

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONDIÇÃO CORPORAL E JEJUM SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO E CRESCIMENTO DE
JUVENIS DE PACU**

**Gisele Cristina Favero
Zootecnista**

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CONDIÇÃO CORPORAL E JEJUM SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO E CRESCIMENTO DE
JUVENIS DE PACU

Gisele Cristina Favero

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Coorientador: Prof. Dr. Dalton José Carneiro

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
doutora em Zootecnia

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CONDIÇÃO CORPORAL E JEJUM SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE PACU

AUTORA: GISELE CRISTINA FAVERO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. DALTON JOSE CARNEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Universidade Estadual Paulista / Dracena/SP

Profa. Dra. ANA PAULA BALDAN

Pontifícia Universidade Católica do Paraná / São Jose dos Pinhais/PR

Prof. Dr. JOAO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES

Centro de Aquicultura da Unesp / Jaboticabal/SP

Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP

Data da realização: 12 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gisele Cristina Favero – Nascida na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, no dia 19 de fevereiro de 1982. Em março de 2003 ingressou no curso de graduação em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, campus de Jaboticabal, SP, sendo bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2007 e ingressou no curso de mestrado em Zootecnia no mês de março de 2008 na FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro e com bolsa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Concluiu o curso de mestrado em julho de 2010 e ingressou no curso de doutorado em Zootecnia no mês de março de 2011, na mesma instituição, sob orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, com período sanduíche de 5 meses na Universidad de Barcelona (UB), Espanha, sob orientação da Profa. Dra. Isabel Navarro e com bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). No mês de fevereiro de 2015 defendeu tese, recebendo o título de doutora em Zootecnia.

RECEITA DE FELICIDADE

Pegue uns pedacinhos de afeto e de ilusão

Misture com um pouquinho de amizade

Junte com carinho uma pontinha de paixão

E uma pitadinha de saudade.

Pegue o dom divino maternal de uma mulher

E um sorriso limpo de criança

Junte a ingenuidade de um primeiro amor qualquer

Com o eterno brilho da esperança.

Peça emprestada a ternura de um casal

E a luz da estrada dos que amam pra valer

Tenha sempre muito amor

Que o amor nunca faz mal

Pinte a vida com o arco-íris do prazer

Sonhe, pois sonhar ainda é fundamental

E um sonho sempre pode acontecer.

Composição: Toquinho

Dedico com muito amor...

Aos meus pais, Tarciso Favero e Doralice Calandro Favero

Aos meus irmãos, Tarciso Favero Junior e Ana Carolina Favero

Agradecimentos

À Deus, por iluminar o meu caminho....

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Dalton José Carneiro, por toda colaboração durante o curso de doutorado e pela confiança e amizades prestadas durante o curso de mestrado e estágio no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Caunesp.

Aos professores e pesquisadores que fizeram parte das bancas de qualificação e defesa do doutorado, agradeço pela imensa contribuição na presente tese.

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida e à Pós-graduação em Zootecnia.

À professora Dra. Isis do Carmo Kettelhut e à técnica de laboratório Maria Antonieta Rissato Garófalo, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, pela contribuição na metodologia de análise de ácidos graxos.

Aos professores: Dra. Isabel Navarro, Dra. Encarnación Capilla e Dr. Joaquim Gutierrez pelo acolhimento e orientação durante o meu estágio de doutorado sanduíche na Universidad de Barcelona, na Espanha.

A todos os amigos e colegas que conheci ao longo desses 11 anos de Unesp...amigos e colegas que fazem parte (ou fizeram parte) do Laboratório de Biofísica (Depto de Morfologia e Fisiologia Animal), do Laboratório de Nutrição (LANOA) e do Setor de Carcinicultura do Caunesp. Amigos e colegas que me ajudaram nos experimentos, aos que me apoiaram nos momentos difíceis e aos que fizeram dessa minha jornada, uma jornada mais feliz e saudável!!!

Às “chicas de Cataluña”, Judith (Judy) e Cristina Salmerón pelo acolhimento, grandiosa ajuda e amizade durante os 5 meses inesquecíveis que passei na Espanha no ano de 2012.

