

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/07/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
(CAUNESP)**

**Efeito do β -glucano dietético na dinâmica
metabólica, na resposta imunológica inata e no
desempenho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
após ciclos curtos de jejum e realimentação**

Adriana Soliris Corredor Castillo

**Jaboticabal - São Paulo
2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
(CAUNESP)**



**Efeito do β -glucano dietético na dinâmica
metabólica, na resposta imunológica inata e no
desempenho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
após ciclos curtos de jejum e realimentação**

Adriana Soliris Corredor Castillo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati

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

**Jaboticabal - São Paulo
2016**

C825e Corredor-Castillo, Adriana Soliris
Efeito do β -glucano dietético na dinâmica metabólica, na resposta imunológica inata e no desempenho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após ciclos curtos de jejum e realimentação s à trocleoplastia / Adriana Soliris Corredor-Castillo. – – Jaboticabal, 2016 x, 70 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de aqüicultura da UNESP (CAUNESP), 2016

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Sergio Fonseca Zaiden, Marco Antonio Belo de Andrade, Maria José Tavares Ranzani de Paiva, João Batista Kochenborger Fernandes.

Bibliografia

1. Pacu-restrição alimentar. 2. *Piaractus mesopotamicus*-Supressão imunológica. 3. *Aeromonas hydrophila*- β -glucano I. Título. II. Jaboticabal- Centro de aqüicultura da UNESP (CAUNESP).

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

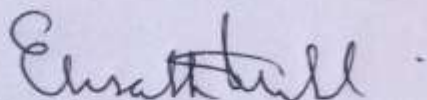
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito do Beta-glucano dietário na dinâmica metabólica e a resposta imunológica inata do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após ciclos curtos de jejum e realimentação.

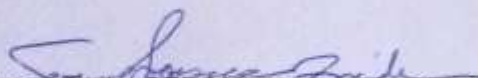
AUTORA: ADRIANA SOLIRIS CORREDOR CASTILLO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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



Prof. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



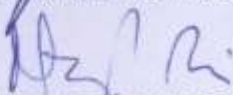
Professor Titular SÉRGIO FONSECA ZAIDEN
FUNDAÇÃO DE ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Patologia / Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO



Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura - CAUNESP



Pesquisador Científico MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA
Instituto de Pesca, IP, São Paulo-SP

Jaboticabal, 20 de julho de 2016

Sumário

AGRADECIMENTOS	i
APOIO FINANCEIRO.....	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabela	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Uso de restrição alimentar na aquicultura	2
1.2 Sistema imunológico dos peixes	3
1.3 Alimentação funcional e o uso de β -glucanos na alimentação de peixes	5
1.4 <i>Aeromonas hydrophila</i> como modelo para desafiar o sistema imunológico dos peixes	6
1.4 Modelo biológico experimental	7
2. REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO 2	14
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Animais e delineamento experimental.....	20
2.2 Amostragens e análises	21
2.3 Delineamento experimental e análise estatística	23
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Crescimento e conversão alimentar	23
3.2 Indicadores metabólicos circulantes.....	24
3.2.1 Glicose plasmática.....	24
3.2.2 Triglicerídeos plasmáticos	24
3.2.3 Ácidos graxos não esterificados plasmáticos (AGNE).....	24
3.2.4 Colesterol sérico	24
3.2.5 Proteína total sérica	25
3.3. Indicadores teciduais (metabólicos e histológicos)	25
3.3.1 Glicogênio hepático	25

3.3.2 Lipídeo total hepático.....	25
3.3.3 Lipídeo total muscular.....	25
3.3.4 Proteína muscular.....	25
3.3.5 Índices hepatossomático (IHS) e de gordura visceral somático (IGVS).....	26
3.3.6 Vilosidades intestinais e células caliciformes	26
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS.....	37
CAPITULO 3	45
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Animais e tratamentos.....	49
2.2 Amostragem e análises	50
2.3 Desafio bacteriano.....	52
2.4 Delineamento experimental e análise estatística	52
3. RESULTADOS.....	52
3.1 Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) (Figura 1)	53
3.2 Concentração de lisozima sérica (CLS) (Figura 2).....	54
3.3 Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) (Figura 3).....	55
3.4 Concentração plasmática de glicose (Figura 4)	55
3.5 Infiltração leucocitária intraepitelial (ILI) (Figura 5).....	56
3.6 Contagem diferencial de leucócitos (Tabela 1).	56
3.6.1 Linfócitos.....	56
3.6.2 Neutrófilos.....	57
3.6.3 Monócitos.....	57
3.6.4 Eosinófilos e basófilos	57
3.6.5 Células granulocíticas especiais (CGE).....	58
4. DISCUSSÃO	58
6. REFERÊNCIAS.....	70
CONCLUSÕES GERAIS	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar todos os dias da minha vida, pela maravilhosa oportunidade de cumprir meu sonho de estudar no Brasil e por colocar tantas pessoas maravilhosas no meu caminho.

A minha família, pelo amor e apoio incondicional, mesmo à distância. Tudo que tenho conseguido tem sido inspirado no seu exemplo de coragem, persistência e dedicação.

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação, carinho e amizade.

Ao Fábio Zanuzzo, ao Rafael Sabioni e à Gisele Fávero, pelo acolhimento, amizade e por fazer parte importante do meu aprendizado durante o início do meu doutorado.

