessura. Os cortes foram montados em xarope de Apathy, observados em microscópio e fotomicrografados no Fotomicroscópio Nikon Alphaphot-2 YS2.

Para a leitura das lâminas foi utilizada uma avaliação qualitativa da intensidade da reação, cuja graduação variou de (-), quando negativas, a (+++++), quando positivas. A designação para cada tipo de reação, quando positiva, foi a seguinte: fraca (+), moderada (++), forte (+++) e intensa (+++++).

4.5.12. Histoenzimologia do Metabolismo Intermediário

Foram utilizados fragmentos de fígado congelados e mantidos em nitrogênio líquido, os quais foram criotomizados a -14°C , com 5 μm de espessura, para análise da atividade de enzimas indicadoras das vias de utilização do combustível energético a nível celular, através de técnicas histoenzimológicas, tais como:

a) **Fosfofrutoquinase (PFK, EC 2.7.1.11)**: segundo BONILLA & SCHOTLAND (1970). Os cortes foram pré-fixados em acetona por 20 min. em temperatura ambiente, secos ao ar por 2 horas, incubados por 2 horas com solução mãe (tampão arseniato 0,02 M pH 7,0 = 5,0 ml; NAD - Sigma N-7004 = 6,6 mg; adenosina 5' trifosfato - Sigma A-3377 = 5,5 mg; sulfato de magnésio = 1,2 mg; água destilada deionizada = 5,0 ml) = 5,0 ml e frutose-6-fosfato de sódio - Sigma F-3627 = 3,0 mg, fixados em formol a 10% por 5 min. e lavados em água destilada deionizada.

b) **Fosfoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1)**: segundo MELLO DE OLIVEIRA (1977). Os cortes foram incubados a 37°C por 30 min. com solução estoque (glicose-1,6-fosfato - Sigma G-7000 = 0,75 mg; cloreto de magnésio 0,1 M = 0,4 ml; NADP - Sigma N-0505 = 2,5 mg; NBT - Sigma N-6876 = 1,0 mg; tampão tris HCl 0,2 M pH 7,4 = 2,5 ml; água destilada deionizada = 4,6 ml) = 4,0 ml e glicose-1-fosfato - Sigma G-5875 = 1,2 mg, fixados em formol neutro 10% por 5 min. e lavados em água destilada deionizada.

c) **Glicose-6-fosfatase (G6P-A, EC 3.1.3.9)**: segundo CHIQUOINE (1953). Os cortes foram incubados no seguinte meio: - Solução I (acetato de sódio 0,2 M = 1,0 ml; glicose-6-fosfato - Sigma G-7250 = 1,5 mg) = 1,0 ml; - Solução II (acetato de chumbo 2% = 0,30 ml; água

destilada = 1,70 ml) = 1,0 ml, por 30 min. a 37°C, lavados em água destilada deionizada, passados em sulfeto de amônio 1% (filtrado) por 1 min. e lavados em água corrente.

d) **Glicose-6-fosfato desidrogenase / 6-fosfogluconato desidrogenase (G6P-D, EC 1.1.1.49 / 6PG-D, EC 1.1.1.44):** segundo WEGMANN & GERZELI (1961). Os corte foram incubados nos seguintes meios: - **G6P-D** [solução estoque (tampão tris HCl 0,2 M pH 7,4 = 5,0 ml; cloreto de magnésio 0,1 M = 0,8 ml; NADP - Sigma N-0505 = 5,0 mg; NBT - Sigma N-6876 = 2,0 mg; água destilada deionizada = 9,2 ml) = 5,0 ml e glicose-6-fosfato - Sigma G-7250 = 1,52 mg]; - **6PG-D** (solução estoque = 5,0 ml e 6-fosfogluconato - Sigma P-7877 = 2,86 mg), a 37°C por 30 min., lavados em água destilada deionizada, fixados em formol neutro 10% por 5 min. e lavados em água destilada deionizada novamente.

e) **Lactato desidrogenase (L-D, EC 1.1.1.27):** segundo WEGMANN & SOTELO (1962). Os cortes foram incubados em solução lactato de sódio 0,2 M (ácido láctico = 1,45 ml; água destilada deionizada = 100,0 ml; hidróxido de sódio 1 N = 5,0 ml) = 0,3 ml; NBT = 0,15 mg; NAD (forma oxidada) - Sigma N-7004 = 0,9 mg, tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 = 0,3 ml e água destilada deionizada = 0,6 ml, a 37°C por 30 min., lavados em água destilada deionizada, fixados em formol neutro 10% (filtrado) por 5 min. e lavados em água destilada deionizada novamente.

f) **Nicotinamida adenina dinucleotídeo - tetrazólio redutase / Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - tetrazólio redutase (NADH₂-TR, EC 1.6.99.3 / NADPH₂-TR, EC 1.6.99.1):** segundo SCARPELLI *et al.* (1958). Os cortes foram incubados nas soluções: - **NADH₂-TR** (NADH₂ - Sigma N-8129 = 3,0 mg; NBT - Sigma N-6878 = 1,0 mg; tampão tris 0,2 M pH 7,4 = 4,0 ml; água destilada deionizada = 1,0 ml); - **NADPH₂-TR** (NADPH₂ - Sigma N-1630 = 3,0 mg; NBT - Sigma N-6878 = 1,0 mg; tampão tris 0,2 M pH 7,4 = 4,0 ml; água destilada deionizada = 1,0 ml), por 20 min. a 37°C, lavados em água destilada deionizada,

passados em formol neutro a 10% (filtrado) por 5 min. e lavados novamente em água destilada deionizada.

g) **Succinato desidrogenase (S-D, EC 1.3.99.1)**: segundo WEGMANN & TORDET-CARIDROIT (1960). Os cortes foram incubados em succinato de sódio = 67,5 mg, NBT - Sigma N-6878 = 0,5 mg, tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 = 2,0 ml e água destilada deionizada = 2,0 ml, por 30 min. a 37°C, lavados em água destilada deionizada, fixados em formol neutro 10% por 5 min. e lavados em água destilada deionizada novamente.

Antes da utilização do material experimental propriamente dito, foram realizados vários testes destinados à padronização dessas enzimas para o fígado de pacu, utilizando fígado e músculo de rato e peixe, tendo em vista que as mesmas são aplicadas em tecido de mamífero, rotineiramente no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Para cada reação realizada no meio contendo o substrato, outro corte foi incubado, em paralelo, num meio de composição idêntica, porém sem o substrato (Testemunha).

Os cortes foram montados em xarope de Apathy, observados em microscópio e fotomicrografados no Fotomicroscópio Nikon Alphaphot-2 YS2.

Para a classificação das enzimas em estudo, foi seguida a nomenclatura adotada pela União Internacional de Bioquímica (I.U.B., 1978).

4.5.11.1. Leitura das Reações Histoenzimológicas

Para a leitura da atividade enzimática foi utilizada uma avaliação qualitativa da intensidade das reações, cuja graduação variou de (-), quando negativas, a (++++), quando positivas, em função do acúmulo do “produto final da reação” (PFR) no citoplasma

celular. Quando positivas, as designações para cada tipo de intensidade de reação foram as seguintes: fraca (+), moderada (++), forte (+++) e intensa (++++).

4.5.13. Composição Corporal

a) Matéria Seca (MS) e Umidade

O teor de umidade na amostra original foi determinado pesando-se aproximadamente 10 g de amostra, sendo esta acondicionada em vidros previamente tarados, os quais foram, então, transferidos para o liofilizador. Após 24 horas, o material foi novamente pesado, obtendo-se a 1ª MS, da seguinte forma:

$$1^{\text{a}} \text{ MS (\%)} = \frac{\text{PS}_1}{\text{PU}_1} \times 100$$

onde: PS_1 = peso seco para obtenção da 1ª MS

PU_1 = peso úmido da amostra original

Para determinar a 2ª MS, foi pesado 1 g da amostra liofilizada, colocando-a em cadinho de porcelana previamente tarado, o qual foi levado à estufa a 105°C, por 12 horas, sendo então, pesado novamente. Após a segunda pesagem, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$2^{\text{a}} \text{ MS (\%)} = \frac{\text{PS}_2}{\text{PU}_2} \times 100$$

onde: PS_2 = peso seco para obtenção da 2ª MS

PU_2 = peso úmido da amostra liofilizada

A matéria seca original (MSO) foi obtida, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{MSO (\%)} = \frac{1^{\text{a}} \text{ MS} \times 2^{\text{a}} \text{ MS}}{100}$$

O teor de umidade contido na carcaça foi obtido através da fórmula:

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \text{MSO}$$

onde: MSO = matéria seca original

b) Proteína Bruta (PB)

Para a determinação da proteína bruta, foi utilizado o método de Kjeldhal (A.O.A.C., 1984), o qual avalia o teor de nitrogênio total contido na amostra. Para tanto, o nitrogênio presente nos aminoácidos transforma-se em N amoniacal, através de processos de digestão e destilação, sendo em seguida titulado com ácido clorídrico. A porcentagem de proteína bruta foi calculada da seguinte forma:

$$\text{PB (\%)} = \frac{\text{ml} \times \text{N} \times 14 \times 6,25}{\text{PA}} \times 100$$

onde: ml = quantidade de HCl gasto na titulação

N = normalidade do HCl (0,1 N)

14 = peso atômico do nitrogênio

6,25 = fator de transformação para cálculo da proteína

PA = peso da amostra (100 mg)

c) Cinzas ou Matéria Mineral (MM)

A determinação da cinza ou matéria mineral (MM) foi realizada pelo método de Weende (A.O.A.C., 1984), que consiste em colocar 1 g da amostra em cadinho de porcelana previamente tarado, sendo este levado à mufla a 600°C, por 3 horas, para que a amostra seja incinerada.

$$\text{Cálculo: MM (\%)} = \frac{\text{TC} - \text{T}}{\text{PA}} \times 100$$

onde: TC = tara do cadinho + cinza

T = tara do cadinho

PA = peso da amostra

d) Extrato Etéreo (EE)

Este método utiliza o Extrator de Soxhlet (método de Weende - A.O.A.C., 1984), para isolar o lipídio contido na amostra e consiste em colocar 1 g do material na garrafa de Soxhlet, fazendo passar éter de petróleo pela amostra, por 5 horas. O lipídio foi recolhido em um balão volumétrico previamente tarado.

$$\text{Cálculo: EE (\%)} = \frac{\text{BG} - \text{B}}{\text{PA}} \times 100$$

onde: BG = peso do balão + gordura

B = tara do balão

PA = peso da amostra

5. RESULTADOS

5.1. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS LOCAIS E TEMPERATURA DA ÁGUA DOS TANQUES

Segundo os dados fornecidos pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, o clima do município de Jaboticabal é definido como sendo do tipo Cwa, ou seja, sub-tropical, relativamente seco, caracterizado por chuvas de verão.

Os dados diários da temperatura ambiente (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e insolação observados durante a fase experimental encontram-se nas Figuras 1 e 2.

Durante o período experimental, ocorreram grandes oscilações na temperatura ambiente. Registros de temperatura máxima mais baixos seguidos por aumentos na umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, com diminuições nas horas de insolação, foram decorrentes de dias chuvosos ou nublados acompanhados por frentes frias, situação esta geralmente atípica para essa época do ano. Entretanto, foram registrados também, dias

chuvosos quando a umidade relativa do ar apresentou valores elevados, coincidindo com aumentos na temperatura máxima, situação esta característica da região.

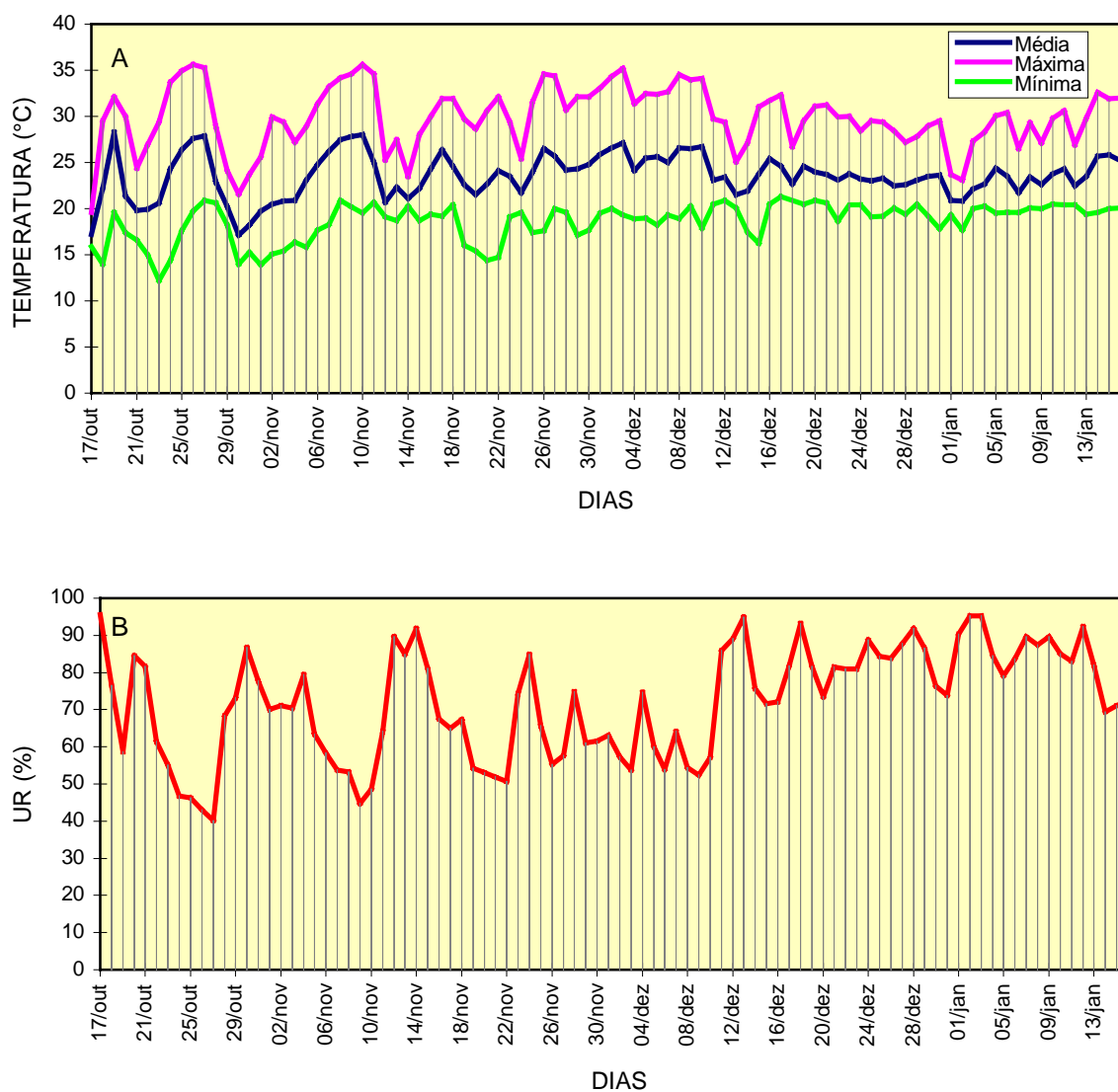


FIGURA 1 - Valores diários obtidos para temperatura ambiente (A) e umidade relativa do ar (B) no período experimental.

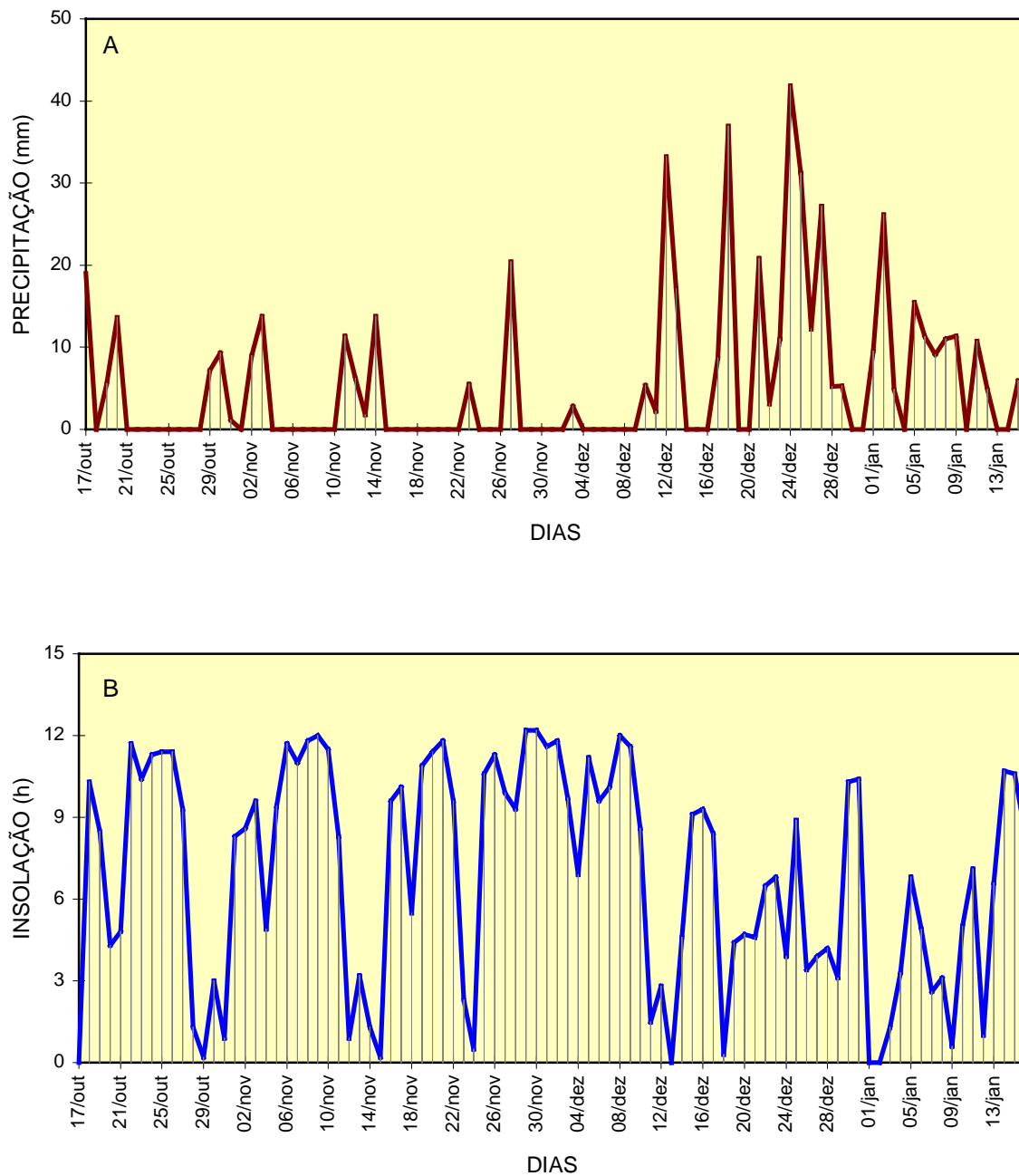


FIGURA 2 - Valores diários obtidos para precipitação pluviométrica (A) e insolação (B) no período experimental.

Quanto à temperatura da água dos tanques (Figuras 3 e 4), ocorreram variações entre os períodos da manhã e tarde, exceto nos dias nublados ou chuvosos. Pequenas diferenças

foram observadas entre os dois tanques, com valores pouco mais altos no tanque 2. Isto, provavelmente, foi decorrente do sombreamento sobre o tanque 1. As oscilações na temperatura da água praticamente acompanharam as encontradas na temperatura ambiente, com valores mais altos no período da tarde.

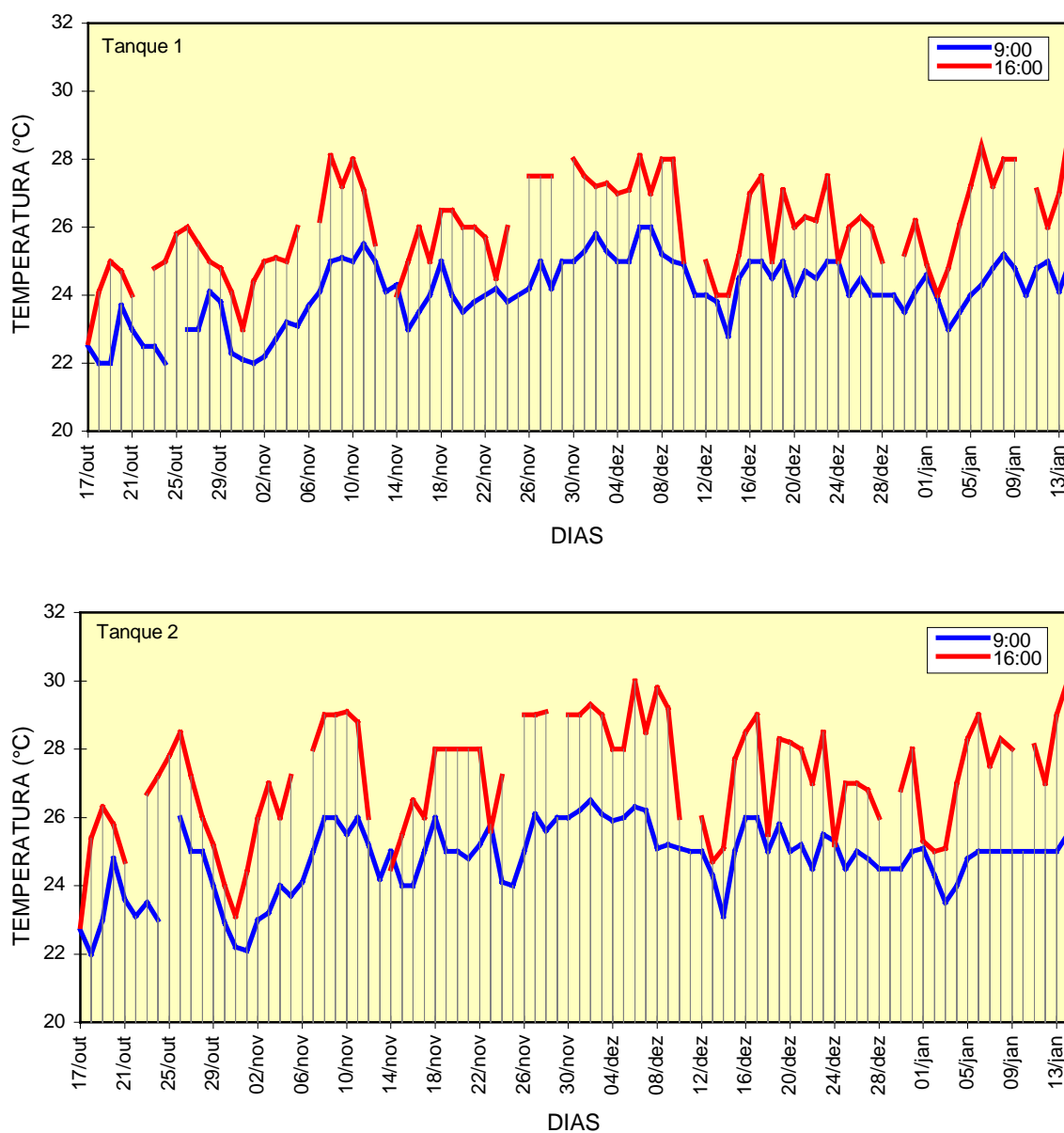


FIGURA 3 - Valores diários obtidos para temperatura da água do tanque 1 (controle) e do tanque 2 (experimental) no período de estudo.