À minha cunhada Nívia, ao meu cunhado Daniel, à minha avó Lourdes, aos meus sobrinhos Mateus, Lucas e Antonio, aos tios, tias, primos e primas espalhados por todo o Brasil...

Ao Ives, pelo amor, companheirismo, paciência e carinho durante todo esse período que estamos juntos.

À Maiara Matioli Nicola (Fre), por nossa grande amizade de longa data...

À Marilurdes (Lú) pelo valiosíssimo apoio e amizade de quase 2 anos...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
 CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....	 1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1. Jejum/realimentação e o metabolismo energético em peixes	2
2.2. Crescimento compensatório em peixes	4
2.3. O papel do tecido adiposo no metabolismo energético em peixes	7
2.4. A espécie como modelo experimental	8
3. Referências Bibliográficas	9
 CAPÍTULO 2 – Dinâmica metabólica e desempenho de juvenis de pacu submetidos a ciclos curtos e longo de jejum e realimentação.....	 16
Resumo	17
1. Introdução.....	17
2. Material e métodos.....	19
2.1. Animais e condições experimentais	19
2.2. Protocolo experimental	20
2.3. Dieta experimental	21
2.4. Variáveis sanguíneas.....	22
2.5. Amostragens de tecidos para análise e cálculo dos índices morfo- somáticos	22

2.6. Desempenho produtivo	23
2.7. Análise estatística	23
3. Resultados	23
3.1. Variáveis metabólicas sanguíneas.....	23
3.2. Variáveis metabólicas teciduais	25
3.3. Índices biométricos	27
3.4. Variáveis de desempenho.....	29
4. Discussão	29
4.1. Respostas metabólicas	29
4.2. Desempenho.....	35
5. Conclusões	37
6. Referências	37

CHAPTER 3 - Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu	44
Abstract	45
1. Introduction	46
2. Material and methods	47
2.1. Fish and experimental protocol	47
2.2. Sampling	49
2.3. Specific procedures.....	49
2.4. Statistical analyses	50
2.5. Bioethical statement	50
3. Results	51
3.1. Metabolic parameters.....	51
3.2. Growth performance	55

4. Discussion	57
5. Conclusions.....	60
6. Acknowledgements.....	60
 CAPÍTULO 4 – Considerações Finais.....	 64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Formulação e composição da dieta experimental..... 21

Tabela 2. Variáveis de desempenho aos 60 dias de experimento..... 29

CHAPTER 3

Table 1. Ingredients and proximate composition of the pre-experimental and experimental diets 48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Padrões de crescimento compensatório (Jobling, 1994)	6
---	---

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estratégias de alimentação utilizadas durante 60 dias. Letra “J” corresponde ao jejum e letra “A”, corresponde ao período de alimentação	20
---	----

Figura 2. Glicose (mg dl^{-1}) (A) e triglicerídeo plasmáticos (mg dl^{-1}) (B), colesterol (mg dl^{-1}) (C) e proteína total séricos (g dl^{-1}) (D) e ácidos graxos livres (mmol L^{-1}) (E) em pacus submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias.....	24
--	----

Figura 3. Glicogênio (%) (A) ($n = 8$) e lipídeo hepático (mg g^{-1}) (B) ($n = 6$), lipídeo (mg g^{-1}) (C) ($n = 6$) e proteína musculares (mg g^{-1}) (D) ($n = 8$) em pacus submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias	26
---	----

Figura 4. Índice hepatossomático (%) (IHS) (A) e índice gordura víscero-somática (%) (B) (IGVS) em pacus submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias.....	28
--	----

CHAPTER 3

Figure 1. Plasma glucose (A) and triglycerides (B), serum cholesterol (C), non-esterified fatty acids (NEFA) (D) and protein (E) levels for lean and fat pacu in the experimental period (fasted for 15 days and re-fed for 5 days) and control (continuously fed for 20 days) groups	53
--	----

Figure 2. Liver glycogen (A), liver lipid (B), muscle lipid (C) levels and mesenteric fat index (MFI) (D) for lean and fat pacu in the experimental period (fasted for 15 days and re-fed for 5 days) and control (continuously fed for 20 days) groups.....	55
---	----