Ao André, pelo carinho durante todo este tempo e pelos seus importantes ensinamentos na parte histológica.

Às minhas irmãs de convivência aqui e para sempre, Cruz Elena e Lumey, pelos momentos compartilhados, as risadas, os aprendizados e pela força para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha irmãzinha Regiane, pelo carinho incondicional, pela ajuda e apoio nesta última fase do meu doutorado e pela amizade construída desde o começo deste caminho, que desejo que dure para sempre.

À Fernanda, pela convivência neste último tempo, pelo carinho, o conselho e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes, pelos bons momentos compartilhados durante as horas de trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAPOA), pela amizade e ajuda durante as minhas coletas.

Ao meu amigo Daniel, pela sua amizade incondicional mesmo desde distância e pela sua ajuda na parte estatística.

À Veralice Cappatto, pelo acolhimento desde o primeiro dia, a amizade constante, e a colaboração nos assuntos administrativos junto com o David Oliveira Lorente, gratidão infinita.

Aos professores que fizeram parte da minha banca, Sérgio Zaiden, Marco Antonio Belo, Maria José Ranzani-Paiva, Joao Batista K. Fernandes, Dalton José Carneiro e Luiz Roberto Furlan, pelas valiosas sugestões dadas para meu trabalho.

À professora Laura Satiko Okada Nakaghi, pela disponibilização do Laboratório de Processamento de Imagem e especialmente pelo seu apoio e carinho.

Ao professor Sérgio R. Batlouni, pela disponibilização do micrótomo e disponibilização do espaço para o processamento histológico das amostras.

À Silvinha, pela ajuda nas análises das amostras de água, ao Valdecir e ao Márcio pelo valioso auxílio na obtenção dos peixes e no processamento das rações experimentais,

À Família Conrado, pelo acolhimento, apoio e carinho durante este tempo.

À Daiane, Cidinha, Thyssia, Ana Paula, Yury, Ricardo, Gustavo, Yeini, Fernando, Diana, Maria Lúcia, Valéria, Jéssica, Gimbo, Tomomi e demais pessoas que fizeram parte desta maravilhosa vivência, agradeço pelo acolhimento, o carinho e amizade.

Aos pesquisadores e professores que conheci durante meu doutorado, pelos ensinamentos e o compartilhamento de experiências profissionais e pessoais.

APOIO FINANCEIRO

À “Asociación Universitária Iberoamericana de Posgrado (AUIP)” e ao Programa Paedex da UNESP pela bolsa de doutorado.

À Biorigin pelo fornecimento do β -glucano (Macrogard[®]) e o apoio financeiro.

Só há duas maneiras de viver a vida:

**A primeira é vivê-la como se os milagres não existissem
e a segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.**

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Taxa de crescimento específico (TCE) (A) e conversão alimentar (CA) (B) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras maiúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação e letras minúsculas entre níveis de β -glucano..... 32

Figura 2. Concentrações plasmáticas de glicose (A), de triglicerídeos (B) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (C) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras maiúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação e letras minúsculas entre níveis de β -glucano..... 33

Figura 3. Concentrações de glicogênio (A) e lipídeos (B) no tecido hepático e lipídeos (C) no tecido muscular em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras maiúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação e letras minúsculas entre níveis de β -glucano..... 34

Figura 4. Altura das vilosidades intestinais (A), número de células caliciformes (B) e fotomicrografia de células caliciformes (*) na porção anterior do intestino (PAS - Alcian Blue, 100x) (C) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras maiúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação e letras minúsculas entre níveis de β -glucano..... 35

Figura 5. Fotomicrografias de células caliciformes (*) na porção anterior do intestino (PAS - Alcian Blue, 100x) em pacus submetidos a diferentes protocolos de

alimentação. Controle - alimentação diária sem (A) e com β -glucano (B), 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia sem (C) e com β -glucano (D), 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia sem (E) e com β -glucano (F).....36

Capítulo 3

Figura 1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas, inoculados com *Aeromonas hydrophila* e amostrados antes e 3h e 24h depois. Letras maiúsculas indicam diferenças nos diferentes tempos de amostragem, no mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano; letras minúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação no mesmo nível de glucano e mesmo tempo de amostragem; asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano no mesmo protocolo e tempo de amostragem; setas indicam diferença entre o controle PBS e o controle desafiado com *A. hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem.....63

Figura 2. Concentração de lisozima sérica (CLS) de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas, inoculados com *Aeromonas hydrophila* e amostrados antes e 3h e 24h depois. Letras maiúsculas indicam diferenças nos diferentes tempos de amostragem, no mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano; letras minúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação no mesmo nível de glucano e mesmo tempo de amostragem; asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano no mesmo protocolo e tempo de amostragem; setas indicam diferença entre o controle PBS e o controle desafiado com *A. hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem.....64

Figura 3. Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) no soro de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas, inoculados com *Aeromonas hydrophila* e amostrados antes e 3h e 24h depois. Letras maiúsculas indicam diferenças nos diferentes tempos de amostragem, no mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano; letras minúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação no mesmo nível de glucano e mesmo tempo de amostragem; asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano no mesmo protocolo e tempo de amostragem; setas indicam diferença entre o controle PBS e o controle desafiado com *A. hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem. A ausência de letras minúsculas nas barras indica que não houve diferenças significativas entre estratégias de alimentação..... 65