5.2. DESENVOLVIMENTO DOS PEIXES

A análise estatística dos dados e as respostas obtidas para o desenvolvimento do pacu (Figura 4), durante o período experimental, encontram-se a seguir.



FIGURA 4 – Fotografia de um exemplar de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenil.

A análise de variância pelo teste F (Tabela 1) revelou que os dois fatores estudados (alimentação x períodos) tiveram efeitos significativos sobre as variáveis analisadas.

O estudo da interação para comparação das médias pelo teste de Tukey (Tabela 2) demonstrou que houve um crescimento maior dos animais do grupo controle ao longo dos períodos de amostragem. Este fato pôde ser estatisticamente comprovado quando analisados o peso corporal e comprimento padrão, onde os mesmos foram progressivamente maiores com o decorrer do tempo e os maiores valores (428,57 g e

22,60 cm, respectivamente) foram significativos ($P < 0,05$) em relação aos demais períodos. Quanto aos animais experimentais, tanto o peso corporal quanto o comprimento padrão mantiveram-se praticamente estáveis durante toda a fase de restrição alimentar (com uma tendência de diminuição aos 60 dias - P4) e início da realimentação. Entretanto, aos 30 dias de realimentação (P6) houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no crescimento, onde os animais alcançaram uma média de 353,57 g no peso corporal e 21,21 cm no comprimento padrão. As diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos estudados foram evidenciadas nos períodos P4, P5 e P6, para ambas as medidas.

TABELA 1 - Análise de variância para o desenvolvimento dos peixes.

Fontes de Variação	G.L.	Valores de F para as variáveis analisadas			
		Peso Corporal	Comprimento Padrão	IHS	IGVS
Efeito da Alimentação (A)	1	58,12**	41,06**	57,63**	19,85**
Efeito dos Períodos (P)	6	36,41**	26,97**	15,32**	3,28**
Interação A x P	6	10,67**	7,77**	20,00**	4,46**
Coeficiente de Variação (%)		12,98	4,22	13,89	18,20

** $P < 0,01$

TABELA 2 – Valores médios de peso corporal, comprimento padrão, índice hepato-somático (IHS) e índice gordura víscero-somático (IGVS) dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados ($n = 7$).

Variáveis	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)	
		0	2	7	30	60	7	30
Peso Corporal (g)	Controle	246,43 Ac	219,29 Ac	247,86 Ac	258,14 Ac	349,00 Ab	355,71 Ab	428,57 Aa
	Experimental	243,00 Ab	229,29 Ab	228,57 Ab	233,57 Ab	195,00 Bb	239,29 Bb	353,57 Ba
Comp. Padrão (cm)	Controle	19,00 Ac ⁽¹⁾	18,49 Ac	19,14 Ac	19,33 Ac	21,66 Aab	21,26 Ab	22,60 Aa
	Experimental	18,89 Ab	18,44 Ab	19,07 Ab	18,89 Ab	18,61 Bb	18,83 Bb	21,21 Ba
IHS (%)	Controle	1,25 Aabc	1,43 Aa	1,27 Aabc	1,41 Aa	1,36 Aab	1,07 Ac	1,11 Bbc
	Experimental	1,29 Aa	1,38 Aa	0,87 Bb	0,69 Bb	0,68 Bb	0,84 Bb	1,43 Aa
IGVS (%)	Controle	3,51 Aa	3,40 Aa	3,25 Aa	3,85 Aa	3,98 Aa	3,63 Aa	4,11 Aa
	Experimental	3,11 Aabc	3,29 Aab	3,63 Aa	3,78 Aa	2,59 Abc	2,16 Bc	3,27 Bab

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O índice hepato-somático (IHS) dos animais controles (Tabela 2) foi maior em P1 (1,43%), que diferiu significativamente ($P < 0,05$) de P5 e P6. Entretanto, nos animais experimentais, os maiores índices foram obtidos em P0, P1 e P6, diferindo significativamente ($P < 0,05$) dos demais períodos. Somente não se encontrou diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle e experimental nos períodos P0 e P1.

Os valores obtidos para o índice gordura víscero-somático (IGVS) dos animais controles (Tabela 2) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo dos períodos de amostragem. Nos experimentais, os menores índices foram encontrados aos 60 dias de restrição alimentar (P4) e início da realimentação (P5). Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos controle e experimental foram notadas somente nos períodos P5 e P6.

5.3. COMPOSIÇÃO CORPORAL

A análise de variância pelo teste F (Tabela 3) revelou que os dois fatores estudados (alimentação x períodos) tiveram efeitos significativos sobre quase todas as variáveis analisadas. Exceções a esse comportamento foram observadas quanto às porcentagens de proteína bruta e cinzas ou matéria mineral, contidas na carcaça dos peixes.

O estudo da interação para comparação das médias pelo teste de Tukey (Tabela 4) demonstrou que o teor de umidade na carcaça dos animais controles foi mais alta em P1 (69,05%) diferindo significativamente ($P < 0,05$) das encontradas em P5 e P6 (65,40 e 65,02%, respectivamente). Nos animais experimentais, o prolongamento do período de restrição alimentar resultou em aumento na porcentagem de água na carcaça. Aos 7 dias de

realimentação (P5), houve uma tendência de diminuição e, aos 30 dias (P6) seus valores foram restabelecidos. As diferenças entre os grupos ocorreram nos períodos P4, P5 e P6.

TABELA 3 - Análise de variância para a composição corporal dos peixes.

Fontes de Variação	G.L.	Valores de F para as variáveis analisadas			
		Umida- De	Proteína Bruta	Extrato Etéreo	Cinzas
Efeito da Alimentação (A)	1	31,38**	0,95 ^{NS}	26,81**	0,58 ^{NS}
Efeito dos Períodos (P)	6	3,43**	1,18 ^{NS}	3,24**	1,61 ^{NS}
Interação A x P	6	7,94**	1,36 ^{NS}	7,49**	1,28 ^{NS}
Coeficiente de Variação (%)		2,99	7,68	13,07	14,50

** P<0,01; ^{NS} Não significativo (P>0,05).

Para a porcentagem de lipídio ou extrato etéreo da carcaça dos animais controles (Tabela 4), não foram encontradas diferenças estatísticas (P>0,05) ao longo dos períodos de amostragem. Entretanto, nos experimentais, seus valores foram significativamente menores (P<0,05) aos 60 dias de restrição alimentar (P4). Diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos controle e experimental foram observadas nos períodos P4, P5 e P6.

TABELA 4 – Valores médios dos teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas da carcaça dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados (n = 7).

Variáveis	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)	
		0	2	7	30	60	7	30
Umidade (%)	Controle	67,77 Aab	69,05 Aa	67,88 Aab	68,07 Aab	65,77 Bab	65,40 Bb	65,02 Bb
	Experimental	67,60 Ac	67,86 Ac	68,25 Abc	70,01 Aabc	72,66 Aa	71,36 Aab	67,37 Ac
Extrato Etéreo (%)	Controle	16,50 Aa ⁽¹⁾	15,14 Aa	15,83 Aa	14,95 Aa	17,91 Aa	17,41 Aa	18,18 Aa
	Experimental	15,73 Aa	16,06 Aa	16,21 Aa	14,07 Aab	10,77 Bc	12,36 Bbc	15,89 Ba
Proteína Bruta (%)	Controle	14,22	14,29	14,61	15,48	14,71	15,32	15,18
	Experimental	15,03	14,35	13,96	14,23	14,96	14,53	15,20
Cinzas (%)	Controle	1,50	1,51	1,68	1,49	1,60	1,86	1,61
	Experimental	1,63	1,73	1,57	1,68	1,61	1,74	1,54

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Os dados obtidos para extrato etéreo, proteína bruta e cinzas foram calculados na base úmida.

Os resultados obtidos para as porcentagens de proteína bruta e cinzas (Tabela 4) tiveram um perfil semelhante, ou seja, não foram significativamente ($P>0,05$) afetados por qualquer efeito estudado (alimentação, períodos e interação).

5.4. VARIÁVEIS METABÓLICAS

A análise de variância pelo teste F (Tabela 5) revelou que os dois fatores estudados (alimentação x períodos) tiveram efeitos significativos sobre quase todas as variáveis metabólicas analisadas. Exceções, a esse comportamento, foram os efeitos da alimentação no glicogênio hepático e da interação na porcentagem de lipídio total do fígado e níveis de T_3 (triiodotironina).

TABELA 5 - Análise de variância para variáveis metabólicas dos peixes.

Fontes de Variação	G.L.	Valores de F para as variáveis analisadas					
		Glicogênio Hepático	Glicose Sangüínea	Proteína Plasmática	Lipídio Total do Fígado	Ácidos Gra Xos Livres	T_3
Efeito da Alimentação (A)	1	1,59 ^{NS}	5,41*	66,43**	17,36**	7,62**	38,19**
Efeito dos Períodos (P)	6	28,47**	6,25**	9,38**	2,74*	5,81**	29,85**
Interação A x P	6	15,19**	3,42**	5,67**	1,24 ^{NS}	3,39**	0,64 ^{NS}
Coeficiente de Variação (%)		24,68	18,84	11,34	23,96	16,66	27,68

** $P<0,01$; * $P<0,05$; ^{NS} Não significativo ($P>0,05$).

O estudo da interação para comparação das médias pelo teste de Tukey (Tabela 6) demonstrou que os valores de glicogênio hepático nos animais controles foram mais altos em P2 e significativamente diferente ($P < 0,05$) dos obtidos em P0, P3, P4 e P6. Entretanto, nos animais experimentais, os valores foram mais altos em P0 e P1 (5,90 e 7,01%, respectivamente), os quais diferiram significativamente ($P<0,05$) dos demais períodos.

Quando analisadas as médias dentro de cada período, entre os grupos estudados, observa-se que não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) em P3, P4 e P6, para este metabólito.

TABELA 6 – Valores médios dos níveis de glicogênio hepático, glicose sangüínea, proteína total plasmática, lipídio total do fígado, ácidos graxos livres plasmáticos e triiodotironina (T_3) dos peixes, no estudo dos fatores estudados ($n = 7$).

Variáveis	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)		Média
		0	2	7	30	60	7	30	
Glicogênio	Controle	4,18 Bb ⁽⁵⁾	4,25 Bab	5,71 Aa	3,14 Abc	3,45 Ab	4,23 Aab	1,83 Ac	
Hepático (%)	Experimental	5,90 Aa	7,01 Aa	2,75 Bb	2,72 Ab	2,75 Ab	2,36 Bb	1,60 Ab	
Glicose	Controle	80,55 Aab	89,78 Aa	78,53 Aab	68,90 Bab	63,84 Ab	63,16 Ab	65,42 Ab	
Sangüínea (mg/100 ml)	Experimental	66,65 Aabc	76,06 Aab	58,84 Bbc	84,82 Aa	71,79 Aabc	53,05 Ac	55,72 Abc	
Lipídio Total do Fígado (%)	Controle	6,59	5,23	5,50	5,39	5,31	4,19	5,80	5,43 A
	Experimental	4,38	5,11	4,94	4,45	3,81	3,70	4,65	4,43 B
	Média	5,48 a	5,17 ab	5,22 ab	4,92 ab	4,56 ab	3,95 b	5,23 ab	
Ácidos Graxos Livres ($\mu\text{mol/ml}$)	Controle	0,46 Aa	0,56 Aa	0,46 Ba	0,52 Ba	0,54 Ba	0,59 Aa	0,53 Aa	
	Experimental	0,43 Ac	0,50 Abc	0,58 Aabc	0,64 Aab	0,72 Aa	0,60 Aab	0,55 Abc	
Proteína Plasmática (mg/ml)	Controle	4,18 Ab	4,65 Ab	4,23 Ab	6,17 Aa	4,29 Ab	4,77 Ab	4,35 Ab	
	Experimental	3,73 Aa	3,90 Ba	3,74 Aa	4,01 Ba	3,84 Aa	4,01 Ba	3,85 Aa	
T_3 (ng/ml)	Controle	1,11	1,49	1,81	1,34	2,36	1,86	3,17	1,87 A
	Experimental	0,74	0,77	1,12	0,86	1,54	1,56	2,55	1,31 B
	Média	0,93 d	1,13 cd	1,47 bc	1,10 cd	1,95 b	1,71 b	2,86 a	

⁽⁵⁾ Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Os níveis de glicose sangüínea (Tabela 6) nos animais controles foram maiores nos quatro primeiros períodos, mas as diferenças significativas ($P<0,05$) ocorreram quando os valores obtidos em P1 foram comparados aos de P4, P5 e P6. Nos animais experimentais, o nível mais alto foi detectado em P3, o qual diferiu significativamente ($P<0,05$) dos encontrados em P2, P5 e P6. As diferenças entre os grupos ocorreram ($P<0,05$) somente nos períodos P2 e P3.

Para a proteína total plasmática (Tabela 6), o maior valor para os animais controles foi obtido em P3 (6,17 mg/ml), o qual diferiu significativamente ($P<0,05$) dos demais períodos. Entretanto, nos animais experimentais não foram notadas diferenças significativas ($P>0,05$) ao longo dos períodos de amostragem, apesar dos valores tenderem a aumentar em P3 e P5. Diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos foram observadas nos períodos P1, P3 e P5.

Como a interação entre os efeitos da alimentação e dos períodos (Tabela 5) foi não significativa ($P>0,05$) para a porcentagem de lipídio total do fígado, os resultados mostraram que houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos estudados (Tabela 6), sendo os menores valores encontrados nos animais experimentais (4,43%). Os períodos de amostragem também afetaram significativamente ($P<0,05$) a porcentagem de lipídio e o maior valor foi obtido em P0 (5,48%), o qual diferiu significativamente ($P<0,05$) somente de P5 (3,95%).

Nos animais controles, os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos (Tabela 6) não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) ao longo dos períodos de amostragem. Nos experimentais, seus valores foram mais altos em P4 (0,72 $\mu\text{mol/ml}$), os quais diferiram significativamente ($P<0,05$) de P0, P1 e P6. Entre os grupos estudados foram observadas diferenças estatísticas ($P<0,05$) somente nos períodos P2, P3 e P4.

Pode-se observar, pela Tabela 5, que não houve efeito significativo ($P>0,05$) da interação entre os fatores alimentação e períodos para os níveis de triiodotironina (T_3). Entretanto, seus valores foram significativamente diferentes ($P<0,05$) entre os grupos controle e experimental (1,87 e 1,31 ng/ml, respectivamente), conforme apresentado na Tabela 6. Houve também, efeito significativo ($P<0,05$) dos períodos de amostragem sobre os níveis desse hormônio, sendo os valores mais altos encontrados em P6 (2,86 ng/ml), os quais diferiram estatisticamente dos demais períodos.

5.5. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS HEPATÓCITOS

Através da análise morfológica do fígado do pacu (Figura 5 A) foi observada a presença de três lobos, revestidos por uma camada delgada de tecido conjuntivo. Os hepatócitos estavam dispostos em cordões intercalados por capilares sinusóides, que convergiam para uma veia hepática terminal; não formavam lóbulos; eram poligonais, com um ou dois núcleos centrais, nucléolo evidente e apresentavam ductos biliares. Além disso, foi encontrado um tecido pancreático exócrino (pâncreas intra-hepático) (Figura 5 B), envolvido por uma camada de tecido conjuntivo, separado das células hepáticas por sinusóides, contendo vasos sangüíneos, tanto no interior quanto periferia. Foi, também, evidenciada quantidade considerável de pigmentos de cor castanho (Figura 5 C) e de glicogênio.

Após 30 dias de restrição alimentar verificou-se uma atrofia do fígado, com diminuição da área e volume do citoplasma e núcleo dos hepatócitos, uma desorganização dos cordões de células hepáticas, estreitamento dos capilares sinusóides e acúmulo de pigmentos castanhos.

Após a realimentação, as alterações estruturais provocadas pela restrição alimentar foram revertidas.

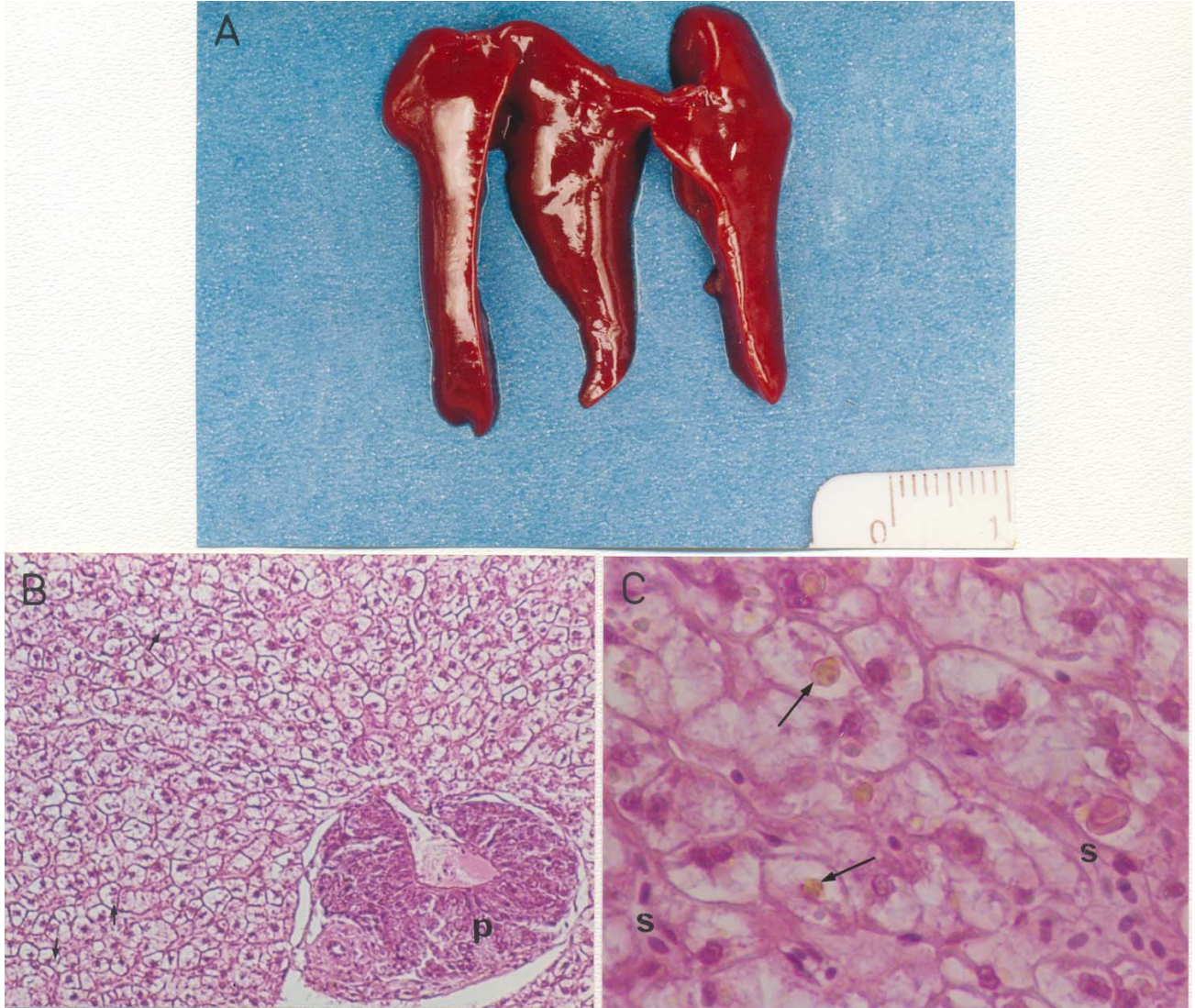


FIGURA 5 – **A** – Fotografia do fígado do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenil.
B – Fotomicrografia do fígado do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), mostrando o pâncreas intra-hepático (**p**). Coloração: HE. Objetiva: 10x.
C - Fotomicrografia do fígado do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), indicando a presença de pigmentos castanhos (→) no interior dos hepatócitos e capilares sinusóides (**s**). Coloração: HE. Objetiva: 40x.

Na Figura 6, observam-se cortes do tecido hepático do pacu, nas diferentes condições experimentais.

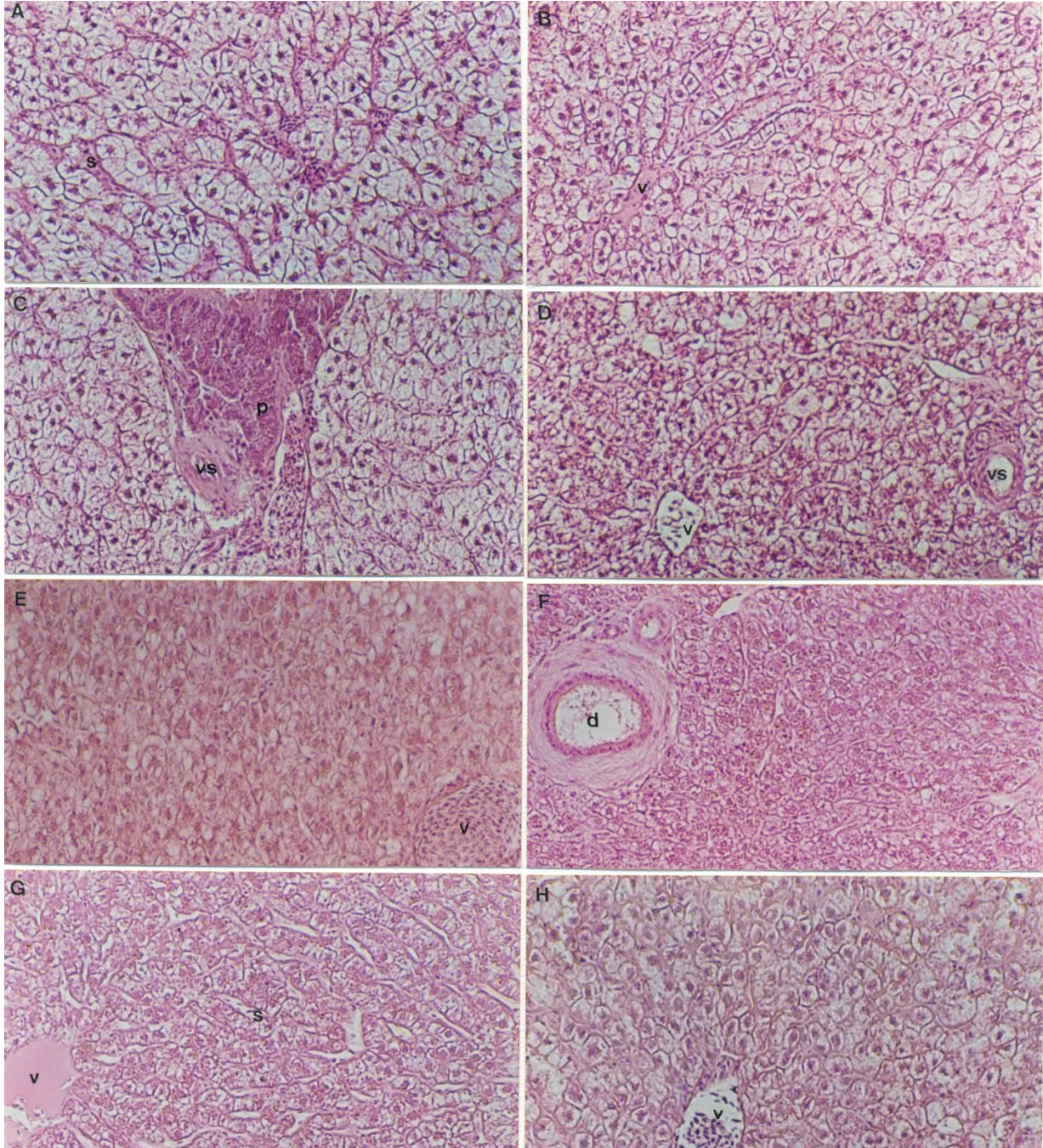


FIGURA 6 – Fotomicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Coloração: HE. Objetiva: 10x.

s – capilares sinusóides; **d** – ducto biliar; **p** – pâncreas intra-hepático; **v** – veia hepática terminal; **vs** – vaso sangüíneo.