Figure 3. Weight gain (WG) (A), specific growth rate (SGR) (B), daily feed intake (DFI) (C) and feed conversion ratio (FCR) (D) of lean and fat fish fasted for 15 days and re-fed for 5 days (re-fed) and fish continuously fed (control) for 20 days.....	56
--	----

CONDIÇÃO CORPORAL E JEJUM SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE PACU

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar as estratégias metabólicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando jejum e realimentação como ferramenta. No primeiro experimento, 450 juvenis de pacu foram alocados em 18 tanques de 250 L, nos seguintes tratamentos: alimentados durante 60 dias (controle) com dieta formulada, submetidos a ciclos curtos e alternados de seis dias de jejum e seis de realimentação (6/6) e submetidos a um ciclo longo de 30 dias de jejum e 30 de realimentação (30/30), durante 60 dias. A cada seis dias, 12 peixes de cada tratamento eram amostrados para determinação das variáveis sanguíneas (glicose e triglicerídeo plasmáticos, colesterol, ácidos graxos e proteína total séricas) e teciduais (glicogênio, lipídeo hepático e índice hepatossomático (IHS), lipídeo e proteína muscular e índice de gordura víscero-somática (IGVS)). Ao início e final do período experimental foram determinadas as variáveis de crescimento (ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo, taxa de eficiência protéica (TEP), conversão alimentar (CA) e fator de condição (K)). O jejum para os tratamentos 6/6 e 30/30 foi marcado pela utilização de glicose e triglicerídeos plasmáticos e aumento do colesterol e ácidos graxos séricos. Também ocorreu diminuição do glicogênio e lipídeo hepático e do lipídeo muscular. Com a realimentação, ambos os tratamentos apresentaram rápida recuperação das reservas energéticas. Porém, os tempos de realimentação estabelecidos não foram suficientes para a recuperação do crescimento dos peixes. Em um segundo estudo, 204 peixes foram alocados em 12 tanques de 430 L e divididos em dois grupos pré-experimentais, sendo alimentados com diferentes dietas durante 15 dias para a obtenção de grupos com duas condições corporais (peixes magros e gordos), definidos pela concentração de tecido adiposo mesentérico. Após alcançarem condições corporais distintas, ambos os grupos foram submetidos aos tratamentos: alimentados continuamente durante 20 dias com dieta formulada (controle) e submetidos a 15 dias de jejum e realimentados durante cinco dias com dieta formulada. Ao início, aos 15 dias e aos 20 dias (final) do período experimental, nove peixes de cada tratamento foram amostrados para determinação das variáveis sanguíneas (glicose e triglicerídeos plasmáticos, colesterol, proteína e ácidos graxos séricos) e teciduais (glicogênio e lipídeo hepático, lipídeo e proteína muscular e IGVS). Foram mensurados o peso e comprimento dos peixes para cálculo das variáveis de crescimento (GP, consumo, TCE e CA). Os peixes magros apresentaram maior crescimento e melhor utilização do alimento em relação aos peixes gordos. O pacu apresenta grande adaptação aos períodos de jejum, por meio da mobilização de suas reservas corporais, e recuperação após a realimentação. Por outro lado, a elevada deposição de lipídeos corporais não significa maior disponibilidade de energia para crescimento, pois peixes magros apresentam crescimento compensatório e melhor utilização do alimento após cinco dias de realimentação.

Palavras-chave: restrição alimentar, realimentação, reservas corporais, desempenho