Figura 4. Concentração plasmática de glicose de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas, inoculados com *Aeromonas hydrophila* e amostrados antes e 3h e 24h depois. Letras maiúsculas indicam diferenças nos diferentes tempos de amostragem, no mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano; letras minúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação no mesmo nível de glucano e mesmo tempo de amostragem; asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano no mesmo protocolo e tempo de amostragem; setas indicam diferença entre o controle PBS e o controle desafiado com *A. hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem.....66

Figura 5. Infiltração leucocitária (IL) em pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras minúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação no mesmo nível de glucano e letras maiúsculas entre os níveis de β -glucano no mesmo protocolo de alimentação.....67

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1. Contagem total de leucócitos/ μL^3 (média $\pm$ D.P.) para 3 estratégias alimentares, 2 níveis de β -glucano e 3 tempos de amostragem.....68

Tabela 2. Contagem diferencial de células brancas (media $\pm$ D. S.) para 3 estratégias alimentares, 2 níveis de β -glucano e 3 tempos de amostragem. 69

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito da administração oral de β -glucano no crescimento, no aproveitamento do alimento, na dinâmica metabólica e nas respostas imunes inatas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a ciclos curtos de restrição alimentar e realimentação, e a ação imunoestimulante de β -glucano oferecido por 15 dias na fase final dos ciclos. Um total de 210 peixes foi distribuído em 21 tanques e submetido a diferentes estratégias de alimentação durante sete semanas: GC - Alimentação todo dia com ração comercial (RC); G 6/1 - Alimentação com RC por 6 dias e jejum por 1 dia (6/1); G 2/1 - Alimentação com RC por 2 dias e jejum por 1 dia (2/1); GCS - Alimentação todo dia com RC, e com suplementação de 0,5% de β -glucano (RCS), nos últimos 15 dias; GS 6/1 - Alimentação com RC por 6 dias e 1 dia de jejum, e RCS nos últimos 15 dias; GS 2/1 - Alimentação com RC, por 2 dias de alimentação e 1 dia de jejum, e RCS nos últimos 15 dias. Um sétimo grupo (GC-PBS) foi alimentado todos os dias para controle do efeito da manipulação e do veículo da inoculação bacteriana. No dia 50, nove peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína (1,0g/15L de água) e pesados antes da obtenção de amostras de sangue, fígado, intestino anterior e músculo branco. Foram determinadas a taxa de crescimento específico (TCE), a conversão alimentar (CA), a morfologia da mucosa intestinal, a concentração de metabólitos circulantes e teciduais, a atividade respiratória dos leucócitos (ARL), a concentração sérica de lisozima (CLS), a atividade hemolítica do sistema complemento no soro (AHC), a contagem total e diferencial de leucócitos e o infiltrado leucocitário epitelial (ILI) no intestino anterior. Os peixes restantes de cada tanque foram inoculados por injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila*, diluída em PBS. Um grupo (GC-PBS) foi injetado com o veículo PBS. Para determinação da resposta imunológica ao desafio com *A. hydrophila*, foram amostrados nove peixes de cada tratamento, às três e 24 horas depois do desafio. Os resultados mostraram que a TCE foi menor apenas no grupo 2/1 e a CA foi melhor em todos os peixes alimentados com β -glucano. A estratégia alimentar 2/1 elevou a glicose circulante e mobilizou maior quantidade de reservas energéticas do fígado e músculo. O comprimento das vilosidades intestinais foi menor no grupo 2/1 e o número de células caliciformes diminuiu com a severidade da restrição alimentar, sendo que o β -glucano aumentou esse número, inclusive nos peixes controle. A restrição alimentar prejudicou a resposta imunológica, diminuindo a ARL e a concentração de lisozima. O β -glucano melhorou a resposta imunológica, causando aumento na ARL, AHC, lisozima, contagem de células de defesa no sangue e ILI. A infecção bacteriana aumentou a contagem de neutrófilos e monócitos e diminuiu os linfócitos, enquanto o β -glucano aumentou a contagem de linfócitos,