Quanto à morfometria dos hepatócitos, a análise de variância pelo teste F (Tabela 7) revelou que os dois fatores estudados (alimentação x períodos) tiveram efeitos significativos sobre as medidas avaliadas.

O estudo da interação para comparação de médias pelo teste de Tukey (Tabela 8) demonstrou que, nos animais controles, o maior valor obtido para área do citoplasma foi em P2, o qual diferiu significativamente ($P < 0,05$) de P0, P5 e P6. Entretanto, nos animais experimentais, seus valores foram menores nos períodos P3, P4 e P5, diferindo significativamente ($P < 0,05$) dos demais períodos. Não foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) entre os dois grupos estudados nos períodos P0, P1, e P6.

TABELA 7 - Análise de variância para a morfometria dos hepatócitos dos peixes.

Fontes de Variação	G.L.	Valores de F para as variáveis analisadas			
		Área do Citoplasma	Área do Núcleo	Volume do Citoplasma	Volume do Núcleo
Efeito da Alimentação (A)	1	44,51**	23,25**	45,47**	17,70**
Efeito dos Períodos (P)	6	18,36**	14,54**	12,73**	14,69**
Interação A x P	6	12,84**	3,08**	11,72**	2,57*
Coeficiente de Variação (%)		11,40	8,62	12,36	8,74

** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

Os valores obtidos para área do núcleo (Tabela 8) foram maiores nos quatro primeiros períodos, mas somente P1 diferiu significativamente ($P < 0,05$) de P4, P5 e P6 nos animais controles. Nos experimentais, P0 e P1 diferiram ($P < 0,05$) de P3, P4 e P5, nos quais foram encontrados os menores valores. Entre os grupos controle e experimental não foram notadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos períodos P0, P5, e P6.

O volume do citoplasma dos hepatócitos dos animais controles (Tabela 8) foi maior em P2 ($17,95 \mu\text{m}^3$) e significativamente diferente ($P < 0,05$) de P5 e P6. Entretanto, nos experimentais, os maiores valores foram encontrados nos três primeiros e último períodos, os

quais diferiram significativamente ($P < 0,05$) de P3, P4 e P5. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os dois grupos em P0, P1, e P6.

TABELA 8 – Valores médios da área do citoplasma, área do núcleo, volume do citoplasma e volume do núcleo dos hepatócitos dos peixes, no estudo da interação entre os fatores estudados ($n = 7$).

Variáveis	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)	
		0	2	7	30	60	7	30
Área do Cito-	Controle	133,78 Ab	158,56	165,11 Aa	152,11 Aab	140,21 Aab	137,51 Ab	137,39 Ab
		Aab						
plasma (μm^2)	Experimental	146,71 Aa	159,73 Aa	143,09 Ba	96,38 Bbc	76,70 Bc	114,39 Bb	141,42 Aa
Área do	Controle	12,50 Aab	13,63 Aa	12,17 Aab	12,32 Aab	11,77 Abc	10,35 Ac	11,14 Abc
Núcleo (μm^2)	Experimental	12,31 Aa	12,35 Ba	10,86 Babc	10,67 Bbc	9,64 Bc	9,52 Ac	11,76 Aab
Volume do Cí-	Controle	14,51 Ab ⁽¹⁾	17,31 Aab	17,95 Aa	16,87 Aab	16,01 Aab	14,93 Ab	14,73 Ab
toplasma (μm^2)	Experimental	15,69 Aa	17,25 Aa	15,25 Bab	10,52 Bcd	8,62 Bd	12,35 Bbc	15,20 Aab
Volume do	Controle	1,34 Ab	1,53 Aa	1,36 Aab	1,36 Aab	1,30 Abc	1,16 Ac	1,21 Abc
Núcleo (μm^3)	Experimental	1,34 Aab	1,40 Ba	1,22 Babc	1,22 Bbc	1,09 Bc	1,04 Ac	1,27 Aab

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O volume do núcleo (Tabela 8) também se alterou ao longo dos períodos de amostragem, tanto nos animais controles quanto nos experimentais. Nos controles, o maior valor foi encontrado em P1 ($1,53 \mu\text{m}^3$), o qual diferiu significativamente de P0, P4, P5 e P6. O valor mais alto encontrado nos animais experimentais também ocorreu em P1 ($1,40 \mu\text{m}^3$), o qual diferiu ($P < 0,05$) de P3, P4 e P5. As diferenças estatísticas ($P < 0,05$) encontradas entre os grupos controle e experimental foram evidenciadas nos períodos P1, P2, P3 e P4.

5.6. ULTRAESTRUTURA DO GLICOGÊNIO

A Figura 7 mostra a qualidade da marcação do glicogênio, através da técnica de ósmio redução comparada à metodologia tradicional (apenas com tetróxido de ósmio), potencializando o efeito de observação dessas partículas nos hepatócitos.

Os resultados obtidos através da ultraestrutura dos hepatócitos revelaram que as células do fígado do pacu contêm rosetas de glicogênio dispersas em seu interior. Foi encontrada uma concentração maior de glicogênio no citoplasma dessas células, nos animais amostrados no dia 0, tanto do grupo controle (Figura 8 A) quanto do experimental (Figura 8 B). Aos 2 dias de restrição alimentar (Figura 8 C), ainda foi observada uma grande quantidade de glicogênio no interior das células. Entretanto, à medida que se estendeu o período de restrição alimentar, registrou-se um menor acúmulo dessas partículas no citoplasma celular (Figuras 8 D, 9 E e 9 F). A concentração de glicogênio, após a realimentação de 7 dias (Figura 9 G), seguida de um período de 60 dias de restrição alimentar, permaneceu baixa mas, aos 30 dias de realimentação (Figura 9 H), essa quantidade de partículas de glicogênio dispersa no interior dos hepatócitos foi ainda menor, confirmando os resultados obtidos na análise bioquímica.

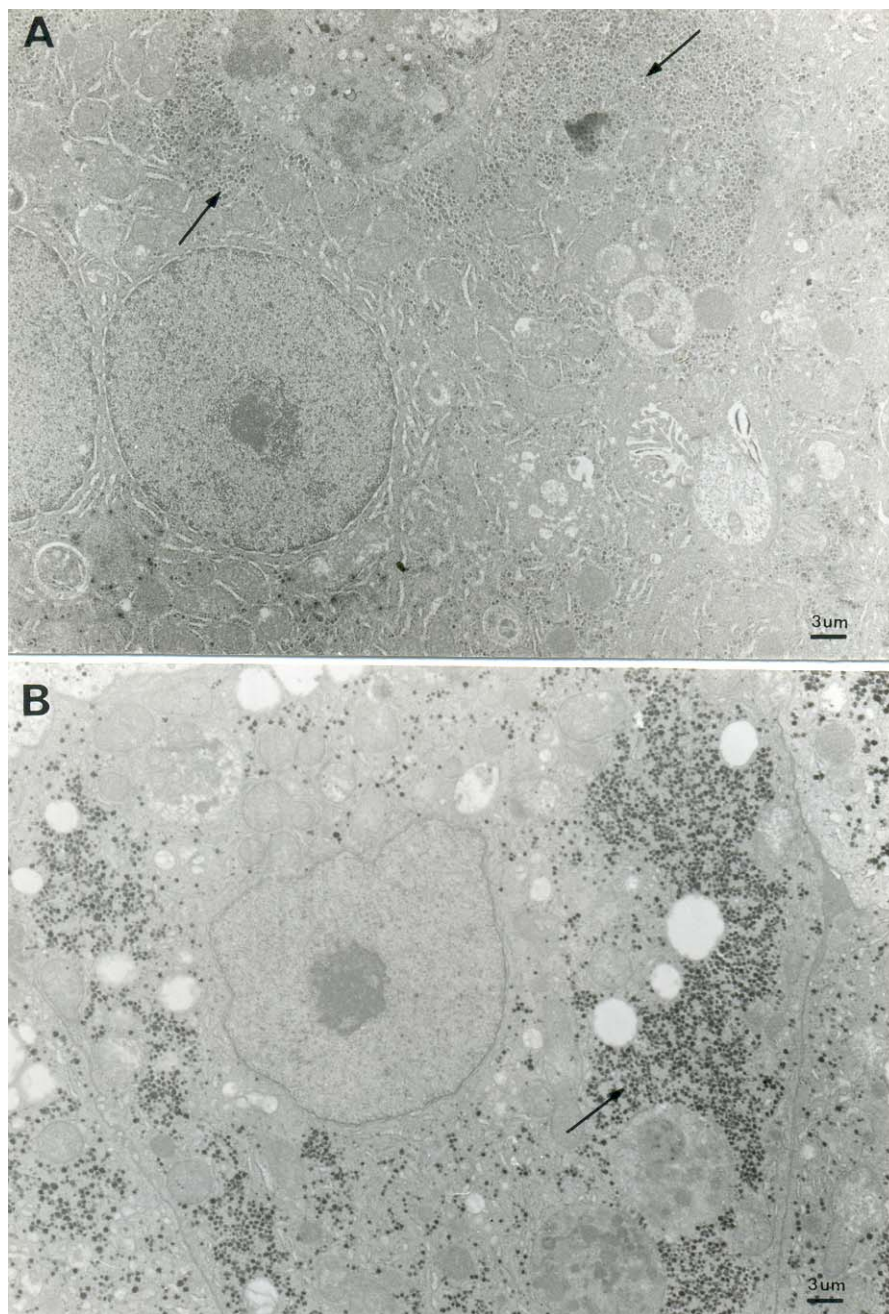


FIGURA 7 - Foeletronmicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Utilização do processo rotineiro para microscopia eletrônica (A) e da técnica de ósmio redução (B) na marcação de glicogênio. → = glicogênio.

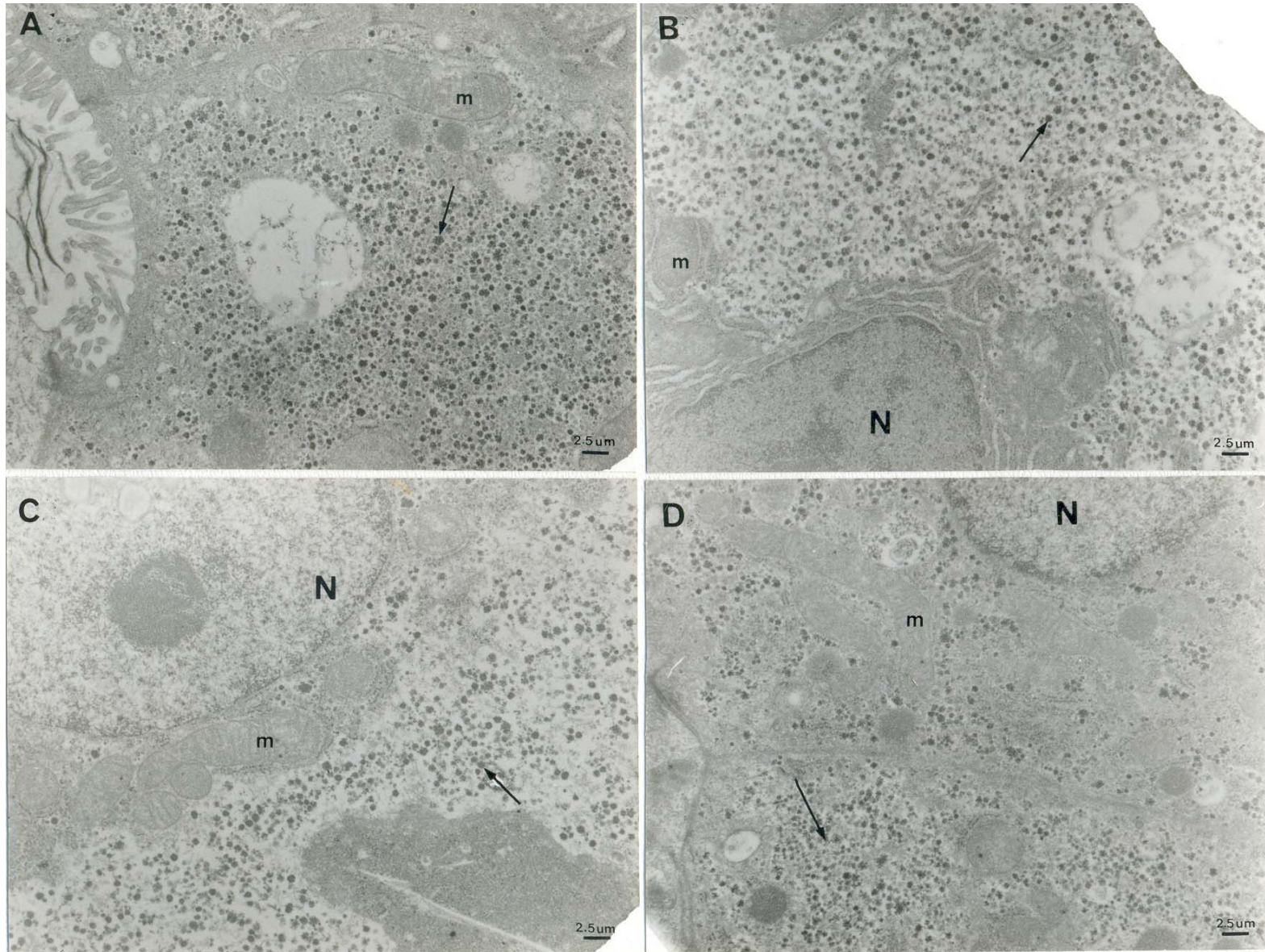


FIGURA 8 - Fotoeletronicografias de hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), processados pela técnica de ósmio redução, no dia zero (**A** - controle e **B** - experimental), 2 dias de restrição alimentar (**C**) e 7 dias de restrição alimentar (**D**). **N** = núcleo; **m** = mitocôndria; **→** = glicogênio.

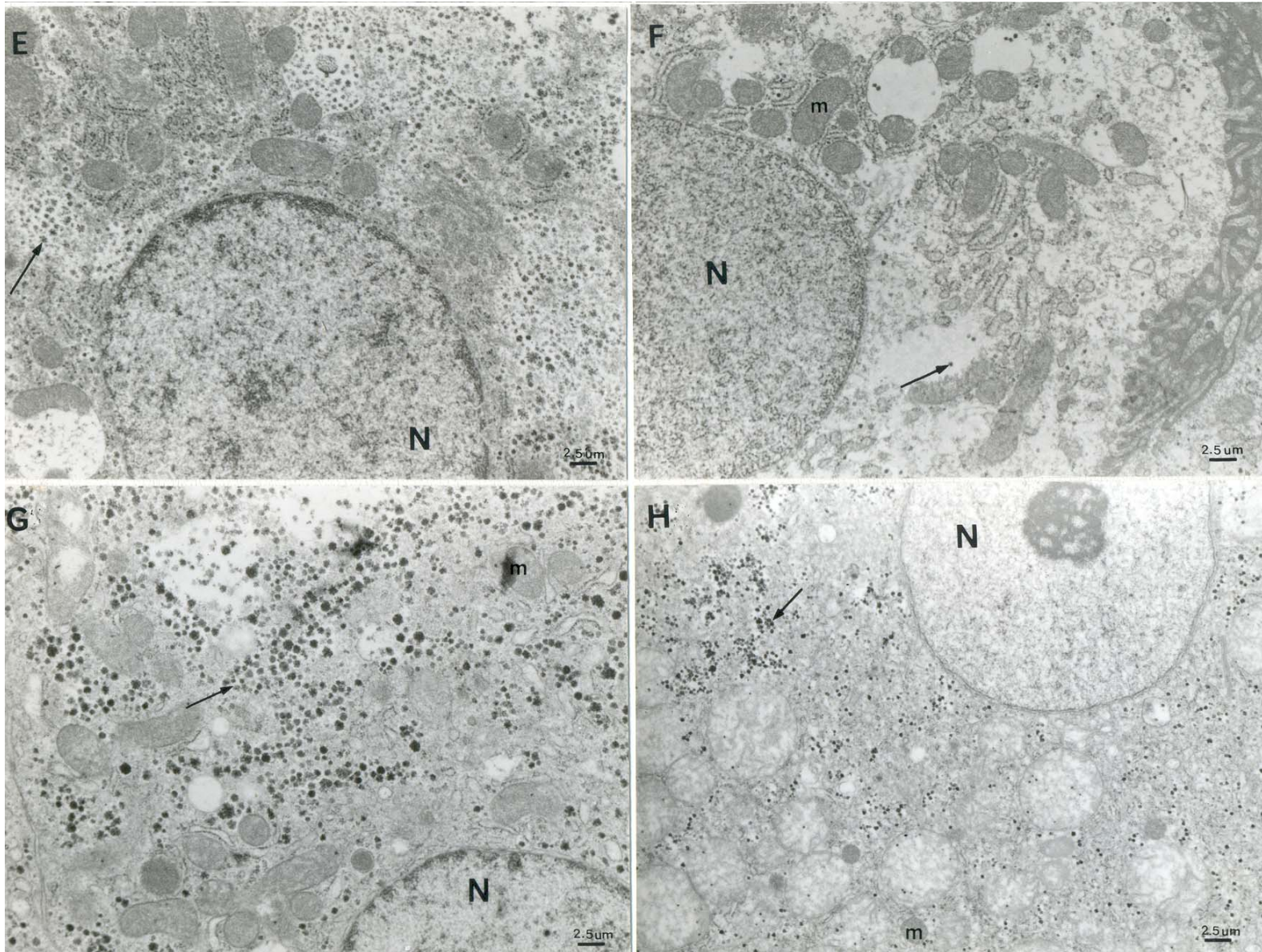


FIGURA 9 - Fotoeletronmicrografias de hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), processados pela técnica de ósmio redução, aos 30 dias de restrição alimentar (E), 60 dias de restrição alimentar (F), 7 dias de realimentação (G) e 30 dias de realimentação (H). N = núcleo; m = mitocôndria; → = glicogênio

5.7. HISTOQUÍMICA DO GLICOGÊNIO

Os resultados obtidos para a reação de PAS no fígado do pacu estão resumidos na Tabela 9 e são descritos a seguir.

TABELA 9 – Intensidade da reação de PAS em hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (n = 4).

Reação	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)	
		0	2	7	30	60	7	30
PAS	Controle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	Experimental	++++	++++	+++	+++	++	++	+

(-) Reação negativa; (+) Reação fraca; (++) Reação moderada; (+++) Reação forte; (++++) Reação intensa.

Glicogênio: A observação do tecido hepático dos animais controles mostrou que os hepatócitos continham grandes quantidades de glicogênio, PAS-positivos, de forte intensidade (Figura 10), que sofreram digestão total pela α -amilase, em quase todos os períodos amostrados, exceto aos 90 dias do início do experimento, onde foi observada uma reação fraca. No grupo experimental, a reação do PAS foi intensa aos 0 e 2 dias de restrição alimentar, forte aos 7 e 30 dias, moderada aos 60 dias de restrição alimentar e 7 de realimentação e fraca aos 30 dias da mesma fase experimental.

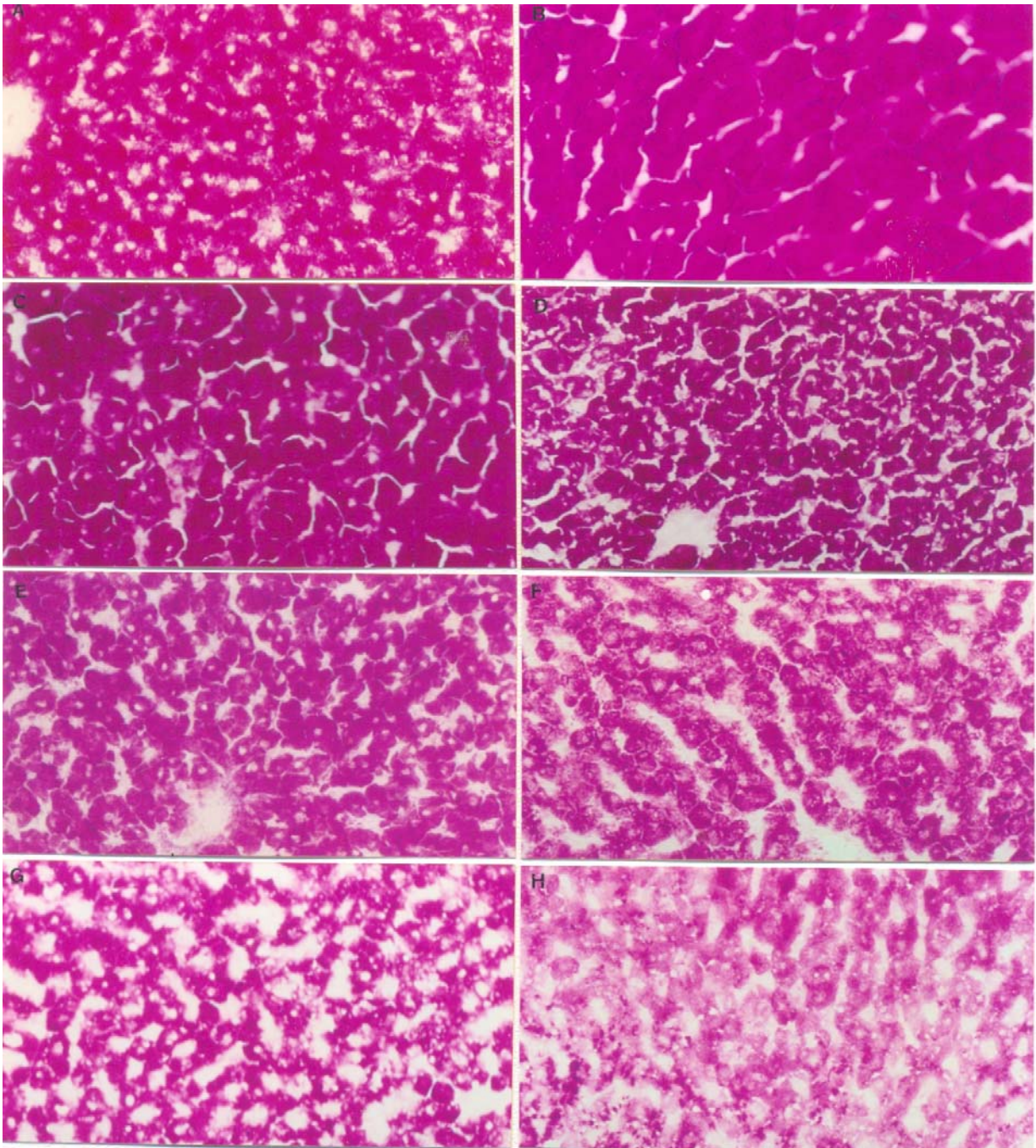


FIGURA 10 – Fotomicrografia da histoquímica do glicogênio (PAS) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

5.8. HISTOENZIMOLOGIA DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

Os resultados de atividade enzimática no fígado do pacu estão resumidos na Tabela 10 e são descritos a seguir.

TABELA 10 - Atividade enzimática em hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (n = 4).