BODY CONDITION AND FASTING ON ENERGETIC METABOLISM AND GROWTH ON PACU JUVENILE

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the metabolic strategies of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) using fasting and refeeding as a tool. In the first experiment, 450 pacu were divided into 18 tanks of 250 L, at the following treatments: fed for 60 days (control) with formulated diet, and subjected to short alternating cycles of six days of fasting and six of refeeding (6/6); and subjected a long period of 30 days of fasting and refeeding for 30 days (30/30) during 60 days. Each six days 12 fish, per treatment, were sampled to determine the blood variables (glucose and serum triglyceride, cholesterol, fatty acids, and total serum protein) and tissue (glycogen and hepatic lipid, hepatosomatic index (HSI), muscle protein and lipid and mesenteric fat index (MFI)). At the beginning and end of the experiment were determined growth parameters (weight gain (WG), specific growth rate (SGR), food intake, protein efficiency ratio (PER), feed conversion ratio (FCR) and condition factor (K)). Fasting for treatments 6/6 and 30/30 was marked by the use of glucose and plasma triglycerides and increased serum cholesterol and fatty acids. In addition, there was a decrease of glycogen and liver lipid and muscle lipid. On refeeding, both treatments showed rapid recovery of energy reserves. However, the refeeding periods were not sufficient for fish growth recovery. In a second study, 204 fish were kept in 12 tanks of 430 L and separated into two pre trial groups, fed with different diets for 15 days, to obtain different body conditions (lean and fat fish), in terms of mesenteric fat content. After reaching different body conditions, both groups were submitted to treatments: continuously fed for 20 days with formulated diet (control) and subjected to 15 days of fasting and re-fed for five days with formulated diet. At the beginning, on the 15th and 20th (final) days of the experimental period, nine fish per treatment were sampled to determine the blood variables (glucose and plasma triglycerides, cholesterol, protein and serum fatty acids) and tissue (glycogen and liver lipid, lipid and muscle protein and MFI). The weight and length of fish were measured to calculate the growth parameters (WG, SGR, daily food intake (DFI) and FCR). Lean and fat fish showed different strategies of energy use during the periods of fasting and refeeding. Lean fish showed higher growth and better use of the food compared to fat fish. Pacu has great adaptation to fasting by mobilizing their body reserves and recovering them after refeeding. However, the higher deposition of lipids in fish does not mean higher energy availability to growth because lean fishes showed compensatory growth and better feed utilization after five days of refeeding.

Keywords: food restriction, refeeding, body reserves, performance

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 001798/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Lipólise no tecido adiposo de juvenis de pacu submetidos a diferentes estratégias alimentares e alimentados com dieta contendo um elevado nível de carboidratos"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Elisabeth Criscuolo Urbinati está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 18 de maio de 2012.

Jaboticabal, 21 de maio de 2012.



Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

O Brasil se destaca como um dos países de maior potencial para a expansão da aquicultura, não apenas em função do crescimento populacional, mas também pela preferência por alimentos mais saudáveis (VALENTI et al., 2000). Na piscicultura, o pacu é uma das espécies de maior valor comercial por apresentar carne de alta qualidade, além de sua rusticidade e habilidade para ganhar peso e adaptabilidade às condições de cultivo em cativeiro (OLIVEIRA et al., 2004).

Muitas espécies de peixes passam por longos períodos de escassez de alimento na natureza e são adaptados a mobilizar suas reservas corporais de forma eficiente para sua sobrevivência. A utilização de estratégias de restrição e realimentação na produção destas espécies em cativeiro é uma ferramenta que tem se mostrado muito importante por possibilitar melhorias nas taxas de crescimento (RUEDA et al., 1998; SOUZA et al., 2002; HEIDE et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2011), além de maior viabilidade econômica ao produtor, por meio da diminuição nos custos de produção (TAKAHASHI et al., 2011; XIAO et al., 2013).

O pacu é um interessante modelo de estudo das dinâmicas metabólicas durante o jejum e realimentação por ser uma espécie que possui elevada tendência em depositar gordura, especialmente em sua cavidade abdominal. Segundo Wood et al. (2008), o manejo da deposição de gordura nos animais tem se tornado muito importante, especialmente em termos de qualidade do produto, já que os lipídeos interferem no valor nutricional e nas propriedades sensoriais da carne.

Jobling e Johansen (1999) afirmam que, de acordo com o “modelo lipostático” proposto por Kennedy (1953), o tamanho das reservas de lipídeos nos animais é responsável por coordenar áreas do cérebro que controlam a alimentação e o gasto energético, podendo ocorrer alterações no consumo alimentar, metabolismo e eficiência metabólica. Assim, durante a realimentação, os sinais de *feedback* negativo que inibem a ingestão de alimento são reduzidos por causa da diminuição

dos estoques de lipídeos ocorrida durante o período de jejum, resultando em hiperfagia, rápido aumento de peso e recuperação das reservas energéticas.

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas metabólicas e os aspectos produtivos em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidos a diferentes estratégias alimentares (ciclos curtos e longo de jejum e realimentação) e avaliar essas respostas nestes animais com distintos conteúdos de gordura corporal (peixes magros e gordos) e submetidos ao jejum e realimentação.