diminui-o os neutrófilos, potencializou o aumento de monócitos e aumentou o número de células granulocíticas especiais. Houve diminuição progressiva na IL no intestino dos peixes à medida que aumentou a frequência do jejum, mas o β -glucano aumentou a IL, inclusive nos peixes controle. Concluindo, as estratégias alimentares testadas, embora afetassem negativamente alguns indicadores do sistema imune inato dos peixes, não impediram a resposta deste sistema frente a um desafio bacteriano. A suplementação com 0,5% de β -glucano melhorou o aproveitamento do alimento independente da estratégia alimentar e melhorou a resposta imunológica do pacu ao desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, células caliciformes, crescimento compensatório, imunidade inata, infiltrado leucocitário, jejum, morfometria intestinal, pacu, restrição alimentar, supressão imunológica.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of oral administration of β -glucan on growth, feed utilization, metabolic dynamics and the innate immune responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) subjected to short-term starvation and refeeding and the immunostimulatory action of β -glucan offered for 15 days in the final phase of the cycle. A total of 210 fish was distributed in 21 tanks and submitted to different feeding strategies for seven weeks: GC - feeding daily with commercial feed (RC); G 6/1 - 6-day feeding with RC and 1 restraint day (6/1); G 2/1 - 2-day feeding with RC and 1 restraint day (2/1); GCS - Feeding daily with RC and supplemented with 0.5% β -glucan (RCS) in the last 15 days; GS 6/1 - 6-day feeding with RC and 1 restraint day, and RCS in the last 15 days; GS 2/1 - 2-day feeding with RC and 1 restraint day, and RCS in the last 15 days. A seventh group (GC-PBS) was fed every day to control the effect of the handling and bacterial inoculation (injected PBS control). On day 50, nine fish of each treatment were sampled, weighed and anaesthetized with benzocaine (1.0g / 15L water) for blood, liver, white muscle and foregut sampling, to determine the specific growth rate (SGR), feed conversion (CA), morphology of intestinal mucosa, concentration of circulating and tissue metabolites, leukocyte respiratory burst, serum lysozyme concentrations, serum hemolytic activity of complement system (alternative pathway), total leukocyte differential count and intestinal leukocyte infiltration (ILI). The remaining fish were inoculated with *A. hydrophila*, and the injected PBS control group received only PBS. Nine fish per treatment were sampled at three and 24 hours after inoculation.

The results showed that the specific growth rate was lower in the fish G 2/1 and feed conversion was better in all fish fed with 0.5% β -glucan. In fish G 2/1, blood glucose levels and non-esterified fatty acids were higher and triglyceride levels were lower. Liver glycogen and lipid concentrations and lipid muscle concentration gradually decreased in fish G 6/1 and G 2/1 in relation to the CG showing higher mobilization of energy in liver and muscle. Length of intestinal villi was lower in fish 2/1, and the number of goblet cells decreased with the severity of feed restriction while β -glucan increased this number, including in control fish. Food restriction affected the immune response, reducing the leukocyte respiratory activity, and the serum lysozyme. The β -glucan supplementation improved immune response, increasing ARL, AHC, lysozyme, defense cell count and ILI. Bacterial infection increased neutrophils and monocytes and decreased lymphocytes, while the β -glucan increased lymphocytes, decreased neutrophils and potentiated the increase of monocytes and increased the number of special granulocytic cells. There was a progressive decrease in ILI as the frequency of

fasting increased, but the β -glucan reversed this decrease, including in control fish. In conclusion, feeding strategies, although had affected negatively some indicators of the innate immune system, they did not avoid the response of this system to a bacterial challenge. In conclusion, feeding strategies, although had affected negatively some indicators of the innate immune system, they did not avoid the response of this system to a bacterial challenge. β -glucan supplementation improved the utilization of food by pacu, independent on the feeding strategy, and improved their immune response against challenge with *Aeromonas hydrophila*.

Key-words: *Aeromonas hydrophila*, goblet cells, compensatory growth, feeding strategy, leukocyte infiltration, intestinal morphology, immune suppression.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é um sistema de produção que tem apresentado um rápido crescimento no mundo todo. Em 2014, a produção aquícola global chegou aos 73,8 milhões de toneladas mostrando um aumento na produção de 18,1 milhões de toneladas nos últimos cinco anos, enquanto que a pesca extrativa se manteve estável no mesmo período (FAO, 2016). Assim mesmo, o consumo per capita de peixe aumentou para 19 kg, em 2012, constituindo 17% da ingestão de proteína animal pela população global (FAO, 2014), reafirmando o potencial de crescimento deste sistema de produção.

A aquicultura constitui uma das principais fontes de proteína para a segurança alimentar no mundo, além de ser considerada uma atividade geradora de trabalho e ingresso de muitos países ao desenvolvimento (FAO, 2003). É uma atividade que oferece enorme potencial para atender a procura por alimentos associada ao crescimento da população global. Nos últimos anos, tem sido considerada a única forma de atender a demanda cada vez maior de consumo, insustentável com a produção pesqueira (FAO, 2006).

A produção brasileira de pescado em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, e 38,4% (476.512 toneladas) desta produção foram provenientes da aquicultura (Ministério de Pesca e Aquicultura, 2015). Assim, o crescimento da aquicultura tem levado à intensificação dos sistemas produtivos e como consequência aumento na frequência das práticas de manejo, estresse nos peixes e maior susceptibilidade às doenças, além de problemas ambientais como a eutrofização dos corpos de água, devido principalmente ao grande volume de ração fornecida e nem sempre aproveitada totalmente pelos peixes. Deste modo, é necessária a geração de conhecimento em prol de uma Aquicultura sustentável e competitiva. Segundo Ayroza et al. (2011), o alimento fornecido aos peixes durante o seu cultivo chega a representar de 48,21 a 54,93% do custo total de produção, por tanto é necessário estudar sobre o uso de possíveis estratégias alimentares utilizadas para garantir um melhor aproveitamento do alimento e boa qualidade da água, sendo estes fatores essenciais para obter um bom desempenho e uma boa saúde dos peixes dentro dos sistemas de aquicultura intensiva.