Enzimas	Grupos	Restrição Alimentar (dias)					Realimentação (dias)	
		0	2	7	30	60	7	30
PFK	Controle	++	++	+	++	++	++	++
	Experimental	+	+	+	++	++	+++	+++
PGM	Controle	++	++	+	++	++	++	++
	Experimental	+	++	++	+	-	+++	++
G6P-A	Controle	+++	++	+++	+++	++	++	++
	Experimental	++	+++	++++	+++	++++	+++	++
G6P-D	Controle	++	++	++	+++	++	++	++
	Experimental	++	+	++	+	+	+++	++
6PG-D	Controle	++	+	++	++	+	++	++
	Experimental	++	++	++	+	+	++	++
L-D	Controle	+	+	+	-	+	+	-
	Experimental	+	+	+	-	-	+	-
NADH₂-TR	Controle	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
	Experimental	+++	+++	+++	++	++	+++	++
NADPH₂-TR	Controle	++	++	++	++	++	++	++
	Experimental	++	++	++	+	++	++	++
S-D	Controle	-	-	-	-	+	-	-
	Experimental	-	-	-	-	-	+	+

(-) Reação negativa; (+) Reação fraca; (++) Reação moderada; (+++) Reação forte; (++++) Reação intensa.

PFK: Nos controles houve uma reação moderada para a fosfofrutoquinase (Figura 11) durante os 2 primeiros dias de experimento e a partir dos 30 dias. Aos 7 dias foi observada

uma diminuição na atividade dessa enzima, tornando-se uma reação de fraca intensidade. Nos experimentais, a intensidade dessa reação foi fraca até os 7 dias de restrição alimentar, passando a moderada dos 30 aos 60 dias de restrição alimentar e forte dos 7 aos 30 dias de realimentação.

PGM: Houve uma intensidade moderada na reação para a fosfoglucomutase (Figura 12) em quase todos os períodos de amostragem no grupo controle, exceto aos 7 dias, onde a reação foi fraca. Nos animais experimentais, a reação para esta enzima foi fraca na restrição alimentar de 0 e 30 dias, negativa aos 60 dias, forte aos 7 dias de realimentação e moderada nos outros períodos.

G6P-A: A reação para a glicose-6-fosfatase (Figura 13) foi de forte intensidade aos 0, 7 e 30 dias de experimento e moderada nos outros períodos, para o grupo controle. No experimental, houve uma intensidade moderada no dia 0, forte na restrição alimentar de 2 dias e intensa dos 7 aos 60 dias. Durante a realimentação, a intensidade dessa reação foi forte aos 7 dias e moderada aos 30 dias.

G6P-D: Nos peixes controles foi observada uma forte intensidade da reação para a glicose-6-fosfato desidrogenase (Figura 14), aos 60 dias de início do experimento, e uma reação moderada nos outros períodos de amostragem. No grupo experimental, essa intensidade foi fraca na restrição alimentar de 2, 30 e 60 dias, moderada no dia 0 e 7, intensa na realimentação de 7 dias e moderada aos 30 dias.

6PG-D: A intensidade da reação para a 6-fosfogluconato desidrogenase (Figura 15), nos animais controles, foi fraca aos 2 e 60 dias de experimento e moderada nos outros períodos de amostragem. Nos experimentais, a reação foi moderada na restrição alimentar de 0, 2, e 7 dias e fraca aos 30 e 60 dias. Durante a realimentação de 7 e 30 dias, a intensidade dessa reação foi moderada.

L-D: Houve uma fraca intensidade de reação para a lactato desidrogenase (Figura 16) em quase todos os períodos de amostragem do grupo controle, exceto aos 30 e 90 dias de experimento, onde foram notadas reações negativas. No experimental, houve uma reação fraca aos 0, 2 e 7 dias de restrição alimentar e 7 dias de realimentação. Nos outros períodos a reação foi negativa para esta enzima.

NADH₂-TR: Nos peixes controles, a reação para a nicotinamida adenina dinucleotídeo – tetrazólio redutase (Figura 17) foi positiva e forte aos 0, 2, 7, 30 e 67 dias de experimento e moderada nos outros períodos. Entretanto, no grupo experimental, a intensidade dessa reação foi forte nos dias 0, 2 e 7 de restrição alimentar e 7 de realimentação. Nos outros períodos de amostragem foi observada uma intensidade moderada para essa reação.

NADPH₂-TR: A reação para a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – tetrazólio redutase (Figura 18) apresentou uma moderada atividade em todos os períodos de amostragem do grupo controle. No experimental, esse mesmo padrão de resposta foi mantido para quase todos os períodos, exceto aos 30 dias de restrição alimentar, onde a reação foi fraca.

S-D: Não houve reação positiva para a succinato desidrogenase (Figura 19), em quase todas as amostragens do grupo controle, exceto aos 60 dias de início do experimento, onde foi observada uma fraca intensidade para essa reação. No experimental, a reação foi negativa em todos os períodos.

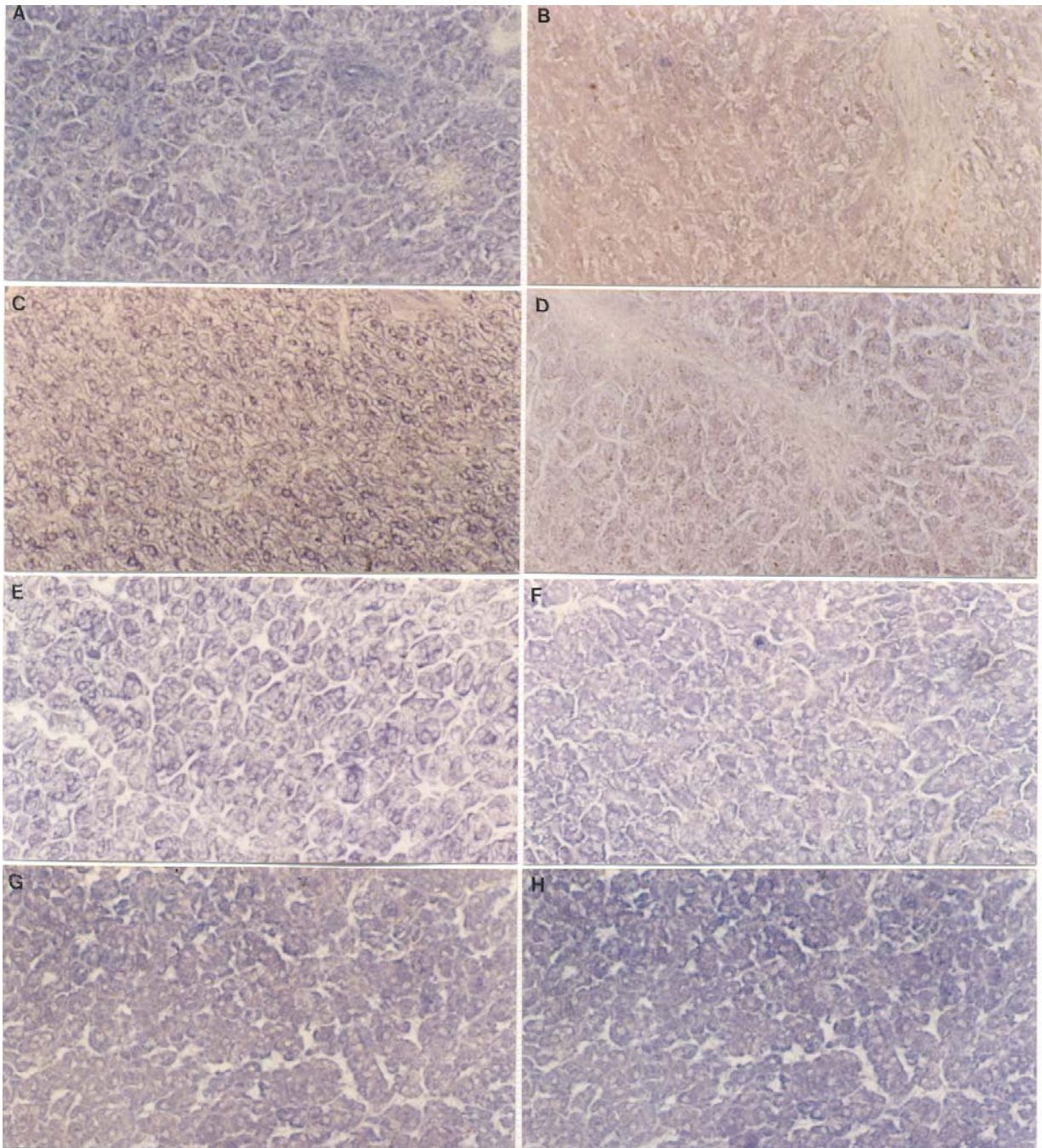


FIGURA 11 – Fotomicrografia da histoquímica da fosfofrutoquinase (PFK) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

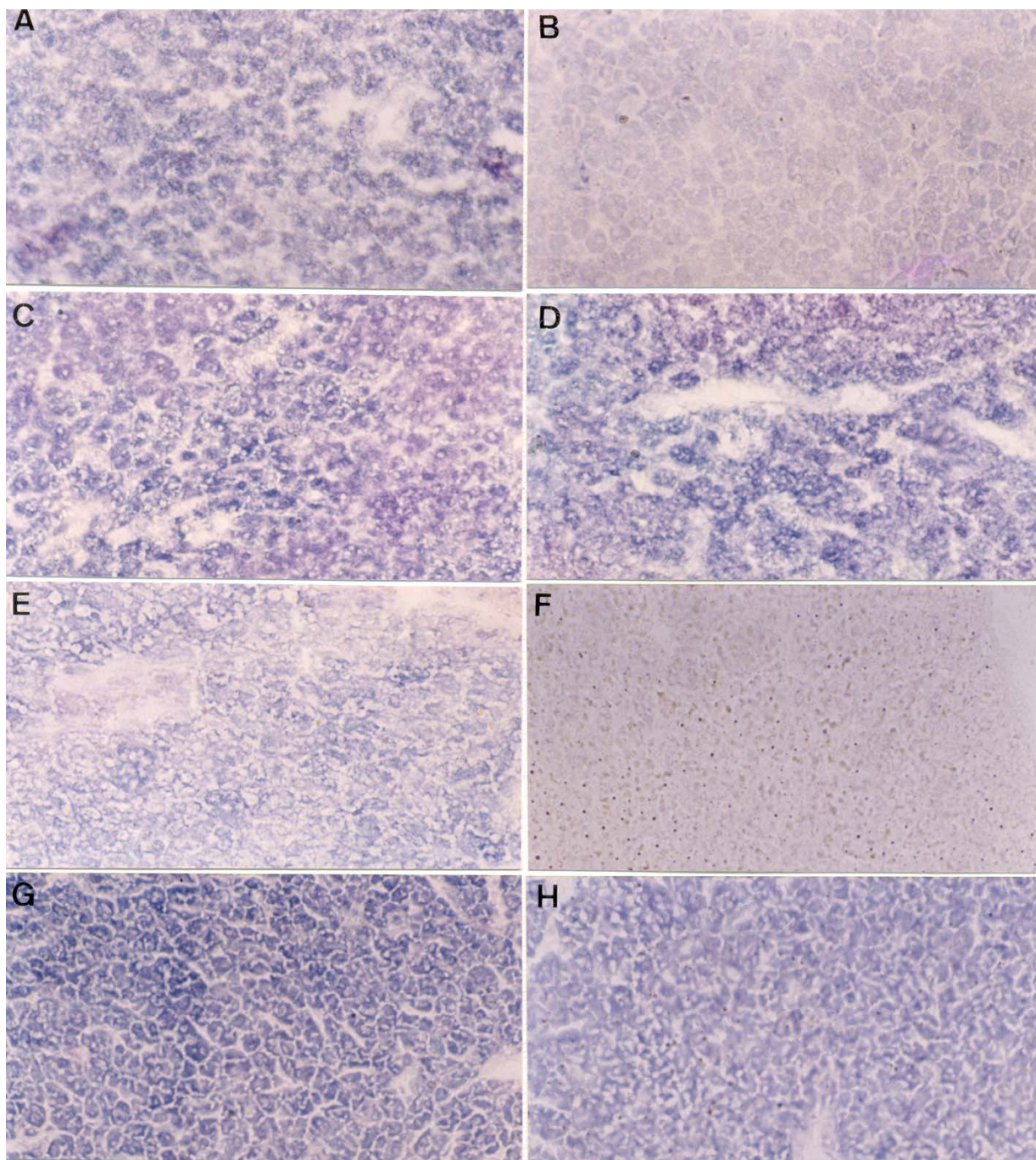


FIGURA 12 – Fotomicrografia da histoquímica da fosfoglicomutase (PGM) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

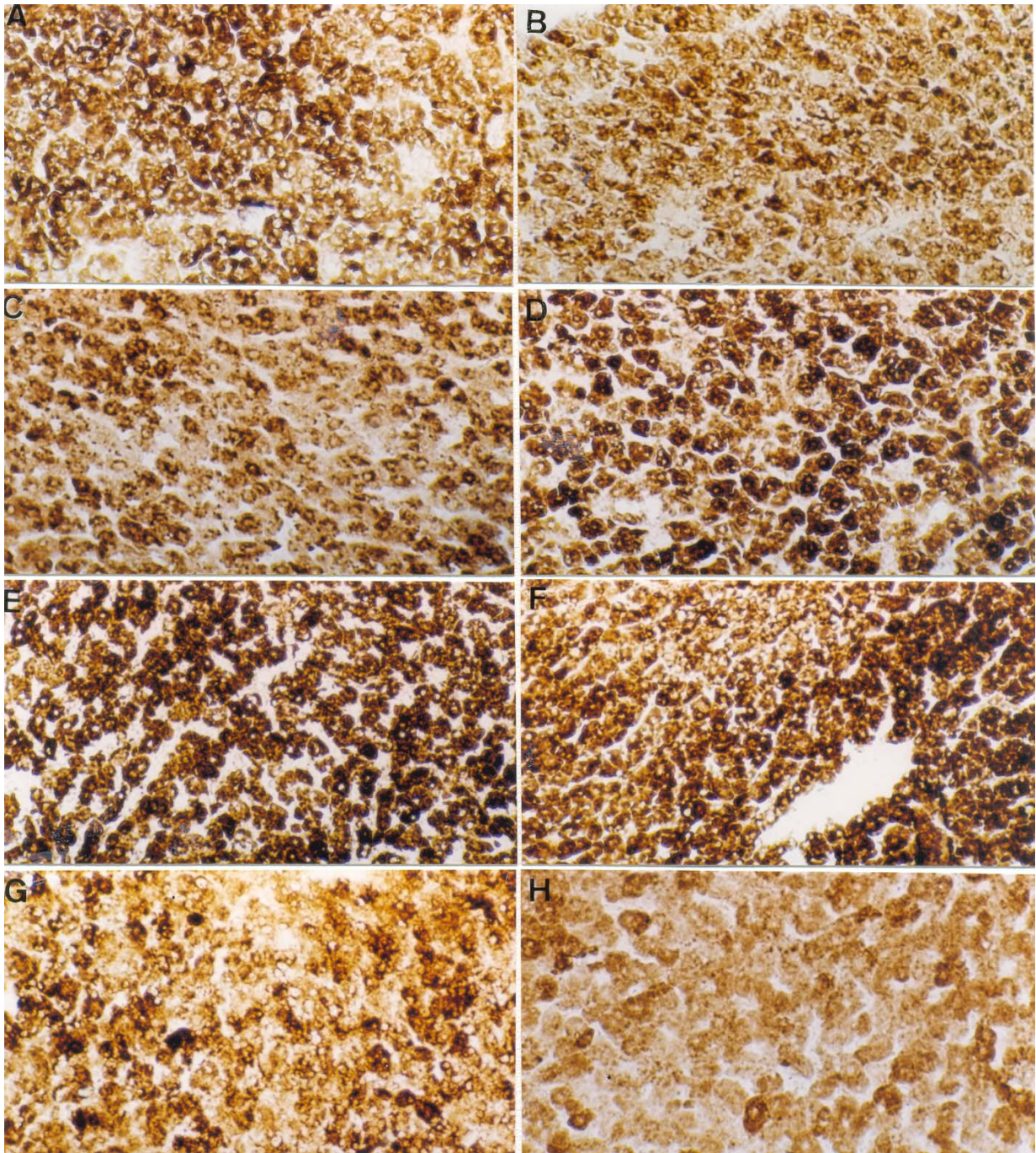


FIGURA 13 – Fotomicrografia da histoquímica da glicose-6-fosfatase (G6P-A) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

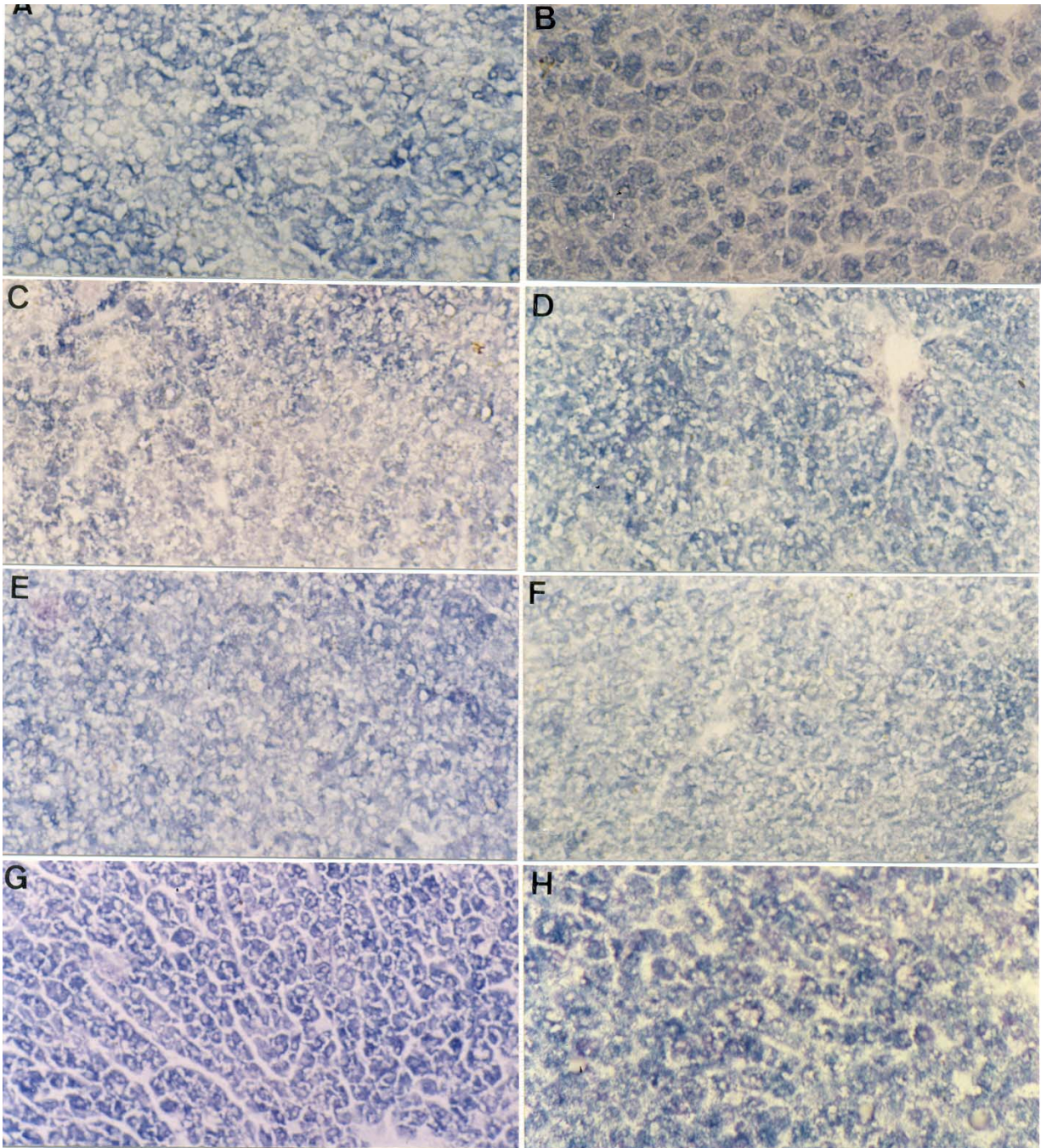


FIGURA 14 – Fotomicrografia da histoquímica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

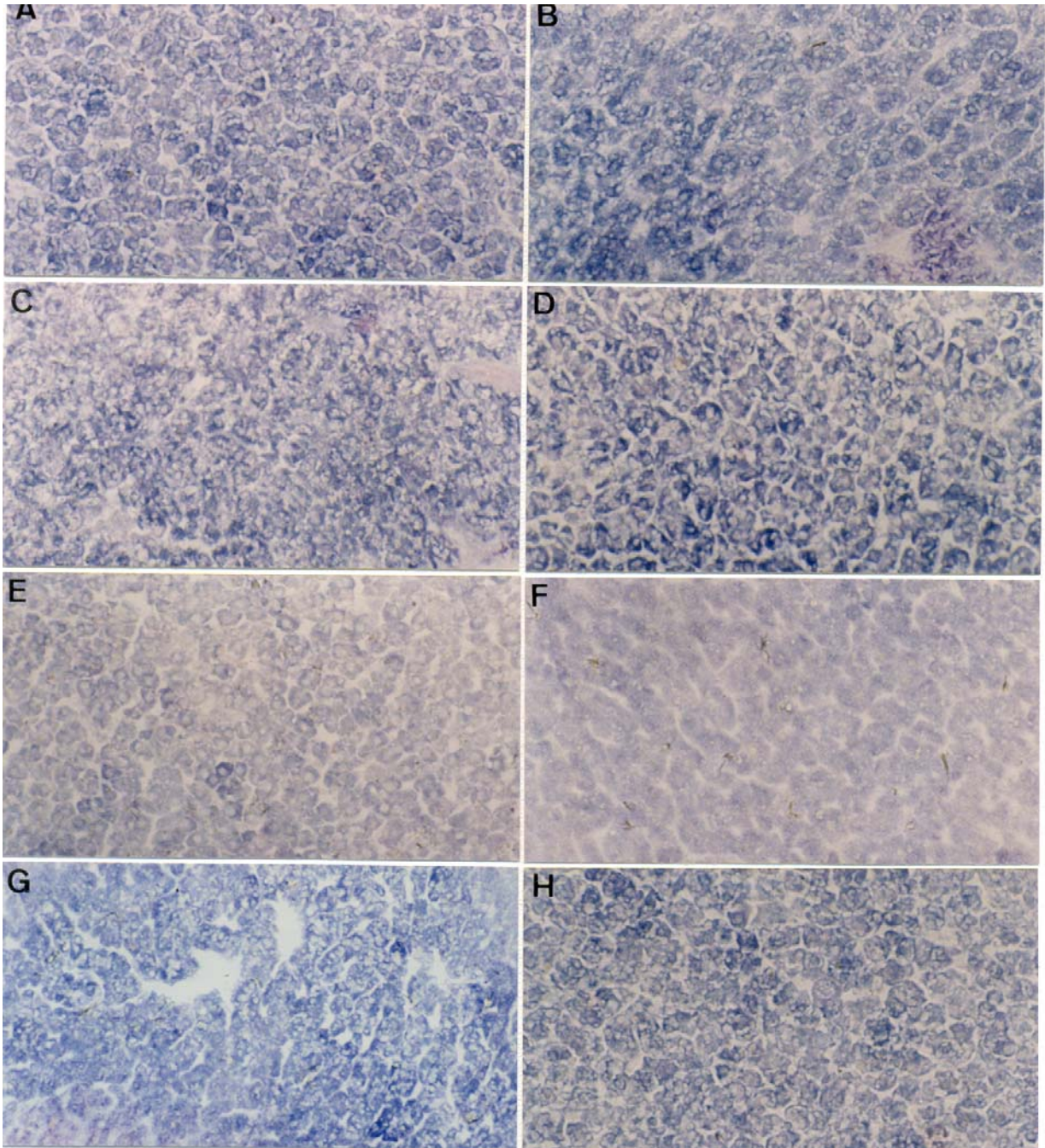


FIGURA 15 – Fotomicrografia da histoquímica da 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

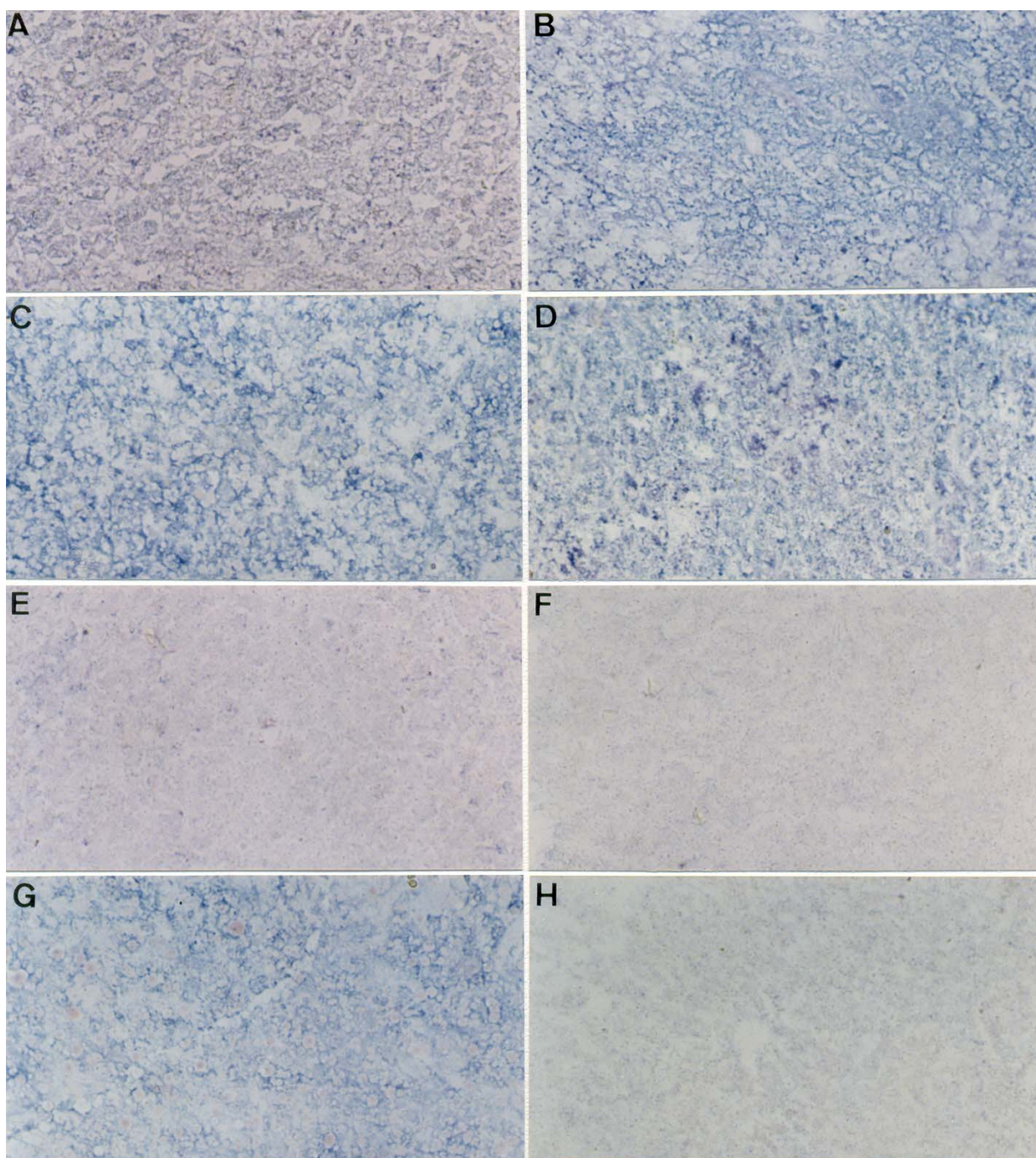


FIGURA 16 – Fotomicrografia da histoquímica da lactato desidrogenase (L-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

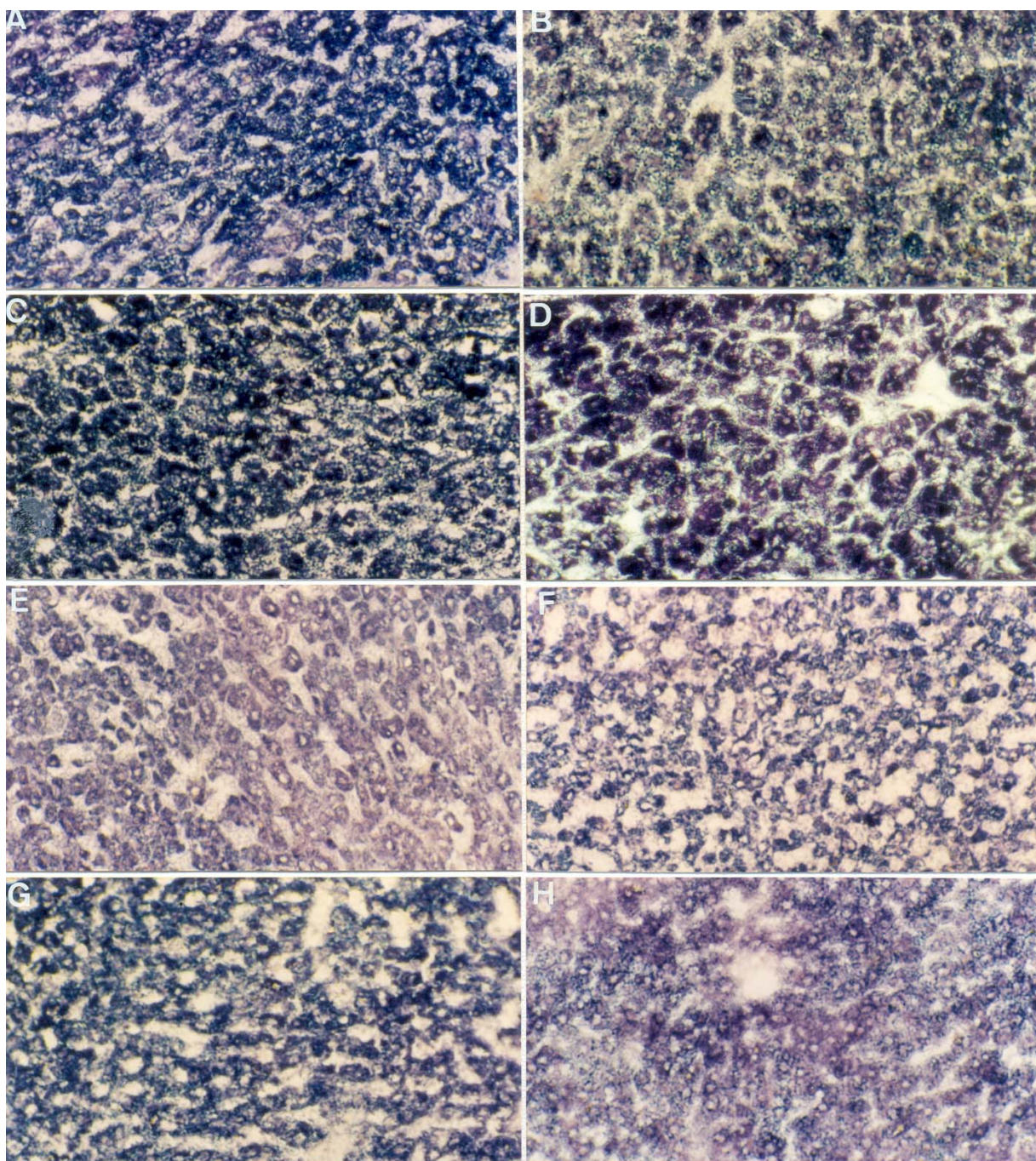


FIGURA 17 – Fotomicrografia da histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo – tetrazólio redutase (NADH₂-TR) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

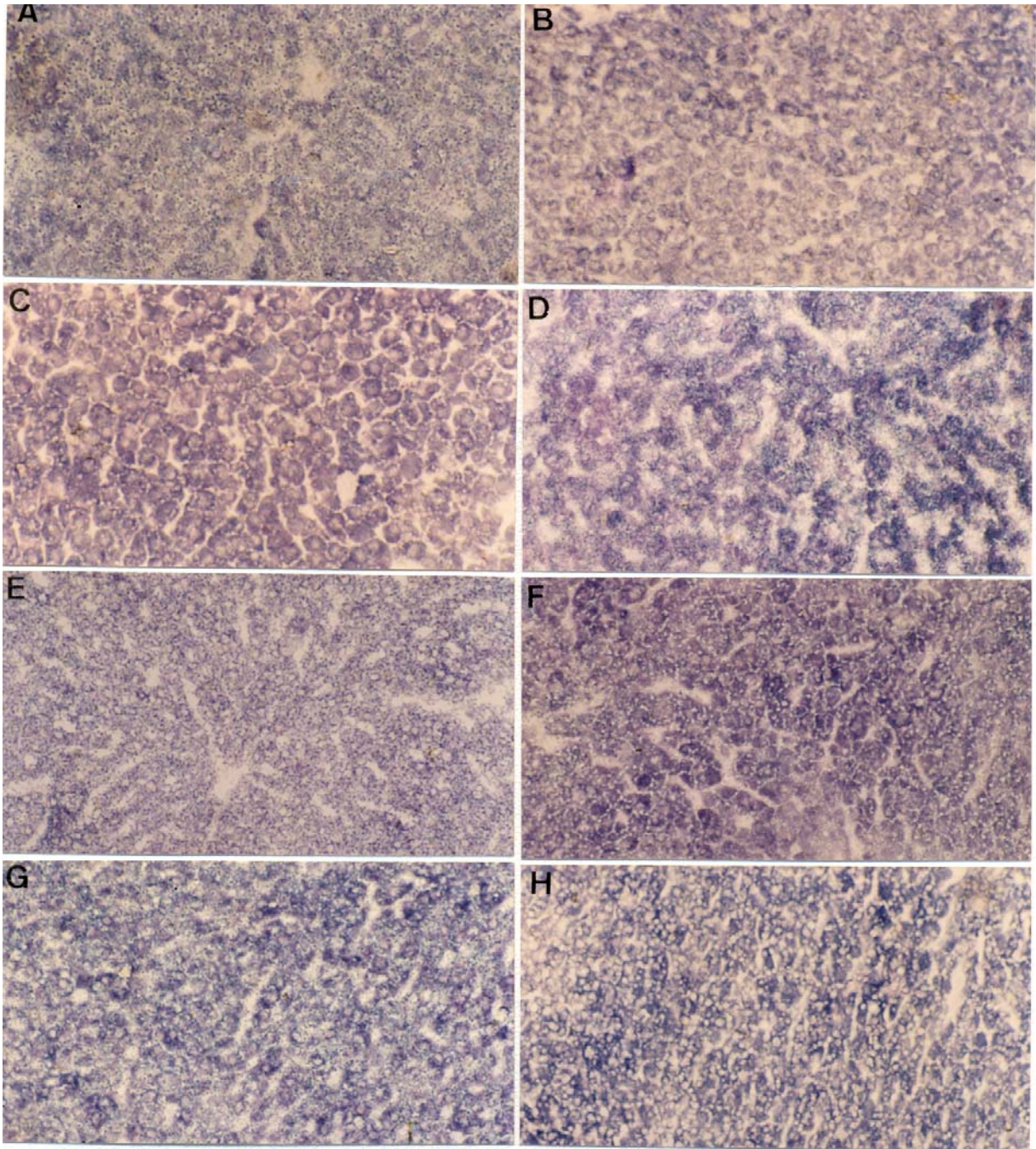


FIGURA 18 – Fotomicrografia da histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – tetrazólio redutase (NADPH₂-TR) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

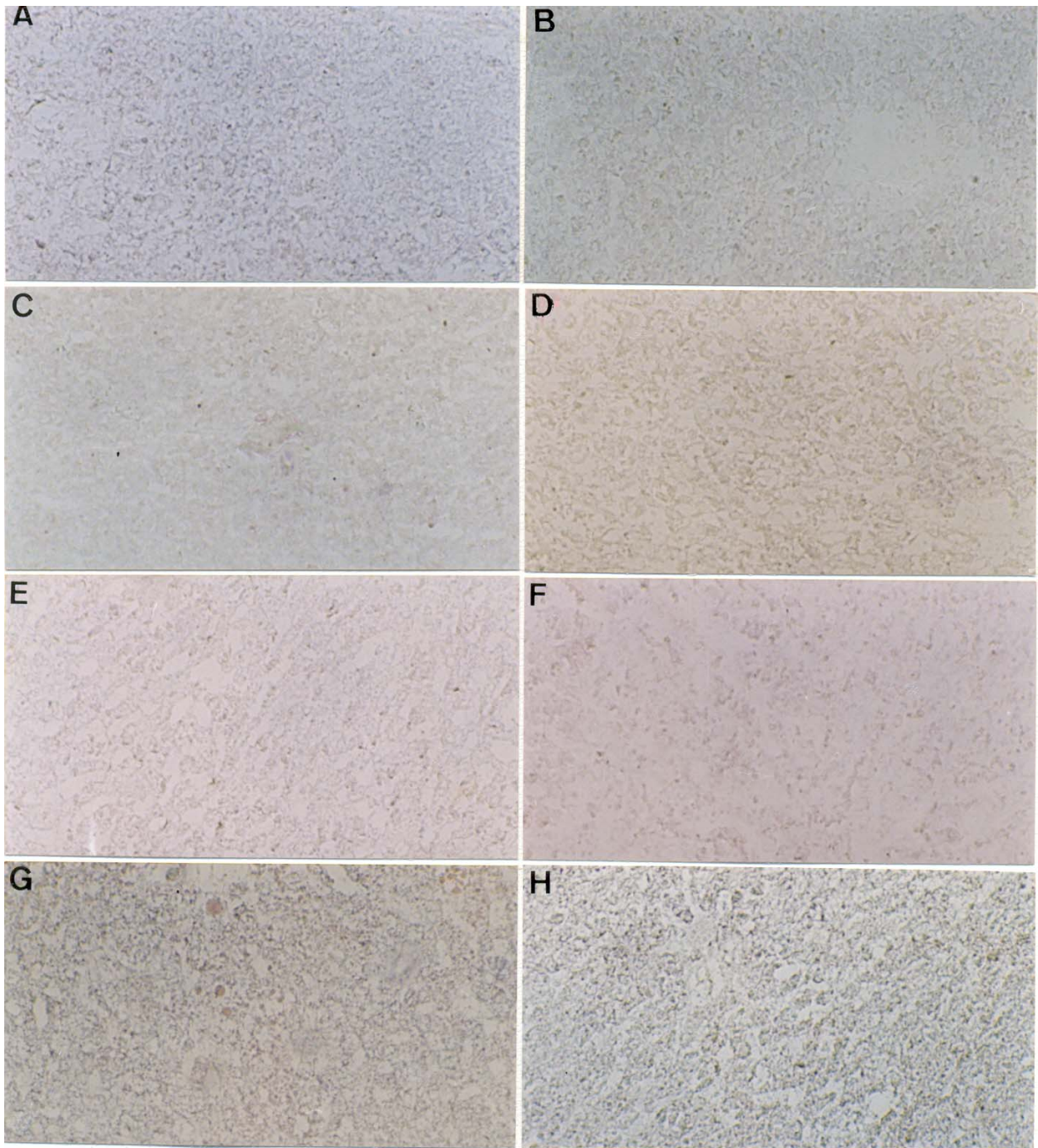


FIGURA 19 – Fotomicrografia da histoquímica da succinato desidrogenase (S-D) nos hepatócitos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A** – controle (alimentado – dia 0); **B** – experimental (dia 0); **C** – 2 dias de restrição alimentar; **D** – 7 dias de restrição alimentar; **E** – 30 dias de restrição alimentar; **F** – 60 dias de restrição alimentar; **G** – 7 dias de realimentação; **H** – 30 dias de realimentação. Objetiva: 10x.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra a importância do manejo alimentar e de fatores ambientais para o crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

A restrição alimentar prejudicou o crescimento dos pacus juvenis, fato observado tanto pelo peso quanto pelo comprimento corporal (Tabela 2), embora não tenha prejudicado a capacidade de recuperação destes parâmetros, após o restabelecimento da alimentação.

No período de estudo, com temperaturas ambientais mais altas (outubro/janeiro), os peixes submetidos a restrição alimentar mantiveram o peso corporal até 30 dias sem alimento, com tendência de diminuição aos 60 dias e recuperação após 30 dias de realimentação; os que se alimentavam mantiveram o crescimento normal. A manutenção no peso e comprimento, durante a restrição alimentar, parece se basear no desvio da utilização da energia para os processos básicos de sobrevivência do peixe e não para o crescimento dos tecidos corporais, já que nenhuma fonte exógena estava presente.

Respostas obtidas por BASTROP *et al.* (1991), TZENG & YU (1992), MEHNER & WIESER (1994), ZAMAL & OLLEVIER (1995), OLIVEREAU & OLIVEREAU (1997) e HUNG *et al.* (1997) mostraram que o jejum provoca perda de peso corporal.

Comparando os resultados deste experimento com os obtidos por SOUZA *et al.* (1997), que testaram os efeitos do jejum no inverno, na mesma espécie, observa-se que o crescimento compensatório após realimentação ocorreu em ambos os casos. Entretanto, no verão, após 30 dias de retorno ao alimento, os animais experimentais não superaram os continuamente alimentados, como ocorreu no inverno. Isto pode ser conseqüência da taxa metabólica maior no verão, quando há maior consumo energético para sustentar as atividades biológicas do peixe. BORGHETTI & CANZI (1993) evidenciaram a importância da temperatura no metabolismo do pacu relacionando temperatura baixa com menor taxa metabólica.

No inverno, a demanda energética é menor pela diminuição das atividades do animal. Nesta fase, mecanismos de ajuste metabólico ajudam os peixes a suportar melhor a falta de alimento (WEATHERLEY & GILL, 1987). Não obstante o maior consumo energético e os efeitos mais severos da temperatura, os pacus suportaram uma restrição alimentar de até 60 dias e voltaram a crescer após normalização do alimento. É possível, ainda, que o potencial de crescimento dos peixes sob restrição alimentar seja maior que o dos continuamente alimentados, pois enquanto estes últimos ganharam, em média, 7 g em 7 dias e 73 g em 23 dias, os submetidos à restrição alimentar ganharam 44 e 114 g, respectivamente, nos mesmos períodos.

Segundo DOBSON & HOLMES (1984), após um período de jejum e subsequente realimentação, ocorre uma utilização mais eficiente de alimento, que é refletida em um aumento repentino do crescimento, o crescimento compensatório. Esse fenômeno também foi observado para *Salmo gairdneri* = *Oncorhynchus mykiss* (QUINTON & BLAKE, 1980;

WEATHERLEY & GILL, 1981; SUMPTER *et al.*, 1991), *Phoxinus phoxinus* (RUSSEL & WOOTTON, 1992), *Leuciscus cephalus*, *Chalcalburnus chalcoides mento*, *Scardinius erythrophthalmus* (WIESER *et al.*, 1992), *Salmo salar*, *Salvelinus alpinus* (SKILBREI, 1990; MORTENSEN & DAMSGÅRD, 1993; JOBLING *et al.*, 1993) e *Ictalurus punctatus* (KIM & LOVELL, 1995b). Já, PAUL *et al.* (1995) afirmaram que o *Pleuronectes asper* apresentou uma capacidade limitada para o crescimento compensatório.

A restrição alimentar, no período estudado, não acarretou modificações na composição corporal dos pacus juvenis, que sugerissem prejuízos na qualidade da carcaça (Tabela 4).

O teor de proteína bruta na carcaça do pacu não foi modificado pela restrição alimentar ou realimentação, concordando com WEATHERLEY & GILL (1987), BASTROP *et al.* (1991), KIM & LOVELL (1995a) e ECHEVARRÍA *et al.* (1997), segundo os quais a tendência geral, no jejum de peixes, é conservar a proteína corporal, utilizando-se de estoques de lipídio e glicogênio, embora STIRLING (1976); REINITZ *et al.* (1978); ALLIOT *et al.* (1984); UMINO *et al.* (1991), ZAMAL & OLLEVIER (1995) e HUNG *et al.* (1997) tenham observado diminuição da proteína da carcaça.

Após 30 dias de realimentação, o lipídio ou extrato etéreo da carcaça dos peixes sob restrição de alimento, não atingiu valores dos continuamente alimentados, embora voltasse aos índices iniciais do período experimental. A maior mobilização da gordura corporal pelo peixe foi detectada após 30 e, principalmente, 60 dias sem alimento. Essa resposta sugere que durante a restrição alimentar, o pacu utilizou parte de sua reserva de lipídio da carcaça como fonte energética. A lipólise forneceria ácido graxo para a via β oxidativa e produção de energia. Estes resultados tem confirmação na literatura (STIRLING, 1976; REINITZ *et al.*, 1978; ALLIOT *et al.*, 1984; JÜRSS *et al.*, 1987; UMINO *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 1998;

ZAMAL & OLLEVIER, 1995; KIM & LOVELL, 1995b), com trabalhos que enfatizam a importância biológica do lipídio como fonte de energia no peixe.

O maior teor de umidade na carcaça a partir de 30 dias de restrição alimentar até os 7 dias de realimentação, nos animais experimentais, está inversamente relacionado à quantidade de extrato etéreo, sugerindo que o peso corporal foi mantido às custas da hidratação dos tecidos. Respostas semelhantes foram observadas em *Dicentrarchus labrax* (STIRLING, 1976; ECHEVARRÍA *et al.*, 1997), *Pleuronectes platessa* (MOON & JOHNSTON, 1980), *Salmo gairdneri* (JÜRSS *et al.*, 1987), *Pagrus major* (UMINO *et al.*, 1991) e *Clarias gariepinus* (ZAMAL & OLLEVIER, 1995), durante o jejum. Entretanto, diferentemente REINITZ (1983) observou diminuição na umidade da carcaça de *Salmo gairdneri* e COLLINS & ANDERSON (1995) não encontraram alterações desse elemento em *Macquaria ambigua*.

A diminuição do lipídio ou extrato etéreo ocorreu juntamente com o aumento da umidade da carcaça. Quanto ao teor de cinzas, não ocorreu modificação frente à restrição alimentar, do mesmo modo que a proteína bruta. Segundo STIRLING (1976) e ZAMAL & OLLEVIER (1995), houve aumento de cinzas na carcaça de *Dicentrarchus labrax* e de *Clarias gariepinus* submetidos ao jejum.

A dinâmica das reservas energéticas do peixe, em nível de sangue e tecidos, pode elucidar os processos de crescimento e composição de carcaça (Tabela 6).

O glicogênio hepático, principal fonte de unidades de hexoses para manutenção da glicose sangüínea, foi mobilizado frente a restrição alimentar. Isto se verificou, nos pacus, a partir de 7 dias sem alimento. Mesmo após a realimentação, os níveis de glicogênio hepático não voltaram aos valores iniciais. Neste caso, os processos compensatórios de reorganização fisiológica, incluindo o crescimento corporal, que foi observado, deve ter consumido toda energia proveniente do alimento, impossibilitando acúmulo na forma de glicogênio no fígado. Além disso, a demanda por energia é maior, considerando a época do

ano. Estudo com o mesmo peixe (SOUZA, 1994), no inverno, mostrou o mesmo padrão de resposta do verão. Em *Cyprinus carpio* (BÖHM *et al.*, 1994) e *Macquaria ambigua* (COLLINS & ANDERSON, 1995), os valores de glicogênio hepático foram totalmente recuperados dentro de 30 dias de realimentação, com experimento realizado em temperaturas inferiores a 20°C.