1.1 Uso de restrição alimentar na aquicultura

A utilização de períodos de restrição alimentar e realimentação em diferentes espécies de peixes vêm sendo investigada como ferramenta importante para a otimização da aquicultura (Souza et al., 2000a; Souza et al., 2003; Reigh et al., 2006). A utilização de protocolos de alimentação que incluem restrição alimentar seguida de realimentação não compromete a capacidade de crescimento dos peixes, ao contrário pode promover crescimento compensatório (Rueda et al., 1998; Cho et al., 2006), embora, a fisiologia metabólica de cada espécie determine o perfil de respostas a esses protocolos. Assim, o uso destas estratégias na aquicultura deve levar em conta o limite biológico de cada espécie. Há um crescente número de informações sobre as alterações de resposta fisiológicas que ocorrem durante à privação alimentar e realimentação em peixes devido ao interesse no fenômeno do crescimento compensatório (Davis e Gaylord, 2011).

Este fenômeno foi definido por Ali et al. (2003) como uma fase de crescimento com aceleração maior da normal resultado de uma adequada realimentação após período de privação alimentar, e que é determinado por diversos fatores como a fisiologia da espécie, a fase de desenvolvimento e a severidade da restrição alimentar aplicada. Segundo Xie et al. (2001), o crescimento compensatório apresenta ajustes da taxa de crescimento, minimizando a diferença entre a taxa obtida e a ideal devido ao período de restrição.

A hiperfagia, a eficiência de aproveitamento do alimento e a capacidade de mobilização e recuperação das reservas energéticas são fatores determinantes para a compensação do crescimento (Hayward et al., 1997; Gaylord e Gatlin, 2001; Tian et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2012). Segundo Ali et al. (2003), um consumo alimentar em uma taxa próxima ao máximo só é possível quando o trato digestório dos peixes pode processar o alimento. A capacidade de manter um longo período de hiperfagia tem relação com a hipertrofia do trato digestório, que permite uma maior capacidade de digestão (Rueda et al., 1998, Bélanger et al., 2002). Além disso, Tian e Qin (2003) afirmam que também é preciso o aumento na capacidade de aproveitar os alimentos, portanto, é necessário ajustar a quantidade de enzimas digestivas e metabólicas que foram reduzidas durante a

restrição alimentar. Tudo isto permite que o peixe consiga uma melhor eficiência alimentar e conseqüentemente, melhor crescimento (Cho et al., 2006).

Ali et al. (2003) descreveram graus de compensação que os peixes podem apresentar segundo os protocolos de restrição aplicados. Estes são classificados como: sobrecompensação, que ocorre quando os animais que foram submetidos a jejum durante a realimentação exibem altas taxas de crescimento em comparação com os que não foram privados de alimento; compensação total, quando os animais atingem o mesmo tamanho daqueles que foram alimentados continuamente; compensação parcial, na qual os animais não conseguem atingir o mesmo tamanho dos alimentados continuamente, mas mostram alta taxa de crescimento quando realimentado; e não compensação. Segundo esta descrição, no estudo feito por Tian e Qin (2003), em *Lates calcarifer*, períodos de restrição de uma semana induziram uma compensação completa do crescimento, mas com períodos de restrição de duas semanas ou mais longos não houve compensação. Além disso, observaram que o crescimento compensatório ocorreu com mais intensidade na primeira semana. Na mesma espécie, Tian e Qin (2004), encontraram que uma dieta de restrição moderada (50-75% saciedade), durante duas semanas, induziu crescimento compensatório total depois de cinco semanas de realimentação a saciedade, enquanto que as restrições mais intensas (0 - 25% saciedade) não permitiram a compensação. Cho et al. (2006) observaram compensação total do crescimento em *Paralichthys olivaceus*, submetido a duas semanas de privação alimentar durante o verão, período de ótimo crescimento da espécie, do mesmo modo que Gaylord e Gatlin (2000) observaram compensação total em *Ictaurus punctatus* com quatro semanas de privação alimentar.

Os protocolos estudados incluem períodos de total privação alimentar, períodos de restrição de uma porcentagem da ração, períodos curtos de privação do alimento e realimentação alternados em ciclos (Rueda et al., 1998; Tian e Qin, 2003; Wang et al., 2005).

1.2 Sistema imunológico dos peixes

O sistema imunológico se divide em imunidade adaptativa ou específica e inata ou não específica. Nos peixes, esta última constitui um mecanismo de defesa essencial, constituído por um conjunto de respostas que compõem os

primeiros mecanismos de defesa do organismo contra infecções (Magnadottir, 2006; Rauta et al., 2012).

Esta resposta é dividida em barreiras físicas (pele, brânquias e mucosa intestinal) e resposta imune celular e humoral. A imunidade inata celular envolve a atuação de células capazes de fagocitar e destruir agentes infecciosos mediante a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como resultado da atividade respiratória dos leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) durante a fagocitose (Whyte, 2007; Kantari et al., 2008; Magnadottir, 2006).

Várias moléculas conhecidas como mediadores químicos solúveis fazem parte da resposta imune inata humoral, e incluem enzimas líticas, as vias de complemento clássico, a via alternativa complemento, citocinas, quimiocinas e peptídeos antibacterianos e podem estar presentes no soro, na forma inativa ou de precursores. Suas concentrações podem ser influenciadas por diversos fatores como a qualidade da água, o estresse e a presença de patógenos (Verlhac et al., 1996).

O sistema complemento destrói os patógenos abrindo poros na superfície da sua membrana celular, e tem um papel importante nas reações inflamatórias, atraindo células fagocíticas para o local da lesão. É constituído por proteínas que podem estimular a fagocitose, mediante receptores presentes na superfície de células fagocíticas (Boshra et al., 2006; Nakao et al., 2011).

Um segundo componente importante do sistema imunológico inato é a lisozima, uma enzima que apresenta função lítica contra bactérias e pode estar presente no muco e no soro dos peixes (Fast et al., 2002; Palaksha et al., 2008). Sua atividade pode aumentar ou diminuir dependendo da espécie de peixe, a idade, o sexo, os parâmetros de qualidade de água, o estresse e a presença de agentes imunoestimulantes (Saurabh e Sahoo, 2008).

Além disso, um componente importante do sistema imune inato é o infiltrado leucocitário que constitui o Tecido Linfoide associado a intestino (GALT) (Picchietti et al., 2007). Nos peixes, tem sido descrita uma estrutura não organizada, de distribuição difusa sem nódulo linfoide, formada por linfócitos intraepiteliais, linfócitos da lâmina própria, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Rombout et al., 2011; Cerezuela et al., 2012).

1.3 Alimentação funcional e o uso de β -glucanos na alimentação de peixes

Na indústria aquícola atual, vem se aplicando o conceito de alimentação funcional que inclui uma nutrição equilibrada complementada com suplementos imunoestimulantes para melhorar a saúde dos peixes (Li e Gatlin, 2004). Segundo Trichet (2010), a administração de suplementos na dieta pode ser utilizada para fortalecer o sistema imunológico e aumentar a resistência a doenças. Ainda, de acordo com Pohlenz e Gatlin (2014), a administração de compostos não digeríveis é considerada um meio viável para aumentar a imunocompetência de várias espécies aquáticas.

O mecanismo de ação dos imunoestimulantes consiste em interagir diretamente com as células do sistema imunológico ativando-as, aumentando a atividade dos macrófagos, os processos de fagocitose, a ação das imunoglobulinas, e também a participação do sistema complemento e das lisozimas (Lim e Webster, 2001). Entre os diferentes imunoestimulantes utilizados em práticas de aquicultura, o β -glucano é um dos mais promissores (Ringo et al., 2012; Meena et al., 2013).

Os glucanos representam um grupo de polissacarídeos quimicamente heterogêneos, existentes em várias moléculas unidas por diferentes formas de ligação e graus de ramificação. São considerados compostos fisiologicamente ativos com capacidade de modificar a resposta biológica (Vetvicka et al., 2013).

Diferentes autores têm reportado que os β -glucanos podem melhorar a resposta imune inata e a resistência a doenças em diferentes espécies (Verlhac et al., 1998; Meena et al., 2013). Em estudo de Santarém et al. (1997), o β -glucano, extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e administrado por via intraperitoneal em *Scophthalmus maximus*, melhorou a resposta imune específica, aumentando a concentração sérica de lisozima e a atividade respiratória dos leucócitos. Em outro estudo, Misra et al. (2006) observaram que a concentração de 250 mg/kg de β -glucano na dieta de *Labeo rohita* desafiado com *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*, aumentou a atividade fagocítica, número de leucócitos, atividade de lisozima e sistema complemento dos peixes, sendo este nível de inclusão o recomendado pelos autores para melhorar o sistema imunológico, crescimento e sobrevivência da espécie. Kühlwein et al. (2014) encontraram, em *Cyprinus carpio* suplementado durante oito semanas com

1 % e 2% de β -glucano (MacroGard), um número de monócitos no sangue significativamente maior e um aumento na infiltração de leucócitos na camada epitelial do intestino anterior dos peixes em relação ao grupo controle. Na mesma espécie, Gopalakannan e Arul (2010) demonstraram que a utilização de 1% de β -glucano na dieta por um período de 60 dias aumentou a atividade respiratória dos leucócitos e a atividade da lisozima no soro no dia 30 e a contagem de glóbulos brancos no dia 60 de suplementação com glucano em peixes desafiados com *A. hydrophila*.

1.4 *Aeromonas hydrophila* como modelo experimental para desafiar o sistema imunológico dos peixes

Alguns estudos citados utilizaram a bactéria *Aeromonas hydrophila* como modelo experimental para desafiar o sistema imunológico dos peixes. Isso se deve ao fato de que as bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes nos ambientes aquáticos de todo o mundo, e dentro da aquicultura constitui um dos patógenos que mais causam perdas econômicas, sendo responsáveis por grande parte das doenças dos animais de cultivo (Carraschi, et al., 2012). A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria causadora de surtos de doença em diversas espécies brasileiras de cultivo (Godoy et al., 2008). A *Aeromonas hydrophila*, é uma bactéria gram-negativa e constitui um dos principais agentes patogênicos oportunistas de peixes de água doce, está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes sob condições de estresse fisiológico ou ambiental e por tanto imunosuprimidos, sendo responsável por grandes perdas na produção e comercialização de peixes (Vivekanandhan et al., 2005; Garcia e Moraes, 2009). A infecção por esta bactéria causa lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica caracterizada fisicamente pela presença de pequenas lesões superficiais e hemorragias locais, como petéquias nas brânquias e opérculos, exoftalmia e distensão abdominal causada pela presença de líquido ascítico, necrose hepática e renal (Newaj-Fyzul et al., 2007, Carrachi et al., 2012; Zhang, 2016), anemia normocítica-hipocrômica, redução nos níveis de proteínas, globulinas plasmáticas e eosinófilos, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, neutrofilia e monocitose (Garcia e Moraes, 2009). Segundo El-Boshy et al. (2010), esta bactéria pode provocar índices altos de mortalidade em peixes de água doce.