Os resultados do presente estudo concordam com os encontrados por PASTOREAUD (1991), FOSTER & MOON (1991), BLASCO *et al.* (1992), NAVARRO *et al.* (1992), SOUZA (1994), COLLINS & ANDERSON (1995), SOENGAS *et al.* (1996) e HUNG *et al.* (1997), quanto à mobilização do glicogênio hepático durante o jejum. Entretanto, existem dados controversos na literatura (DAVE *et al.*, 1975; SHERIDAN & MOMMSEN, 1991) e isto pode ocorrer em função da variação entre espécies, época do ano, protocolo experimental e idade dos peixes.

A diminuição do glicogênio hepático, dos animais controles, a partir de 30 dias de experimento, pode estar relacionada à temperatura, que se torna mais elevada e com padrão de alterações mais regular (Figura 1A e 4). A este fato, pode estar ligado uma atividade biológica dos peixes mais intensa e que ocorre naturalmente nesta época do ano, levando a maior consumo de energia e impedindo a formação de reservas de substratos energéticos. Isto é evidente em janeiro, na última amostragem.

Os dados bioquímicos foram confirmados por estudos histoquímicos e ultraestruturais. Pela reação de PAS observou-se, diminuição gradativa da presença de glicogênio no fígado de pacu, a partir de 7 dias de restrição alimentar, e mesmo após a realimentação, reforçando a idéia da utilização dos estoques de glicogênio em situações críticas, para a manutenção dos níveis de glicose sangüínea. Outros autores (SASSE, 1975; SCHÄR *et al.*, 1985, BARNI *et al.*, 1985; MELLO DE OLIVEIRA, 1986) também utilizaram essa técnica para a demonstração histoquímica deste carboidrato.

A análise ultraestrutural do fígado dos pacus confirmou a diminuição na quantidade de partículas de glicogênio a partir de 7 dias de restrição alimentar e continuou baixa até 30 dias de realimentação. Respostas semelhantes foram obtidas por LEATHERLAND (1982) e STORCH & JUARIO (1983).

Segundo REVEL (1963), através da microscopia eletrônica, podem ser reconhecidos dois tipos básicos de partículas de glicogênio. A primeira, denominada de partículas β , aparece em forma esférica rugosa (grânulo) podendo ter o contorno liso ou levemente irregular. A outra forma, denominada de partícula α , é um complexo único de uma massa fechada, semelhante a um cacho de uva, comumente referida como roseta.

No presente estudo, as partículas de glicogênio encontradas nas células hepáticas do pacu foram apresentadas sob a forma de roseta, semelhante aquelas obtidas por HINTON *et al.* (1972), WELSCH & STORCH (1973), KENDALL & HAWKINS (1975), HAMPTON *et al.* (1985), BIAGIANTI-RISBOURG (1991), ROBERTSON & BRADLEY (1992) e BÖHM *et al.* (1994). Entretanto, VERNIER & SIRE (1976) e BARNI *et al.* (1985) encontraram tanto partículas α quanto β em hepatócitos de *Salmo gairdneri* e *Anguilla anguilla*, respectivamente.

Uma importante ferramenta bioquímica, que ajuda a entender a dinâmica do glicogênio na restrição alimentar, é a determinação da atividade da fosfoglicomutase (PGM). Essa enzima atua na reação reversível de transformação de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, de modo que, tanto a via glicogênica quanto a glicolítica possam ser ativadas, dependendo da disponibilidade de substrato. Na restrição alimentar, a atividade dessa enzima diminuiu aos 30 e 60 dias, impedindo que a glicose-1-fosfato, proveniente da glicogenólise fosse convertida em glicose-6-fosfato. Dessa forma, a glicogenólise foi bloqueada, fato visto na manutenção deste substrato, que ocorreu nesse período. A atividade da PGM volta a aumentar na realimentação, sugerindo a reativação da via, com coincidente queda dos níveis de glicogênio.

A ausência de alimento levou a uma queda da glicose circulante aos 7 dias, um período que deve ter sido crítico em termos de exigência energética, visto que o glicogênio hepático também foi reduzido, a menos da metade do detectado no período anterior. A resposta compensatória de ajuste metabólico verifica-se na amostragem seguinte, com aumento significativo da glicemia. Estes níveis são mantidos aos 60 dias sem alimento, sugerindo ativação compensatória da via gliconeogênica (WEATHERLEY & GILL, 1987). O substrato gliconeogênico pode ser o glicerol, haja visto que neste período ocorre lipólise, com aumento dos níveis de ácidos graxos livres. Esse mecanismo foi abandonado quando o fornecimento de alimento foi restabelecido. Neste caso, ocorre uso da glicose para sustentar os processos de recuperação fisiológica, acionados pelo arraçoamento.

Segundo BLASCO *et al.* (1992), existem três processos que podem explicar a manutenção de glicose: 1- diminuição geral do metabolismo; 2- mobilização do glicogênio, que ocorre quando uma grande demanda energética é produzida, como no início do jejum; 3- síntese de glicose a partir de substratos gliconeogênicos.

O comportamento da glicose tem correlação com as respostas da atividade da fosfofrutoquinase (PFK), enzima chave da glicólise, que mostrou-se fraca no início da restrição alimentar e aumentou coincidindo com os picos de glicose sangüínea verificados aos 30 e 60 dias, mostrando presença do substrato para esta enzima. Seu aumento é maior diante da disponibilidade de nutriente na realimentação.

Diminuições na atividade da PFK foram observadas em *Pleuronectes platessa* (MOON & JOHNSTON, 1980), *Salmo gairdneri* (FIDEU *et al.*, 1983) e *Salmo salar* (SOENGAS *et al.*, 1996). Entretanto, MOON *et al.* (1989) e MEHNER & WIESER (1994) não notaram alterações na atividade desta enzima, durante o jejum.

Coincidindo com os picos de glicose sangüínea, provenientes de gliconeogênese (30 e 60 dias de restrição alimentar), observou-se atividade mais elevada da glicose-6-fosfatase

(G6P-A), enzima que atua na remoção de fosfato da glicose-6-fosfato, permitindo que a glicose livre seja difundida para os tecidos (MAYES, 1990). No fígado de rato, a atividade da G6P-A é aumentada durante o jejum, sinalizando a ativação da gliconeogênese (MINASSIAN *et al.*, 1995), coincidindo com respostas encontradas em *Salmo gairdneri* (SCHÄR, *et al.*, 1985), *Leuciscus idus melanotus* (SEGNER & BRAUNBECK, 1988) e *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990). Entretanto, Macha *et al.* (1982) citados por SCHÄR *et al.* (1985) encontraram diminuições na atividade dessa enzima em outros teleósteos.

Na literatura, a diversidade de resultados quanto à resposta glicêmica ao jejum pode ser atribuída a diferentes fatores como: espécie, temperatura, migração, desova e condições nutricionais. Durante o jejum foi observada hipoglicemia em *Anguilla anguilla* (LARSSON & LEWANDER, 1973), *Dicentrarchus labrax* (ZAMMIT & NEWSHOLME, 1979; ECHEVARRÍA *et al.*, 1997), *Gadus morhua* (BLACK & LOVE, 1986), *Perca flavescens* (FOSTER & MOON, 1991), *Cyprinus carpio* (BLASCO *et al.*, 1992) e *Salmo trutta fario* (NAVARRO *et al.*, 1992). Já SHERIDAN & MOMMSEN (1991) observaram hiperglicemia em *Oncorhynchus kisutch* após uma semana de jejum, com estabilização dos níveis normais após 3 semanas.

No caso dos animais alimentados, a diminuição gradativa da glicose sangüínea a partir de 30 dias de experimento, coincide com a queda do glicogênio hepático, corroborando a afirmação de maior consumo energético, por maior exigência biológica.

O lipídio apresenta-se como importante fonte de energia na restrição alimentar, pois os níveis menores deste metabólito parecem refletir a utilização do mesmo, junto com os carboidratos, para suprir o organismo do peixe, diante da adversidade do jejum. O estoque hepático acha-se diminuído, na ausência de alimento, enquanto outros sítios de lipídios também são acionados, visto que este substrato diminui na carcaça (Tabela 4) e nas vísceras (Tabela 2), nas fases mais adiantadas da restrição alimentar (30 e 60 dias) e início da realimentação.

No presente estudo, a diminuição mais acentuada do índice-gordura-víscero-somático (IGVS) foi encontrada somente aos 60 dias de restrição alimentar e aos 7 dias de realimentação. Nos peixes alimentados, os valores não foram alterados embora, tenha sido notada uma tendência de aumento na última amostragem. Valores diminuídos de IGVS também foram obtidos por ZAMAL & OLLEVIER (1995), COLLINS & ANDERSON (1995), KAKIZAWA *et al.* (1995), ARNTD *et al.* (1996) e HUNG *et al.* (1997) durante o jejum.

Após 30 dias de realimentação, o IGVS foi restabelecido. Segundo COLLINS & ANDERSON (1995), a recuperação desse sítio de armazenamento de lipídio não é tão rápida quanto a que ocorre no fígado, sugerindo que este órgão é usado como fonte inicial de energia endógena, sendo os depósitos periviscerais usados depois. A utilização da gordura visceral como fonte energética mais prontamente disponível, durante a privação alimentar, foi documentada por WEATHERLEY & GILL (1987) e ZAMAL & OLLEVIER (1995). No presente estudo, a depleção dos estoques de gordura começaram pela carcaça, sendo acionados depois os estoques hepáticos e viscerais (aos 60 dias de restrição alimentar).

Queda nos níveis de lipídio hepático foi relatada também por JEZIERSKA *et al.* (1982), MACHADO *et al.* (1988), NAVARRO *et al.* (1992), BLASCO *et al.* (1992) e COLLINS & ANDERSON (1995) durante o jejum. A total recuperação desse componente foi observada após a realimentação (BÖHM *et al.*, 1994; COLLINS & ANDERSON, 1995).

Os níveis diminuídos de lipídio hepático, durante a restrição alimentar, podem refletir, além de mobilização, menor síntese, fato confirmado pela atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-D) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG-D), envolvidas na via da pentose fosfato, para formação de NADPH utilizado na biossíntese de lipídios (MAYES, 1990). Diminuições na atividade dessas enzimas também foram confirmadas por LOVE (1980), SHIMENO *et al.* (1990), BASTROP *et al.* (1992), BÖHM *et al.* (1994) e HUNG *et al.* (1997), durante o jejum. A viabilidade das desidrogenases NADH e NADPH-dependentes foi

confirmada pelas reações de nicotinamida adenina dinucleotídeo – tetrazólio redutase (NADH₂-TR) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – tetrazólio redutase (NADPH₂-TR). Segundo WELSH & STORCH (1973), ambas as enzimas encontram-se distribuídas no fígado, mas a NADPH₂-TR apresenta uma reação mais fraca do que a NADH₂-TR, fato observado no presente estudo.

As alterações nas quantidades de lipídeos e glicogênio refletem-se no tamanho do órgão. O índice hepato-somático (IHS) diminuiu gradativamente, nos animais experimentais, com diferenças mais acentuadas entre 7 e 60 dias de restrição alimentar. Essa diminuição no IHS, provavelmente, foi decorrente da mobilização das reservas de lipídio e glicogênio. Respostas semelhantes foram obtidas por PASTOUREAUD (1991), UMINO *et al.* (1991), FOSTER & MOON (1991), BLASCO *et al.* (1992), NAVARRO *et al.* (1992), BÖHM *et al.* (1994), ZAMAL & OLLEVIER (1995), KAKIZAWA *et al.* (1995), COLLINS & ANDERSON (1995), SOENGAS *et al.* (1996), ECHEVARRÍA *et al.* (1997) e HUNG *et al.* (1997).

Após 30 dias de realimentação, os valores de IHS foram totalmente restabelecidos, superando aqueles do controle. BÖHM *et al.* (1994), COLLINS & ANDERSON (1995) e SOENGAS *et al.* (1996) obtiveram o mesmo padrão de resposta em *Cyprinus carpio*, *Macquaria ambigua* e *Salmo salar*, respectivamente. Segundo esses autores, a recuperação do IHS é rápida e este fato pode ser atribuído a um simples aumento no volume dos hepatócitos em decorrência da regeneração das reservas energéticas do fígado, como lipídio e glicogênio.

A mobilização do lipídio como fonte de energia, na restrição alimentar, é confirmada pelo aumento de ácidos graxos livres plasmáticos observada nos períodos mais prolongados de jejum, cujos níveis são restabelecidos na realimentação. Essa mobilização de lipídio envolve a quebra de triglicerídeos a ácidos graxos livres e glicerol liberados para a corrente sanguínea. Enquanto o ácido graxo livre é oxidado para produção de energia, o glicerol pode

ser precursor gliconeogênico. Durante o jejum, o aumento de ácidos graxos livres circulantes inibe a utilização de glicose pelos tecidos periféricos e sua liberação pelo fígado (COLLINS & ANDERSON, 1995).

O aumento nos níveis de ácidos graxos livres plasmáticos também foi relatado por MACHADO *et al.* (1988, 1989), SHIMENO *et al.* (1990), SHERIDAN & MOMMSEN (1991), SOUZA (1994) e COLLINS & ANDERSON (1995) durante o jejum e diminuição (BÖHM *et al.*, 1994) após a realimentação. Entretanto, INCE & THORPE (1976) e FARBRIDGE *et al.* (1992) não encontraram alterações nos níveis deste metabólito e BLACK & LOVE (1986) observaram valores diminuídos do mesmo durante o jejum.

A determinação da enzima lactato desidrogenase (L-D) mostrou atividade reduzida na restrição alimentar, durante os aumentos da glicose sangüínea. Possivelmente, esta diminuição esteja ligada a maior quantidade de ácido graxo livre presente na restrição alimentar, visto que ela atua na transformação de ácido láctico a pirúvico. Na sua ausência (30 e 60 dias), o piruvato seria utilizado para formação de acetil-CoA e, conseqüentemente, síntese de ácido graxo. Esse deslocamento do piruvato para síntese de ácido graxo sugere que o mesmo não alimentou o ciclo de Krebs, tanto que a succinato desidrogenase (S-D) não teve atividade representativa. Segundo SCHÄR *et al.* (1985), a atividade da L-D, em mamífero, pode representar um sinal para a ativação da gliconeogênese embora, no fígado de *Salmo gairdneri*, a gliconeogênese, a partir do lactato, não representa um papel essencial. Atividade diminuída da L-D foi observada em *Rutilus rutilus* (MÉNDEZ & WIESER, 1993), enquanto SOENGAS *et al.* (1996) notaram aumento na atividade desta enzima em *Salmo salar*, durante o jejum, servindo de substrato para a gliconeogênese. Uma fraca atividade da S-D foi observada no fígado de *Salmo gairdneri* (SCHÄR *et al.*, 1985).

Os efeitos adversos da ausência de alimento e, conseqüentemente, baixa disponibilidade de energia para as células, se verificam também nos níveis de proteína

plasmática dos peixes, mostrando que a capacidade funcional do fígado, principal local de síntese dessas proteínas, acha-se prejudicada. Respostas semelhantes à do presente estudo em *Gadus morhua* (KAMRA, 1966), *Salmo trutta* (Carbery, 1970 citado por LOVE, 1980) e *Cyprinus carpio* (SHIMENO *et al.*, 1990) revelaram que os níveis de proteína total plasmática diminuíram com o jejum.

Histologicamente, as células hepáticas do pacu estavam arranjadas em cordões sem a constituição de lóbulos, eram poligonais, com um ou dois núcleos centrais, apresentavam nucléolos, ductos biliares, capilares sinusóides, vasos sangüíneos e pâncreas intra-hepático. Essas características coincidem com aquelas observadas no fígado de *Micropterus salmoides* (HINTON *et al.*, 1972), *Ictalurus punctatus* (KENDALL & HAWKINS, 1975), *Salmo gairdneri* (CHAPMAN, 1981), *Leuciscus idus* (SEGNER & BRAUNBECK, 1990), *Spauratus auratus* (RIBELLES *et al.*, 1995), *Hydrocynus forskahlii* (GEYER *et al.*, 1996) e *Brycon orbignyanus* (VASQUES, 1997). Entretanto, em *Micropogon undulatus* (EURELL & HAENSLY, 1982) e *Salmo salar* (ROBERTSON & BRADLEY, 1992) foi constatada a constituição de lóbulos no parênquima hepático.

No presente estudo foram notadas ainda, quantidades consideráveis de pigmentos castanhos. Segundo TOKUMARU & FERRI (1970) e EURELL & HAENSLY (1982), esses pigmentos, conhecidos como lipopigmentos ou lipocromos, são pigmentos contendo lipídios e incluem lipofuscina e ceróide. A formação desse pigmento se inicia com um acúmulo de partículas de lipídio nas células parenquimais. Esse acúmulo de lipídio é oxidado em uma via alternativa e o pigmento resultante consiste de lipídios macromoleculares, glicolipoproteínas e carboidratos.

Esses pigmentos foram observados em hepatócitos de *Pimelodus maculatus*, *Prochilodus scrofa*, *Cyprinus carpio* (TOKUMARU & FERRI, 1970), *Micropogon undulatus* (EURELL & HAENSLY, 1982), *Brycon orbignyanus* (VASQUES, 1997), entre outros.

Após 30 dias de restrição alimentar, verificou-se uma atrofia do fígado, com diminuição da área e volume do citoplasma e núcleo dos hepatócitos, uma desorganização dos cordões de células hepáticas, estreitamento dos capilares sinusóides, acúmulo de pigmentos castanhos. A realimentação reverteu as alterações estruturais anteriores.

Através da morfometria dos hepatócitos foi constatado que a área e volume do citoplasma e núcleo dessas células diminuíram, ao mesmo tempo que o IHS e os teores de glicogênio e lipídio total.

Após a realimentação de 30 dias, verificou-se uma recuperação nos valores de área e volume do citoplasma e núcleo, provavelmente, decorrente de um reajuste funcional do fígado, quando normalizado o fornecimento de alimento, tendo em vista que não foram formados estoques de fontes energéticas e sim, utilizados na manutenção dos processos vitais, repondo o catabolismo do tecido, e no crescimento. Segundo LOVE (1980), STORCH & JUARIO (1983) e BÖHM *et al.* (1994), as alterações nessas células resultantes do jejum são reversíveis, permitindo a formação de novos estoques de glicogênio e restabelecendo os valores referentes ao peso do órgão.

Os níveis plasmáticos de triiodotironina (T_3) foram inferiores nos animais experimentais. Ao mesmo tempo, observa-se que a extensão do jejum leva à estabilização do peso corporal desses animais. A possibilidade discutida por vários autores (WEATHERLEY & GILL, 1987; EALES & MacLALCHY, 1989; SUMPTER, 1992; FARBRIDGE & LEATHERLAND, 1992; SCOTT-THOMAS *et al.*, 1992; YOUSON *et al.*, 1995) de que os hormônios da tireóide têm papel importante no crescimento corporal de peixes e que o jejum interfere nos níveis basais desses hormônios foi confirmada no presente estudo, mostrando possível regulação do processo pela tireóide.

Por outro lado, considerando que o experimento foi conduzido em época do ano com temperatura ambiente mais alta, o que provoca elevação nas taxas metabólicas e de

crescimento, foi possível notar que o crescimento corporal do pacu foi prejudicado pela restrição alimentar, embora esse prejuízo tenha sido revertido quando restabelecido o fornecimento do alimento. Todas as alterações sofridas pelo organismo dos peixes durante o jejum ocorreram devido a uma desorganização metabólica, revertida na realimentação e a dinâmica dos metabólitos analisados no presente estudo puderam esclarecer as alterações ocorridas no crescimento desses animais.

Assim, ficou evidenciado, no presente estudo, que a adversidade do jejum não prejudicou a capacidade do pacu quanto à recuperação fisiológica do crescimento, mesmo quando esta adversidade foi intensificada pela época do ciclo de vida dos pacus, em que a exigência metabólica é mais intensa. Em face do exposto é possível que se quantidade do alimento fornecido fosse parcelada e oferecida pela manhã e à tarde, *ad libitum*, a disponibilidade e o aproveitamento da ração pelos peixes proporcionariam uma recuperação mais rápida do crescimento. Ainda, como o pacu mostrou potencial para o crescimento compensatório, sugere-se considerar a inclusão de ciclos alternados de jejum com alimentação no manejo alimentar desta espécie, visando a obtenção de melhores respostas quanto ao crescimento compensatório e conseqüente melhor produção com menor custo de investimento.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- a restrição alimentar de até 60 dias, em período de alta taxa metabólica e de crescimento, não causou mortalidade nem efeitos deletérios no organismo do pacu que impedissem a recuperação de sua atividade fisiológica após a realimentação;
- o período de 30 dias de realimentação foi suficiente para o pacu mostrar seu potencial para o crescimento compensatório;
- a qualidade da carcaça desses peixes não foi comprometida pela restrição alimentar, visto que a proteína e o lipídio foi restabelecido após a realimentação;
- o fornecimento de ração apenas 1 vez ao dia, pela manhã, pode ter interferido nas respostas fisiológicas, limitando o crescimento dos peixes alimentados, bem como daqueles realimentados após restrição alimentar;
- durante a restrição alimentar, o glicogênio hepático foi a primeira fonte energética mobilizada, seguido pelo lipídio da carcaça, do fígado e da gordura visceral, para a manutenção dos processos vitais.

8. ABSTRACT

This study describes the effects of food restriction and refeeding on growth and energetic metabolism of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) through biochemical, histoenzymological and structural focuses. Experimental was carried out in UNESP Aquaculture Center, Jaboticabal, São Paulo State from October 17, 1995 to January 16, 1996. 98 juvenile fish (mean size of 250 g body weight) were separated in two groups: fed (control) and food restricted (experimental). The experimental group was sampled at zero (0), 2, 7, 30 and 60 days of starvation and 7 and 30 days of refeeding (n = 7/day/group). The control group, daily fed, was sampled at the same days. All data were analyzed using a 2x7 factorial scheme (two nutritional conditions – food restriction/refeeding and conditions feeding – and seven different periods of restriction and refeeding) in a Completely Randomized Design with seven replications. Means were compared by Tukey's test. Restricted food fish exhibited decreased body weight and length and compensatory growth after refeeding. Food restriction induced reduction in the hepatosomatic index (HSI) and visceral lipid somatic index (VLSI), recovering after refeeding. Carcass dry matter and ethereal extract decreased concomitant to increased moisture under food restriction, although none difference was detected in crude

protein and ash contents. Blood glucose showed lower levels along the experiment and experimental group showed peak values during food restriction. Liver glycogen decreased after 7 days without food. Plasma total protein, liver total lipid and T₃ (triiodotyronine) showed lower levels in food restriction regime. Free fatty acids increased through the food restriction and decreased in the refeeding. Cytoplasm and nucleous areas and volumes of the hepatocytes showed lower values when fish were starved with recovery after fed. The disarrangement of the liver tissue provoked by the food lack recovered after food. Data from electronic microscopy and histochemistry of the enzymes involved in energy metabolism confirmed the biochemical findings and explained the alterations related to the metabolites dynamics during the food restriction and refeeding.