1.5 Modelo biológico experimental

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das espécies neotropicais de água doce de maior importância na piscicultura brasileira. É uma espécie pertencente à ordem dos Characiformes, da família Characidae, nativa da América do Sul, que se encontra distribuída nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Saint-Paul, 1986). Nos últimos anos, a produção de pacu no Brasil tem registrado taxas de crescimento anual de 17%, uma das maiores reportadas para as espécies nativas, chegando a uma produção de 21.245 toneladas em 2010 (Ministério de Pesca e Aquicultura, 2012).

O pacu é uma das espécies mais estudada no Brasil (Urbinati et al., 2013). É capaz de alimentar-se tanto de pequenos animais como também de folhas, caules, flores, frutos e sementes. Estudos prévios têm mostrado a sua capacidade de responder ao manejo alimentar envolvendo restrição e realimentação (Souza et al., 2000b; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2011).

Pelo exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar se a inclusão de β -glucano na alimentação de pacus submetidos a diferentes protocolos alimentares, que incluem ciclos curtos e repetitivos de restrição alimentar e realimentação, afeta a dinâmica metabólica, a resposta imunológica e o desempenho dos peixes.

2. REFERÊNCIAS

- AYROZA, L.M.D.S.; ROMAGOSA, E.; AYROZA, D.M.M.D.R.; SCORVO FILHO, J.D.; SALLES, F.A. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-do-nilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n.2, p. 231-239. 2011.
- BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 122f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 20, p. 239 -262. 2006.
- BRASIL. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. Disponível em: <
<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/%20Jonathan%20/mpa3/%20docs/anu%E1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: 18 Abril 2016 .
- BRASIL. Ministério da pesca e Aquicultura. Plano de desenvolvimento da aquicultura Brasileira. 2015/2020. 2015. Disponível em: <
<http://seafoodbrasil.com.br/wpcontent/uploads/2015/09/Plano%20de%20Desenvolvimento%20da%20Aquicultura-2015-2020.pdf?lang=es>>. Acesso em: 28 Junho 2016.
- CARRASCHI, S.P.; DA CRUZ, C.; MACHADO, J.G.; DE MORAES, F.R.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; NETO, A.N.; BORTOLUZZI, N.L. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v. 4, n. 5, p. 81-84. 2012.
- CEREZUELA, R., FUMANAL, M., TAPIA-PANIAGUA, S. T., MESEGUER, J., MORIÑIGO, M. Á., & ESTEBAN, M. Á. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. **Cell and tissue research**, v. 350, n.3, p. 477-489. 2012.
- CHO, S H.; LEE, S.M.; PARK, B.H.; JI, S.C.; Lee,J.; JEANHEE, B.; Oh, S.Y. Compensatory growth of juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* L., and changes in proximate composition and body condition indexes during fasting and

after refeeding in summer season. *Journal of World Aquaculture Society*, v.37, n. 2, p. 168-174. 2006.

DAVIS, K.B.; GAYLORD, T.G. Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 158, n. 1, p. 30-36. 2011.

EL-BOSHY M.E.; EL-ASHRAM A.M.; ABDELHAMID F.M.; GADALLA HA. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunology**, n. 28, p. 802-808. 2010.

FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. 224 p. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf> >. Acesso em: 29 Junho 2016.

FAO. El papel de la acuicultura en la mejora de la seguridad alimentaria y la nutrición. Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, 29º periodo de sesiones. Roma 2003. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/MEETING/006/Y8871S.HTM> >. Acesso em: 15 Abril. 2016.

FAO. State of world aquaculture. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2006. Disponível em:< <http://www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm> >. Acesso em: 15 Abril. 2016.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i3807e.pdf> >. Acesso em: 15 Abril. 2016.

FAST, M.D.; SIMS, D.E.; BURKA, J.F.; MUSTAFA, A.; ROSS, N.W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte A-Molecular and Integrative Physiology**, n.132, p. 645-657. 2002.

- FRASCA-SCORVO, CM.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon Amazonicus* em tanques de cultivo. **Acta Amazônica**, v. 37, n.4, p. 621 – 628. 2007.
- GARCIA, F.; DE MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n.1, p. 17-21. 2009.
- GAYLORD, T.G.; GATLIN D.M. Assessment of Compensatory Growth in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* R. and Associated Changes in Body condition Indices. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 3, p. 326-336. 2000.
- GODOY, D.T., MIAN, G.F., ZANOLO, R., YUHARA, T.Y, FARIA, F.C, FIGUEIREDO, H.C.P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, n. 285, p. 255–259, 2008.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 6, p. 884-892. 2010.
- HAYWARD, R.S.; NOLTIE, D.B.; WANG, N.; Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. Transactions of the American Fisheries Society, n. 126, p. 316–322. 1997.
- KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to microbiology**, n. 15, p. 118-146. 2008.
- KÜHLWEIN, H.; MERRIFIELD, D. L.; RAWLING, M. D.; FOEY, A. D.; DAVIES, S. J. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 279-289. 2014.
- LI, P.; GATLIN, D. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, n. 231, p. 445-456. 2004.
- LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press. 2001.

- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, n. 20, p. 137-151. 2006.
- MEENA, D. K. et al. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431-457. 2013.
- MISRA, C. K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, n. 255, p. 82-94. 2006.
- NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 35, p. 1296–1308. 2011.
- NEWAJ-FYZUL, A.; ADESIYUNZ, A. A.; MUTANIA A.; RAMSUDHAG, A. BRUNT, J. AUSTIN, B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, n. 103, p. 1699–1706. 2007.
- PALAKSHA, K.J.; SHIN, G.W.; KIM, Y.R.; JUNG, T.S.; Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, n. 24, p. 479-488. 2008.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; CARDENETE, G.; HIDALGO, M. C.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABELLÁN, E.; MORALES, A. E. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. **Fish Physiology and Biochemistry**, n 38, p. 1145–1157. 2012.
- PICCHIETTI S, MAZZINI M, TADDEI AR, RENNA R, FAUSTO AM, MULERO V, CARNEVALI O, CRESCI A, ABELLI L. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 22, p. 57–67. 2007.
- POHLENZ, C.; GATLIN III.D.M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, n. 431, p. 111–117. 2014.
- RAUTA, P.R.; NAYAK, B.; DAS, S.; Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, n. 148, p. 23-33. 2012.

- REIGH, R.; WILLIAMS, M.B.; JACOB, B. J. Influence of repetitive periods of fasting and satiation feeding on growth and production characteristics of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, n. 254, p. 506-516. 2006.
- RINGO, E.; OLSEN, R.E.; VECINO, G.L.; WADSWORTH, S.; SONG, S.K. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a **review. Marine Science Research and Development**, v. 2, n.1, p. 104-126. 2012.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.; KIRON, V. Teleost intestinal immunology. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 5, p. 616-626, 2011.
- RUEDA, F. M.; MARTINEZ, FJ.; ZAMORA, S.; KENTURI, M.; DIVANACH, P. Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture Research**, v. 29, n. 6, 447-452. 1998.
- SAINT – PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, n. 54, p. 205-240. 1986.
- SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) **Fish and Shellfish Immunology**, n. 7, p. 429–437. 1997.
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, n. 39, p. 223-239. 2008.
- SOUZA, V L.; SIPAÚBA-TAVARES.; L H., URBINATI, E C. Manejo alimentar e tempo de residência da água em viveiros de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n.2, p. 115-121. 2000a.
- SOUZA, V.L.; OLIVERA E.G.; URBINATI E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy, stores and growth of pacu, *piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, n.4, p. 371-379. 2000b.
- SOUZA, V.L.; URBINATI, E.C.; MARTINS, M.I.; SILVA, P.C. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 32, p.19-28. 2003.
- TAKAHASHI, L.S.; TAKAHASHI-BILLER, J.D.; CRISCUOLO-URBINATI, E. URBINATI, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding. Effects on farmed Pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n.2, p. 259–266. 2011.

- TIAN, X.; FANG, J.; DONG, S. Effects of starvation and recovery on the growth, metabolism and energy budget of juvenile tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Aquaculture**, n. 310, p. 122–129. 2010.
- TRICHET, V.V. Nutrition and immunity: an update. **Aquaculture Research**, n. 41, p. 356-372. 2010.
- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, in: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Eds), **Espécies nativas para Piscicultura no Brasil**, Santa Maria: Editora UFSM, 2013. p. 205-244.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, n. 143, p. 123-133. 1996.
- VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, n. 8, p. 409-424. 1998.
- VETVICKA, V.; VANUCCI, L.; SIMA, P. The Effects of β -Glucan on Fish Immunity. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n.10, p. 580-588. 2013.
- VIVEKANANDHAN, G.; HATHA, A.A.M., Lakshmanaperumalsamy, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, n. 22, p. 133–137. 2005.
- WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish e A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 23, p. 1127 -1151. 2007.
- ZHANG, D.; XU, D.H.; SHOEMAKER, C.; Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, n. 3, p. 18–23. 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta tese demonstraram que pacu é tolerante a estratégias alimentares que incluem períodos curtos de restrição alimentar e de realimentação, mobilizando suas reservas energéticas para manter a sua homeostase, sendo capaz de responder ao desafio bacteriano mesmo após ser submetido à restrição alimentar.

A duração do período de realimentação foi determinante na capacidade compensar o crescimento e na resposta imune inata antes do desafio, apresentando respostas diferentes entre os grupos realimentados por 6 dias e por 2 dias. Assim, estudos futuros testando outros protocolos alimentares, que incluam períodos de realimentação intermediários aos aplicados neste trabalho, poderão identificar ciclos de restrição alimentar que permitam manter os parâmetros de crescimento e de imunidade inata semelhantes ao controle.

A suplementação com β -glucano durante 15 dias demonstrou ser eficiente para melhorar a condição imunológica de pacu além, de melhorar o aproveitamento do alimento. Estudos posteriores poderiam testar menores tempos de suplementação ou doses reduzidas, bem como o custo benefício da suplementação.