9. LITERATURA CITADA

- ABRAHAM, S., HANSEN, H.J.M., HANSEN, F.N. The effect of prolonged fasting on total lipid synthesis and enzyme activities in the liver of the european eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 79B, n. 2, p. 285-289, 1984.
- ALLIOT, E., DJABALL, M., PASTOUREAUD, A., THEBAULT, H. Changes in the biochemical composition of tissues in juvenile sea bass during forced starvation. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 12, n. 2, p. 209-213, 1984.
- ANGELINI, R., CANTELMO, O.A., PETRERE Jr., M. Determinação da taxa de consumo de ração pelo pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, com diferentes tamanhos e sob distintas temperaturas. *Bol. Téc. CEPTA*, v. 5, p. 11-22, 1992.
- A.O.A.C. - (Association of Official Agriculture Chemists). *Official methods of analysis*. 14 th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A., 1984, 336p.
- ARNDT, S.K.A., BENFEY, T.J., CUNJAK, R.A. Effect of temporary reductions in feeding on protein synthesis and energy storage of juvenile Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, v. 49, p. 257-276, 1996.
- BAANANTE, I.V., GARCÍA DE FRUTOS, P., BONAMUSA, L., FERNANDEZ, F. Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P₂ and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 100B, n. 1, p. 11-17, 1991.

- BARNI, S., BERNOCCHI, G., GERZELI, G. Morphohistochemical changes in hepatocytes during the life cycle of the European eel. *Tissue & Cell*, v. 17, n. 1, p. 97-109, 1985.
- BASTROP, R., SPANGENBERG, R., JÜRSS, K. Biochemical adaptation of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) to food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 98A, n. 1, p. 143-149, 1991.
- BEHMER, O.A., FOLOSA, E.M.C., FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patologia*. São Paulo: EDART, EDUSP, 1976, 248 p.
- BIAGIANTI-RISBOURG, S. Fine structure of hepatocytes in juvenile grey mullets: *Liza saliens* Risso, *L. ramada* Risso and *L. aurata* Risso (Teleostei, Mugilidae). *J. Fish Biol.*, v. 39, p. 687-703, 1991.
- BISBAL, G.A., BENGTSON, D.A. Description of the starving condition in summer flounder, *Paralichthys dentatus*, early life history stages. *Fish. Bull.*, v. 93, p. 217-230, 1995.
- BLACK, D. LOVE, R.M. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol.*, v. 156, p. 469-479, 1986.
- BLASCO, J., FERNÁNDEZ, J., GUTIÉRREZ, J. The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels, *Cyprinus carpio* L., 1758. *J. Fish Biol.*, London, v. 38, p. 587-598, 1991.
- _____ Variations in tissue reserves, plasma metabolites and pancreatic hormones during fasting in immature carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 103A, n. 2, p. 357-363, 1992.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.
- BÖHM, R., HANKE, W., SEGNER, H. The sequential restoration of plasma metabolite levels, liver composition and liver structure in refeed carp, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Physiol.*, v. 164B, p. 32-41, 1994.
- BONILLA, E., SCHOTLAND, D.L. Histochemical diagnosis of muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch. Neurol.*, v. 22, p. 8-12, 1970.

- BORGHETI, J.R., CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. *Aquaculture*, v. 114, p. 93-101, 1993.
- CARROL, N.V.R., LONGLEY, W., ROE, J.N. The determination of glycogen in liver and muscle by use anthrone reagent. *J. Biol., Chem.*, v. 20, p. 583-593, 1956.
- CHANG, W., IDLER, D.R. Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 38, p. 553-558, 1960.
- CHAPMAN, G.B. Ultrastructure of the liver of the fingerling rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, v. 18, p. 553-567, 1981.
- CHAVIN, W., YOUNG, J.E. Factors in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 33, n. 3, p. 629-653, 1970.
- CHIQUEINE, A.D. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and in the kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 1, p. 429-435, 1953.
- CHRISTIANSEN, D.C., KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 88B, p. 701-711, 1988.
- COLLINS, A.L., ANDERSON, T.A. The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.*, v. 47, p. 1004-1015, 1995.
- COWEY, C.B., KNOX, D., WALTON, M.J., ADRON, J.W. The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Br. J. Nutr.*, v. 38, p. 463-470, 1977.
- CUI, Y., WOOTTON, R.J. Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus* (L.): the effect of ration and temperature on growth rate and efficiency. *J. Fish Biol.*, v. 33, p. 763-773, 1988.
- DAVE, G., JOHANSSON-SJOBECK, M.-L., LARSSON, A., LEWANDER, K., LIDMAN, U. Metabolic and hematological effects of starvation in the european eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 52A, p. 423-430, 1975.
- DOBSON, S.H., HOLMES, R.M. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, v. 25, p. 649-656, 1984.

- DOLE, V.P., MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue. *J. Biol. Chem.*, v. 235, n. 9, p. 2595-2599, 1960.
- EALLES, J.G., MacLATCHY, D.L. The relationship between T₃ production and energy balance in salmonids and other teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 7, p. 289-293, 1989.
- ECHEVARRÍA, G., MARTÍNEZ-BEBIÁ, M., ZAMORA, S. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118A, n. 1, p. 111-123, 1997.
- EURELL, J.A., HAENSLY, W.E. The histology and ultrastructure of the liver of Atlantic croaker *Micropogon undulatus* L. *J. Fish Biol.*, v. 21, p. 113-125, 1982.
- FARBRIDGE, K.J., FLETT, P.A., LEATHERLAND, J.F. Temporal effects of restricted diet and compensatory increased dietary intake on thyroid function, plasma growth hormone levels and tissue lipid reserves of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, v. 104, p. 157-174, 1992.
- FARBRIDGE, K.J., LEATHERLAND, J.F. Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, v. 10, p. 245-258, 1992.
- FIDEU, M.D., SOLÉR, G., RUÍZ-AMIL, M. Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 74B, p. 795-799, 1983.
- FLETCHER, D.J. Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* (L.) in relation to season, stress, glucose loads and nutritional state. *J. Fish Biol.*, v. 25, p. 629-648, 1984.
- FOSTER, D.G., MOON, T.W. Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*): A study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol. Zool.*, Chicago, v. 64, n. 1, p. 259-275, 1991.
- GARCÍA DE FRUTOS, P., BONAMUSA, L., BAANANTE, I.V. Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Com. Biochem. Physiol.*, v. 98A, n. 2, p. 329-331, 1991.
- GEYER, H.J., NEL, M.M., SWANEPOEL, J.H. Histology and ultrastructure of the hepatopancreas of the tigerfish, *Hydrocynus forskahlii*. *J. Morphol.*, v. 227, p. 93-100, 1996.

- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p. 751-766, 1949.
- HAMPTON, J.A., McCUSKEY, P.A., McCUSKEY, R.S., HINTON, D.E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Rec.*, v. 213, p. 166-175, 1985.
- HEPHER, B. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988, 387 p.
- HIGUERA, M. de la, CARDENAS, P. Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-¹⁴C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 81A, p. 391-395, 1985.
- HIMICK, B.A., HIGGS, D.A., EALES, J.G. The acute effects of alteration in the dietary concentrations of carbohydrate, protein, and lipid on plasma T₄, T₃, and glucose levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 82, p. 451-458, 1991.
- HINTON, D.E., SNIPES, R.L., KENDALL, M.W. Morphology and enzyme histochemistry in the liver of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, v. 29, p. 531-534, 1972.
- HUNG, S.S.O., LIU, W., LI, H., STOREBAKKEN, T., CUI, Y. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, v. 151, p. 357-363, 1997.
- INCE, B.W., THORPE, A. The effects of starvation and force-feeding on the metabolism of the northern pike, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.*, v. 8, p. 79-88, 1976.
- INGRAM, P. Uridine diphosphate glucose-glycogen glucosyl transferase from trout liver. *Int. J. Biochem.*, v. 1, p. 263-272, 1970.
- I.U.B. (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY). Nomenclature Committee. Enzyme Nomenclature. New York: Academic Press, 1978. 606 p.
- JANKOWSKY, D., HOTOPP, W., SEIBERT, H. Influence thermal acclimation on glucose production and ketogenesis in isolated eel hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 246, p. R471-R478, 1984.
- JAVED, M.H., YOUSUF, F.A., HUSSAIN, A.N., ISHAQ, M., WAQAR, M.A. Purification and properties of lactate dehydrogenase from liver of *Uromastix hardwickii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 111B, n. 1, p. 27-34, 1995.

- JEZIERSKA, B., HAZEL, J.R., GERKING, S.D. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. *J. Fish Biol.*, v. 21. p. 681-692, 1982.
- JOBLING, M., JØRGENSEN, E.H., SIIKAVUOPIO, S.I. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.*, v. 43, p. 409-419, 1993.
- JÜRSS, K., BITTORF, Th. VÖKLER, Th, WACKE, R. Effects of temperature, food deprivation and salinity on growth, RNA/DNA ratio and certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 87B, n. 2, p. 241-253, 1987.
- KAKIZAWA, S., KANEKO, T., HASEGAWA, S., HIRANO, T. Effects of feeding, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 98, p. 137-146, 1995.
- KAMRA, S.K. Effect of starvation and refeeding on some liver and blood constituents of atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Fish. Res. B. Can.*, v. 23, p. 975-982, 1966.
- KENDALL, M.W, HAWKINS, W.E. Hepatic morphology and acid phosphatase localization in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, v. 32, p. 1459-1464, 1975.
- KIM, M.K., LOVELL, R.T. Effect of overwinter feeding regimen on body weight, body composition and resistance to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, v. 134, p. 237-246, 1995a.
- KIM, M.K., LOVELL, R.T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture*, v. 135, p. 285-293, 1995b.
- KING, E.J., GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. *J. Chem. Pathol.*, v. 1. p. 30-33, 1947.
- LARSSON, A., LEWANDER, K. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 44A, p. 367-374, 1973.
- LEATHERLAND, J.F. Effect of a commercial trout diet on liver ultrastructure of fed and fasted yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. *J. Fish Biol.*, v. 21, p. 311-319, 1982.

- LEWIS, T.L., EPPLE, A. Effect of fasting pacreatectomy and hypophysectomy in the yellow eel, *Anguilla rostrata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 55, p. 182-194, 1984.
- LIN, J.-H., SHIAU, S.-Y. Hepatic enzyme adaptation to different dietary carbohydrates in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 14, n. 2, p. 165-170, 1995.
- LOVE, R.M. *The chemical biology of fishes*. Vol. 1. London: Academic Press, 1970. 547 p.
- LOVE, R.M. *The chemical biology of fishes*. Vol. 2. London: Academic Press, 1980. p. 133-229.
- MACHADO, C.R., GAROFALO, M.A.R., ROSELINO, J.E.S., KETTELHUT, I.C., MIGLIORINI, R.H. Effects os starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 71, p. 429-437, 1988.
- MACHADO, C.R., GAROFALO, M.A.R., ROSELINO, J.E.S., KETTELHUT, I.C., MIGLIORINI, R.H. Effect of fasting on glucose turnover in a carnivorous fish (*Hoplias sp*). *Am. J. Physiol.*, v. 256, p. R612-R615, 1989.
- MAYES, P.A. Metabolismo do glicogênio. In: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. *Harper: bioquímica*. 6^a ed. Atheneu Editora: São Paulo, p.170-177. 1990.
- McCLELLAND, G., ZWINGELSTEIN, G., WEBER, J.-M., BRICHON, G. Lipid composition an plasma in two mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophrys auratus*) and the european seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 52, p. 161-170, 1995.
- MEHNER, T., WIESER, W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *J. Fish. Biol.*, v. 45, p. 325-333, 1994.
- MELLO DE OLIVEIRA, J.A. Histoquímica das enzimas do metabolismo do glicogênio em biópsias hepáticas. In: CONGRESSO DA SOCIDADE BRASILEIRA DE PATOLOGISTAS, 7, 1977, Campinas. *Anais...* Campinas, 1977, p. 17-22.
- MELLO DE OLIVEIRA, J.A. Histoenzimologia hepática na tesaurismose glicogênica. *Rev. Goiana Med.*, v. 32, p. 27-53, 1986.
- MÉNDEZ, G., WIESER, W. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Env. Biol. Fishes*, v. 36, p. 73-81, 1993.

- MINASSIAN, C., DANIELE, N., BORDET, J.-C., ZITOUN, C., MITHIEUX, G. Liver glucose-6 phosphatase activity is inhibited by refeeding in rats. *J. Nutr.*, v. 125, p. 2727-2732, 1995.
- MOMMSEN, T.P., FRENCH, C.J., HOCHACHKA, P.W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.*, v. 56, p. 1785-1799, 1980.
- MOMMSEN, T.P., SUAREZ, R.K. Control of gluconeogenesis in rainbow trout hepatocytes: role of pyruvate branchpoint and phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. *Molec. Physiol.*, v. 6, p. 9-18, 1984.
- MOON, T.W. Metabolic reserves and enzyme activities with food deprivation in immature american eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). *Can. J. Zool.*, v. 61, p. 802-811, 1983.
- MOON, T.W. Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.*, v. 66, p. 1059-1068, 1988.
- MOON, T.W., JOHNSTON, I.A. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol.*, v. 136, p. 31-38, 1980.
- MOON, T.W., WALSH, P.J., MOMMSEN, T.P. Fish hepatocytes: A model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 42, p. 1772-1782, 1985.
- MOON, T.W., FOSTER, G.D., PLISETSKAYA, E.M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. *Can. J. Zool.*, v. 67, p. 2189-2193, 1989.
- MORATA, P., VARGAS, A.M., SÁNCHEZ-MEDINA, F., GARCIA, M., CARDENETE, G., ZAMORA, S. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 71B, p. 65-70, 1982a.
- MORATA, P., FAUS, M.J., PEREZ-PALOMO, M., SÁNCHEZ-MEDINA, F. Effect of stress on liver and muscle glycogen phosphorylase in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 72B, p. 421-425, 1982b.
- MORTENSEN, A., DAMSGÅRD, B. Compensatory growth and weight segregation following light and temperature manipulation of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, v. 114, p. 261-272, 1993.

- NAGAI, M., IKEDA, S. Carbohydrate metabolism in fish. I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose levels and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, v. 37, p. 404-409, 1971.
- NAGAYAMA, F., OHSHIMA, H., UEMEZAWA, K., KAIHO, M. Effect of starvation on the activities of glucose-6-phosphate metabolizing enzymes in fish. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, v. 38, n. 6, p. 595-598, 1972.
- NAVARRO, I., GUTIÉRREZ, J. PLANAS, J. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of year. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 102A, n. 2, p. 401-407, 1992.
- NEWSHOLME, E.A, ZAMMIT, V.A., CRABTREE, B. The role of glucose and glycogen as fuels for muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 6, p. 512-520, 1978.
- NOVIKOFF, M.J. Use of ferrocyanide reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 51, p. 146, 1971.
- OLIVEREAU, M., OLIVEREAU, J.M. Long-term starvation in the European eel: effects and responses of pituitary growth hormone-(GH) and somatolactin-(SL) secreting cells. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 17, p. 261-269, 1997.
- OTTOLENGHI, C., PUVIANI, A.C., GAVIOLI, M.E., BRIGHENTI, L. Effects of insulin on glycogen metabolism in isolated and perfused catfish liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 80A, p.135-138, 1985.
- OTTOLENGHI, C. PUVIANI, A.C., RICCI, D., BRIGHENTI, L., MORSIANI, E. The effect of high temperature on blood glucose level in two teleost fish (*Ictalurus melas* and *Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 111A, n. 2, p. 229-235, 1995.
- PASTOUREAUD, A. Influence of starvation at low temperatures on utilization of energy reserves, appetite recovery and growth character in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v. 99, p. 167-178, 1991.
- PAUL, A.J., PAUL, J.M., SMITH, R.L. Compensatory growth in Alaska yellowfin sole, *Pleuronectes asper*, following food deprivation. *J. Fish Biol.*, v. 46, p. 442-448, 1995.
- PLISETSKAYA, E.M. Fatty acid levels in blood of cyclostomes and fish. *Env. Biol. Fishes*, Ithaca, v. 5, p. 273-290, 1980.

- QUINTON, J.C., BLAKE, R.W. The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.*, v. 37, p. 33-41, 1990.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., GODINHO, H.M. Características do plasma sanguíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (= *Colossoma mitrei* BERG, 1895) em condições experimentais de criação. *B. Inst. Pesca*, v. 15, n. 12, p. 169-177, 1988.
- REINITZ, G. Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v. 35, p. 19-27, 1983.
- REINITZ, G.L., ORME, L.E., LEMM, C.A., HITZEL, F.N. Influence of varying lipid concentrations with two protein concentrations in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, v. 107, p. 751-754, 1978.
- REVEL, J.P. Electron microscopy of glycogen. *Histochem. Soc. Symp. Appl. Cytochem. Electron Microsc.*, v. 8, p. 104-113, 1963.
- RIBELLES, A., CARRASCO, M.C., ROSETY, M., ALDANA, M. Morphological and histochemical changes in the liver and pancreas of gilthead, *Sparus auratus* L., induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate. *Histol. Histopathol.*, v. 10, p. 781-787, 1995.
- ROBERTSON, J.C., BRADLEY, T.M. Liver ultrastructure of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Morphol.*, v. 211, p. 41-54, 1992.
- RUDERMAN, N.B. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Ann. Rev. Med.*, v. 26, p. 245-258, 1975.
- RUSSELL, N.R., WOOTTON, R.J. Appetite and growth compensatory in the european minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction. *Env. Biol. Fishes*, v. 34, p. 277-285, 1992.
- SCARPELLI, D.G., HESS, R., PEARSE, A.G.E. The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaforase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 4, p. 747-760, 1958.
- SASSE, D. Dynamics of liver glycogen. The topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. *Histochemistry*, v. 45, p. 237-254, 1975.

- SCHÄR, M., MALY, I.P., SASSE, D., Histochemical studies on metabolic zonation of the liver in the trout (*Salmo gairdneri*). *Histochemistry*, v. 83, p. 147-151, 1985.
- SCOTT-THOMAS, D.A.F., BALLANTYNE, J.S., LEATHERLAND, J.F. Interactive effects of high stocking density and triiodothyronine-administration on aspects of the *in vivo* intermediary metabolism and *in vitro* hepatic response to catecholamine and pancreatic hormone stimulation in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Exp. Zool.*, v. 263, p. 68-82, 1992.
- SEGNER, H., BRAUNBECK, T. Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 5, n. 2, p. 79-97, 1988.
- _____ Adaptive changes of liver composition and structure in golden ide during winter acclimatization. *J. Exp. Zool.*, v. 255, p. 171-185, 1990.
- SHERIDAN, M.A., MOMMSEN, T.P. Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 81, p. 473-483, 1991.
- SHIKATA, T., MASUMOTO, T., SHIMENO, S. Metabolic response to restricted of a high protein diet in common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 59, n. 9, p. 1587-1591, 1993.
- SHIMENO, S., KHEYALI, D., TAKEDA, M. Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 56, n. 1, p. 35-41, 1990.
- SKILBREI, O.T. Compensatory sea growth of male Atlantic salmon, *Salmo salar* L., which previously mature as parr. *J. Fish Biol.*, v. 37, p. 425-435, 1990.
- SMIT, G.L., HATTINGH, J., FERREIRA, J.T. The physiological response of blood during thermal adaptation in three freshwater fish species. *J. Fish Biol.*, v. 19, p. 147-160, 1981.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics*. 2 ed., New York: McGraw Hill, 1980. 633 p.
- SOENGAS, J.L., STRONG, E.F., FUENTES, J., VEIRA, J.A.R., ANDRÉS, M.D. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 15, n. 6, p. 491-511, 1996.

- SOUZA, V.L. *Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no metabolismo de pacus juvenis (Piaractus mesopotamicus)*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 1994. 163 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).
- SOUZA, V.L., URBINATI, E.C., NAKAGHI, L.S.O., OLIVEIRA, E.G., VASQUES, L.H. Estudo morfométrico em hepatócitos de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à restrição alimentar. In: SEMANA DE HISTOLOGIA DE PEIXES, 2, 1995, Jaboticabal. *Resumos...* Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1995. p. 116.
- SOUZA, V.L., URBINATI, E.C., OLIVEIRA, E.G. Restrição alimentar, realimentação e as alterações no desenvolvimento de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Bol. Inst. Pesca*, v. 24, n. único, 1997 (no prelo).
- SOUZA, V.L., URBINATI, E.C., OLIVEIRA, E.G., ROVIERO, D.P. Alterações na composição corporal de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetidos à restrição alimentar e realimentação. *Rev. Ars Vet.*, v. 14, n. 3, 1998 (no prelo).
- STIMPSON, J.H. Comparative aspects of the control of glycogen utilization in vertebrate liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 15, p. 187-197, 1965.
- STIRLING, H.P. effects of experimental feeding and starvation on the proximate composition of the european bass *Dicentrarchus labrax*. *Mar. Biol.*, v. 34, p. 85-91, 1976.
- STORCH, V., JUARIO, J.V. The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *J. Fish Biol.*, v. 23, p. 95-103, 1983.
- STORCH, V., STAHLIN, W., JUARIO, J.V. Effect of different diets on the ultrastructure of hepatocytes of *Chanos chanos* fry (Chanidae: Teleostei): an electron microscopic and morphometric analysis. *Mar. Biol.*, v. 74, p. 101-104, 1983.
- SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.*, v. 65, 1869-1882, 1987.
- SUMPTER, J.P. Control of growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 100, p. 299-320, 1992.
- SUMPTER, J.P., Le BAIL, P.Y., PICKERING, A.D., POTTINGER, T.G., CARRAGHER, J.F. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 83, p. 94-102, 1991.

- SUNDBY, A., HEMRE, G.-I., BORREBAEK, B., CHRISTOPHERSEN, B., BLOM, A.K. Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 100B, n. 3, p. 467-470, 1991.
- THEILACKER, G.H. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Fish. Bull.*, v. 76, n. 2, p. 403-413, 1978.
- TOKUMARU, M., FERRI, A.G., Histochemistry of the pigments found in the liver, spleen and kidney of the fresh-water fish. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 30, n. 2, p. 163-171, 1970.
- TZENG, W.-N., YU, S.-Y. Effects of starvation on the formation of daily growth increments in the otoliths of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), larvae. *J. Fish Biol.*, v. 40, p. 39-48, 1992.
- UMINO, T., NAKAGAWA, H., TAKABA, M. Lipid accumulation and starvation tolerance in young red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 57, n. 10, p. 1897-1902, 1991.
- Van VUREN, J.H.J., HATTINGH, J. A seasonal study of the haematology of wild freshwater fish. *J. Fish Biol.*, London, v. 13, p. 305-313, 1978.
- VERNIER, J.-M., SIRE, M.-F. Evolution of the glycogen content and of glucose-6-phosphatase activity in the liver of *Salmo gairdneri* during development. *Tissue & Cell*, v. 8, n. 3, p. 531-546, 1976.
- VASQUES, L.H. *Histologia da piracanjuba, Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae): tecidos fundamentais*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 1997. 79 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).
- VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 49, p. 2260-2266, 1992.
- VIJAYAN, M.M., MAULE, A.G., SCHRECK, C.B., MOON, T.W. Hormonal control of hepatic glycogen metabolism in food-deprived, continuously swimming coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 1676-1682, 1993.
- WALSH, P.J., FOSTER, G.D., MOON, T.W. The effects of temperature on metabolism of the american eel *Anguilla rostrata* (LeSUEUR): compensation in the summer as torpor in the winter. *Physiol. Zool.*, Chicago, v. 56, n. 4, p. 532-540, 1983.

- WATANABE, Y. Histological changes in the liver and intestine of freshwater goby larvae during short-term starvation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, v. 51, n. 5, p. 707-709, 1985.
- WEATHERLEY, A.H., GILL, H.S. Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, v. 18, p. 195-208, 1981.
- _____ *The biology of fish growth*. London: Academic Press, 1987. 443 p.
- WEBSTER, C.D., TIDWELL, J.H., GOODGAME, L.S., YANCEY, D.H. Effects of fasting on fatty acid composition of muscle, liver, and abdominal fat in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 25, n. 1, p. 126-134, 1994.
- WEGMANN, R., VERNE, J. Etude histochimique des enzymes intervenant dans le métabolisme des polyccharides. *Ann. Histochem.*, v. 3, p. 223-232, 1958.
- WEGMANN R., TORDET-CARIDROIT, C. Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase by specific inhibition and activation. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 8, p. 348-349, 1960.
- WEGMANN, R., GERZELI, G. La glucose-6-phosphate deshydrogénase et ses corrélations avec des substrats voisins du glucose-6-phosphate. Rôle de l'hexokinase. *Ann. Histochem.*, v. 6, p. 111-124, 1961.
- WEGMANN, R., SOTELO, C. Aspects cytoenzymologiques du métabolisme des glucides de la cellule de Purkinje. *Ann. Histochem.*, v. 7, n. 4, p. 65-81, 1962.
- WELSCH, U.N., STORCH, V.N. Enzyme histochemical and ultrastructural observations on the liver of teleost fishes. *Arch. histol. Jap.*, v. 36, n. 1, p. 21-37, 1973.
- WIESER, W., KRUMSCHNABEL, G., OJWANG-OKWOR, J.P. The energetics of starvation and growth after refeeding in juveniles of three cyprinid species. *Env. Biol. Fishes*, v. 33, p. 63-71, 1992.
- WOO, N.Y.S. Metabolic and osmoregulatory changes during temperature acclimatation in the red sea bream, *Chrysophrys major*. Implications for its culture in the subtropics. *Aquaculture*, v. 87, p. 197-208, 1990.
- YANNI, M. Effect of starvation on content of water and lipids tissue of *Clarias lazera*. *Z. vergl. Physiol.*, v. 45, p. 390-395, 1962.

- YOUSSON, J.H., PLISETSKAYA, E.M., LEATHERLAND, J.F. Concentrations of insulin and thyroid hormones in the serum of landlocked sea lampreys (*Petromyzon marinus*) of three larval year classes, in larvae exposed to two temperature regimes, and in individuals during and after metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 94, p. 294-304, 1994.
- ZAMAL, H., OLLEVIER, F. Effect to feeding and lack to food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile catfish. *J. Fish Biol.*, v. 46, p. 404-414, 1995.
- ZAMMIT, V.A., NEWSHOLME, E.A. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. *Biochem. J.*, v. 184, p. 313-322, 1979.
- ZUIM, S.M.F., CROCCO, T., MACARI, M. Efeito do jejum sobre o peso corporal, glicose sanguínea, ácidos graxos livres e eletrólitos plasmáticos em *Cyprinus carpio*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3, 1984, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFSCar, 1984. p. 595-605.

10. APÊNDICE

Tabela A.1. Valores individuais obtidos para peso corporal (g).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	300,00	200,00	300,00	235,00	378,00	450,00	400,00	252,00	225,00	210,00	240,00	175,00	250,00	400,00
2	225,00	200,00	260,00	237,00	345,00	400,00	450,00	200,00	250,00	250,00	250,00	180,00	250,00	425,00
3	250,00	210,00	225,00	240,00	335,00	300,00	450,00	270,00	200,00	190,00	230,00	200,00	250,00	350,00
4	250,00	210,00	280,00	300,00	385,00	350,00	375,00	280,00	200,00	200,00	245,00	190,00	250,00	300,00
5	200,00	255,00	260,00	275,00	260,00	400,00	400,00	225,00	250,00	250,00	215,00	195,00	200,00	325,00
6	250,00	260,00	210,00	275,00	415,00	300,00	400,00	264,00	230,00	250,00	220,00	205,00	225,00	350,00
7	250,00	200,00	200,00	245,00	325,00	290,00	525,00	210,00	250,00	250,00	235,00	220,00	250,00	325,00
Média	246,43	219,29	247,86	258,14	349,00	355,71	428,57	243,00	229,29	228,57	233,57	195,00	239,29	353,57

Tabela A.2. Valores individuais obtidos para comprimento padrão (cm).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	20,00	18,00	20,50	19,30	22,00	22,30	22,50	19,00	18,50	18,80	18,30	18,00	19,00	22,00
2	18,50	17,50	18,70	18,00	21,60	22,00	23,00	18,00	18,60	20,00	20,00	18,50	19,00	22,50
3	19,50	17,70	19,00	18,70	21,20	20,50	23,50	19,50	17,50	17,40	19,00	19,20	19,50	21,00
4	19,70	18,70	20,00	20,50	22,30	21,20	21,00	19,50	17,50	18,30	19,20	18,00	18,80	20,00
5	17,50	20,00	19,50	20,00	20,00	22,20	22,00	18,50	19,00	19,50	18,40	18,00	18,00	21,00
6	18,50	19,50	18,30	19,60	22,50	20,60	22,00	19,50	19,00	20,00	17,80	19,00	18,50	21,50
7	19,30	18,00	18,00	19,20	22,00	20,00	24,20	18,20	19,00	19,50	19,50	19,60	19,00	20,50
Média	19,00	18,49	19,14	19,33	21,66	21,26	22,60	18,89	18,44	19,07	18,89	18,61	18,83	21,21

Tabela A.3. Valores individuais obtidos para IHS (%).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	0,97	1,82	1,20	1,66	1,29	1,19	1,21	1,71	1,63	0,84	0,64	0,65	0,85	1,46
2	1,48	1,21	1,38	1,40	1,41	1,00	1,26	1,23	1,22	0,88	0,70	0,68	0,90	1,53
3	1,47	1,32	1,13	1,33	1,54	1,08	1,00	1,26	1,29	0,97	0,78	0,67	0,81	1,43
4	1,16	1,59	1,54	1,35	1,29	1,06	0,99	1,16	1,07	1,03	0,66	0,75	0,90	1,48
5	1,39	1,30	1,24	1,47	1,21	1,00	1,01	0,93	1,77	0,99	0,73	0,79	0,73	1,35
6	1,26	1,40	1,24	1,64	1,55	1,10	1,03	1,48	1,36	0,76	0,67	0,69	0,85	1,22
7	1,04	1,41	1,14	1,03	1,23	1,05	1,26	1,29	1,31	0,62	0,68	0,55	0,82	1,56
Média	1,25	1,43	1,27	1,41	1,36	1,07	1,11	1,29	1,38	0,87	0,69	0,68	0,84	1,43

Tabela A.4. Valores individuais obtidos para IGVS (%)

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	3,09	3,75	3,23	4,18	3,93	3,67	3,28	1,87	3,16	3,16	2,77	2,98	2,48	3,77
2	2,14	2,65	3,15	4,16	3,43	4,08	4,92	3,24	3,52	3,43	3,17	3,56	2,30	2,27
3	4,56	3,84	2,65	3,28	4,48	4,33	3,93	3,59	2,04	2,84	3,29	2,40	1,73	3,51
4	3,64	2,86	3,68	3,64	4,18	3,16	3,30	3,40	2,68	4,25	4,71	1,65	2,07	3,34
5	4,84	2,92	3,53	3,38	4,12	2,97	4,60	2,84	3,35	4,34	3,87	2,22	2,48	3,30
6	3,75	3,95	3,10	4,48	3,56	3,17	4,38	4,13	3,46	3,15	4,46	2,18	2,05	3,22
7	2,61	3,85	3,42	3,84	4,14	4,02	4,40	2,69	4,83	4,26	4,23	3,18	2,05	3,46
Média	3,51	3,40	3,25	3,85	3,98	3,63	4,11	3,11	3,29	3,63	3,78	2,59	2,16	3,27

Tabela A.5. Valores individuais obtidos para umidade da carcaça (%)

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	66,58	73,05	67,47	69,94	64,86	61,49	67,72	67,71	67,33	71,83	72,60	73,31	70,41	67,65
2	69,49	70,41	68,08	71,29	66,62	67,84	66,01	70,71	65,18	67,01	69,08	72,09	70,21	66,93
3	66,42	67,44	67,82	62,74	65,62	66,72	65,74	67,05	71,86	69,04	69,38	75,64	73,61	68,01
4	66,67	68,97	65,53	67,56	63,42	66,20	66,54	66,78	69,01	68,52	69,60	74,71	71,41	69,99
5	66,60	66,62	68,23	68,26	66,29	65,76	63,69	68,24	68,47	66,64	69,98	72,88	69,28	64,64
6	69,31	68,24	67,75	66,38	63,19	63,14	63,97	63,29	67,28	68,80	69,69	70,07	71,74	66,24
7	69,34	68,60	70,29	70,35	70,41	66,68	61,49	69,45	65,87	65,92	69,76	69,92	72,86	68,15
Média	67,77	69,05	67,88	68,07	65,77	65,40	65,02	67,60	67,86	68,25	70,01	72,66	71,36	67,37

Tabela A.6. Valores individuais obtidos para proteína bruta da carcaça (% na base úmida).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	15,28	13,36	14,82	15,57	14,33	14,62	16,03	13,99	14,42	14,00	11,61	16,90	13,92	14,22
2	13,19	13,35	14,88	12,99	15,63	14,69	13,32	13,72	13,33	14,94	15,49	14,63	14,62	15,17
3	13,47	14,02	15,75	17,44	14,61	15,09	14,83	16,45	14,39	11,46	15,01	14,11	14,78	15,41
4	15,44	14,31	14,78	16,31	16,04	14,36	17,19	14,45	13,79	13,69	14,32	13,88	13,90	16,99
5	13,85	14,24	14,56	14,70	13,97	14,53	15,09	13,78	16,06	14,25	14,07	16,49	15,05	14,85
6	13,81	15,12	14,48	14,32	12,90	18,51	15,60	17,08	13,87	15,14	14,18	13,89	14,76	15,31
7	14,53	15,65	13,01	17,06	15,48	15,46	14,22	15,72	14,63	14,27	14,92	14,84	14,70	14,44
Média	14,22	14,29	14,61	15,48	14,71	15,32	15,18	15,03	14,35	13,96	14,23	14,96	14,53	15,20

Tabela A.7. Valores individuais obtidos para extrato etéreo da carcaça (% na base úmida).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	16,35	12,43	15,85	13,22	19,21	21,93	14,55	16,56	16,70	12,71	14,24	8,17	14,10	16,57
2	15,93	15,00	15,31	14,28	15,75	15,81	19,41	13,94	19,73	16,25	13,79	11,57	13,13	16,15
3	18,48	16,95	15,11	18,07	18,17	16,50	17,85	15,19	12,33	17,91	13,94	9,33	9,75	15,03
4	16,54	15,26	17,87	14,42	19,17	17,29	14,73	17,03	15,15	16,30	14,33	9,90	12,98	11,59
5	18,13	17,47	15,69	15,46	18,13	17,85	19,57	16,16	13,49	17,27	14,09	9,21	13,59	18,90
6	15,61	14,93	16,28	17,62	21,97	16,49	18,65	17,99	17,25	14,69	14,55	14,05	11,65	17,14
7	14,44	13,97	14,71	11,60	13,01	16,04	22,49	13,26	17,75	18,34	13,56	13,17	11,34	15,89
Média	16,50	15,14	15,83	14,95	17,91	17,41	18,18	15,73	16,06	16,21	14,07	10,77	12,36	15,89

Tabela A.8. Valores individuais obtidos para matéria mineral ou cinzas na carcaça (% na base úmida).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1,79	1,17	1,86	1,27	1,60	1,96	1,70	1,74	1,55	1,45	1,54	1,61	1,57	1,56
2	1,39	1,24	1,74	1,44	2,00	1,67	1,26	1,63	1,76	1,80	1,64	1,72	2,04	1,75
3	1,63	1,59	1,32	1,75	1,60	1,69	1,58	1,31	1,42	1,60	1,67	0,92	1,86	1,56
4	1,34	1,46	1,82	1,70	1,37	2,15	1,54	1,74	2,05	1,49	1,75	1,52	1,71	1,43
5	1,42	1,66	1,52	1,59	1,61	1,86	1,65	1,82	1,98	1,83	1,85	1,43	2,07	1,62
6	1,27	1,71	1,49	1,68	1,93	1,85	1,78	1,64	1,60	1,37	1,57	1,98	1,85	1,31
7	1,65	1,78	1,99	1,00	1,10	1,82	1,80	1,57	1,75	1,47	1,76	2,07	1,10	1,53
Média	1,50	1,51	1,68	1,49	1,60	1,86	1,61	1,63	1,73	1,57	1,68	1,61	1,74	1,54

Tabela A.9. Valores individuais obtidos para glicogênio hepático (%).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	4,19	4,42	5,15	2,58	2,96	2,85	2,00	6,81	5,39	3,12	-	-	2,30	2,19
2	4,22	3,09	8,39	2,52	4,86	3,92	1,97	5,72	7,95	2,14	3,57	2,48	2,70	1,76
3	4,37	4,11	5,38	4,30	1,73	4,78	2,68	6,50	7,99	3,28	3,78	2,69	1,30	0,83
4	4,37	3,90	6,73	3,19	3,04	4,32	1,93	5,44	5,97	3,26	2,55	-	2,55	1,01
5	4,85	4,38	6,16	4,24	4,06	4,31	1,08	4,22	-	3,29	2,20	4,74	2,92	1,97
6	3,44	4,81	4,00	2,58	-	5,47	2,32	7,40	6,10	2,74	2,53	1,90	2,01	2,42
7	3,80	5,02	4,20	2,57	3,98	3,99	0,85	5,23	8,66	1,46	1,69	1,98	2,75	1,00
Média	4,18	4,25	5,71	3,14	3,45	4,23	1,83	5,90	7,01	2,75	2,72	2,75	2,36	1,60

- Parcela perdida.

Tabela A.10. Valores individuais obtidos para glicose sanguínea (mg/100 ml).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	62,20	64,55	59,17	43,31	57,00	64,42	58,29	64,88	75,59	72,07	119,01	63,74	54,30	54,75
2	65,22	65,22	97,85	77,36	70,15	63,41	61,84	53,51	77,59	55,54	84,63	51,26	61,38	43,48
3	115,38	100,00	59,83	66,12	78,25	66,44	60,55	55,52	63,55	57,85	68,76	71,50	52,95	56,04
4	71,57	93,65	65,12	75,37	56,32	58,01	64,09	68,90	73,58	72,73	78,68	111,30	63,07	53,78
5	94,98	123,75	95,87	69,42	62,73	60,71	65,70	74,25	80,27	66,12	83,31	65,09	52,28	63,45
6	77,59	85,62	95,21	74,71	62,73	66,78	79,23	66,56	74,25	46,28	76,03	82,97	42,83	59,26
70	76,92	95,65	76,69	76,03	59,70	62,39	68,28	82,94	87,63	41,32	83,31	56,66	44,52	59,26
Média	80,55	89,78	78,53	68,90	63,84	63,16	65,42	66,65	76,06	58,84	84,82	71,79	53,05	55,72

Tabela A.11. Valores individuais obtidos para proteína total plasmática (mg/ml).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	3,82	4,97	3,99	7,45	3,92	5,10	4,11	3,00	3,82	3,33	4,08	3,10	3,93	3,43
2	4,61	4,58	4,95	5,24	4,73	4,70	5,08	3,84	4,29	3,57	3,98	3,95	4,40	3,67
3	4,30	4,08	3,98	6,31	4,42	4,19	4,09	4,06	3,99	3,43	3,55	4,18	4,11	3,53
4	3,81	4,63	4,15	5,33	3,92	4,75	4,26	3,58	3,31	3,50	4,15	3,69	3,41	3,60
5	4,08	5,55	4,27	6,03	4,19	5,69	4,39	3,64	4,29	3,17	4,35	3,74	4,40	3,27
6	4,76	4,94	3,96	6,72	4,89	5,07	4,07	3,99	4,11	4,27	3,72	4,11	4,23	4,39
7	3,89	3,82	4,32	6,13	4,00	3,93	4,44	3,98	3,50	4,92	4,25	4,09	3,60	5,05
Média	4,18	4,65	4,23	6,17	4,29	4,77	4,35	3,73	3,90	3,74	4,01	3,84	4,01	3,85

Tabela A.12. Valores individuais obtidos para lipídio total do fígado (%).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	5,81	5,24	7,40	3,63	6,33	4,66	7,81	3,37	4,59	4,76	5,81	5,88	3,78	5,09
2	7,16	4,68	5,83	5,53	4,46	4,23	5,01	3,79	5,34	5,22	3,55	2,25	4,58	4,02
3	6,25	3,12	4,54	4,71	7,65	4,11	4,80	3,44	2,85	4,16	3,39	4,50	5,03	3,02
4	6,71	6,30	6,83	5,52	4,97	3,56	5,73	7,11	6,43	4,49	5,28	4,54	3,53	5,28
5	7,50	5,07	4,00	3,69	3,96	4,26	7,45	4,78	4,03	4,88	3,27	3,04	1,73	4,79
6	5,82	6,06	5,24	8,86	4,88	4,81	5,46	4,22	6,47	4,40	5,24	3,34	3,39	3,43
7	6,89	6,12	4,67	5,80	4,90	3,74	4,36	3,96	6,06	6,70	4,62	3,12	3,88	6,93
Média	6,59	5,23	5,50	5,39	5,31	4,19	5,80	4,38	5,11	4,94	4,45	3,81	3,70	4,65

Tabela A.13. Valores individuais obtidos para T₃ (ng/ml).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1,13	0,70	1,19	1,31	3,25	2,27	2,94	0,75	0,72	0,83	-	1,17	1,89	3,10
2	1,03	1,15	1,14	1,41	3,03	2,63	3,53	0,79	0,89	1,19	0,75	1,54	1,85	3,20
3	0,80	-	2,19	1,46	2,01	1,23	2,95	0,79	0,74	0,79	0,89	-	1,36	1,75
4	1,13	0,87	2,36	1,35	2,17	1,82	2,16	0,35	0,81	1,20	0,73	-	1,55	3,35
5	1,53	1,61	1,70	1,14	1,32	1,67	3,07	0,81	0,56	1,25	0,78	1,51	1,29	1,89
6	1,00	2,46	2,30	1,15	3,14	1,65	3,98	1,06	0,95	1,05	1,05	1,58	1,51	2,31
7	1,13	2,16	-	1,53	1,60	1,75	3,57	0,66	0,72	1,52	0,97	1,90	1,48	2,26
Média	1,11	1,49	1,81	1,34	2,36	1,86	3,17	0,74	0,77	1,12	0,86	1,54	1,56	2,55

- Parcela perdida

Tabela A.14. Valores individuais obtidos para área do citoplasma dos hepatócitos (μm^2).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	133,95	168,39	166,80	137,98	138,53	146,17	117,06	132,80	158,84	127,66	88,92	67,94	126,18	153,50
2	126,60	143,85	160,66	142,33	163,15	154,61	150,56	137,62	152,07	117,07	88,52	80,86	108,37	131,26
3	129,36	189,10	153,46	152,41	119,22	118,56	163,21	154,85	143,30	155,47	135,88	65,54	101,89	148,90
4	175,66	153,09	185,03	168,40	135,61	133,41	133,66	147,77	148,63	142,19	88,11	53,74	109,75	125,46
5	129,48	142,38	150,89	152,65	140,15	137,63	127,62	147,41	195,61	153,98	91,42	97,97	124,46	155,56
6	109,62	140,15	177,24	179,24	153,33	139,07	147,69	164,35	171,46	160,28	78,35	91,18	125,38	129,47
7	131,79	173,00	161,68	131,76	131,47	133,16	121,91	142,15	148,22	145,02	103,45	79,67	104,72	145,80
Média	133,78	158,56	165,11	152,11	140,21	137,51	137,39	146,71	159,73	143,09	96,38	76,70	114,39	141,42

Tabela A.15. Valores individuais obtidos para área do núcleo dos hepatócitos (μm^2).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	13,41	12,50	13,56	12,25	13,75	11,20	11,77	12,51	12,55	10,21	9,27	8,74	10,73	12,64
2	11,52	14,82	12,60	11,63	13,15	10,96	10,82	12,15	12,27	9,63	9,93	9,04	9,11	12,09
3	12,20	15,33	11,72	12,87	10,76	9,81	12,27	12,04	12,63	11,50	13,01	8,11	8,21	11,60
4	14,20	13,94	12,69	13,38	12,20	10,82	10,68	12,56	12,06	10,35	11,11	9,74	8,92	11,41
5	12,02	12,79	11,13	10,80	11,04	10,30	10,45	12,49	13,35	11,05	10,49	12,45	10,55	11,93
6	11,14	12,19	13,00	14,10	11,58	9,69	11,44	12,05	12,44	11,81	10,33	9,94	10,19	10,64
7	13,00	13,85	10,49	11,22	9,91	9,67	10,53	12,40	11,15	11,49	10,56	9,44	8,93	12,01
Média	12,50	13,63	12,17	12,32	11,77	10,35	11,14	12,31	12,35	10,86	10,67	9,64	9,52	11,76

Tabela A.16. Valores individuais obtidos para volume do citoplasma dos hepatócitos (μm^3).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	14,26	18,17	17,68	16,66	14,91	15,81	12,78	13,99	17,02	13,46	9,37	7,89	13,41	16,48
2	14,14	16,28	16,94	15,74	19,72	16,90	15,70	14,93	16,35	12,45	9,83	8,64	11,90	13,90
3	14,60	20,41	16,18	16,35	12,58	12,62	17,53	16,13	15,27	16,21	14,91	7,64	11,14	15,92
4	19,64	16,00	22,31	17,68	15,90	14,94	14,31	15,44	16,63	15,07	9,60	5,80	11,75	13,31
5	13,73	16,36	15,99	17,92	16,92	15,41	13,87	16,17	21,63	16,53	10,01	11,36	13,31	16,36
6	11,32	15,56	19,46	19,86	16,97	14,86	15,87	17,59	17,87	17,60	8,40	10,07	13,71	15,14
7	13,92	18,37	17,12	13,89	15,10	14,01	13,05	15,62	15,97	15,47	11,50	8,93	11,21	15,31
Média	14,51	17,31	17,95	16,87	16,01	14,93	14,73	15,69	17,25	15,25	10,52	8,62	12,35	15,20

Tabela A.17. Valores individuais obtidos para volume do núcleo dos hepatócitos (μm^3).

n	Controle (A1)							Experimental (A2)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1,38	1,36	1,46	1,42	1,49	1,24	1,31	1,35	1,39	1,16	1,24	0,98	1,16	1,37
2	1,27	1,75	1,41	1,33	1,47	1,21	1,18	1,36	1,40	1,07	1,10	1,00	1,01	1,30
3	1,29	1,68	1,31	1,34	1,19	1,10	1,34	1,27	1,42	1,28	1,47	0,96	0,90	1,29
4	1,54	1,53	1,52	1,45	1,30	1,23	1,17	1,29	1,34	1,16	1,22	1,04	1,01	1,23
5	1,29	1,42	1,26	1,22	1,26	1,17	1,14	1,40	1,57	1,27	1,18	1,43	1,12	1,29
6	1,20	1,43	1,43	1,56	1,31	1,05	1,21	1,31	1,41	1,32	1,12	1,11	1,12	1,14
7	1,40	1,53	1,14	1,19	1,10	1,10	1,12	1,42	1,27	1,30	1,21	1,10	1,00	1,30
Média	1,34	1,53	1,36	1,36	1,30	1,16	1,21	1,34	1,40	1,22	1,22	1,09	1,04	1,27