2. Revisão de Literatura

2.1. Jejum/realimentação e o metabolismo energético em peixes

Os peixes podem sobreviver por um longo período sem se alimentar e, para muitas espécies, o jejum faz parte do ciclo natural de vida (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995; RIOS et al., 2011; BAR, 2014). Meses de inverno, migração para desova e/ou estágios de pré-desova podem ser períodos em que os animais não se alimentam. Portanto, estas espécies são bem adaptadas a mobilizar suas reservas metabólicas para sobreviver a estas temporadas de privação alimentar (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Os peixes têm habilidade para reduzir seu gasto metabólico e mobilizar as reservas corporais para obter a energia necessária para manutenção de processos vitais, como a função cerebral, a respiração, a regulação do equilíbrio mineral, entre outros (FURNÉ et al., 2012). Entretanto, a utilização das reservas energéticas pode variar de forma espécie-específica (TAKAHASHI et al., 2011), ou seja, na habilidade diferenciada que cada espécie possui em utilizar seus componentes endógenos durante o jejum (HORNICK, 2000).

O glicogênio é o primeiro substrato a ser utilizado durante o jejum em muitas espécies de peixes, como o *Piaractus mesopotamicus* (SOUZA et al., 2003), *Ictalurus punctatus* (PETERSON; SMALL, 2004), *Dicentrarchus labrax* (PÉREZ-JIMENÉZ et al., 2007; CHATZIFOTIS et al., 2011), *Rhamdia quelen* (BARCELLOS et al., 2010), *Prochilodus lineatus* (RIOS et al., 2011), *Dentex dentex* (PÉREZ-

JIMENÉZ et al., 2012), *Acipenser naccari* e *Oncorhynchus mykiss* (FURNÉ et al., 2012) e *Acipenser baerii* (ASHOURI et al., 2013), e é encontrado principalmente nos grânulos dos hepatócitos e no músculo esquelético dos animais. Normalmente representa de 1 a 6% do peso total do fígado para a maioria das espécies de peixes, embora em algumas espécies como a carpa (*Cyprinus carpio*) pode ultrapassar 10% do peso do tecido (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Logo no início da privação alimentar, o glicogênio é quebrado (glicogenólise), por meio da enzima *glicose-6-fosfatase*, em unidades de glicose, que são encaminhadas à corrente sanguínea quando os níveis de glicose são baixos (NELSON; COX, 2004), e também por meio da síntese *de novo* da glicose (gliconeogênese), em que podem ser utilizados o lactato, glicerol ou alguns aminoácidos (POLAKOF et al., 2012).

A glicose sanguínea é a variável fisiológica mais comumente mensurada em animais sob privação alimentar (McCUE, 2010). As concentrações glicêmicas em peixes variam amplamente entre as espécies e também dentro de cada espécie, porém, os seus níveis também permanecem inalterados durante longos períodos de privação alimentar (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995; POLAKOF et al., 2012), o que demonstra a capacidade de muitas espécies em manter a homeostase glicêmica em condições nutricionais adversas. Entretanto, em algumas espécies, o jejum leva a situações de hipoglicemia (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007; FURNÉ et al., 2012; GIMBO et al., 2015). Barcellos et al. (2010) observaram que períodos de jejum de 7, 14 ou 21 dias não alteraram as concentrações de glicose no sangue de jundiás (*Rhamdia quelen*). Ao final do jejum, o glicogênio no fígado diminuiu, ocorrendo também decréscimo do índice hepatossomático e, após realimentação, houve rápida recuperação dessas reservas, demonstrando ser uma estratégia do animal para recompor os estoques de energia para síntese de material corpóreo.

Em outro estudo utilizando a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) como modelo experimental, Hoseini et al. (2014) avaliaram os efeitos de períodos curtos de jejum (0, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas) sobre os níveis de glicose, lactato, triglicerídeos, colesterol, proteína total e albumina no soro sanguíneo. Os maiores e os menores níveis de glicose e lactato, respectivamente, ocorreram com seis horas de jejum, em relação aos demais períodos e, os menores e maiores níveis foram observados com 48 horas de jejum. Como observado em mamíferos, o lactato é

transportado de volta às células hepáticas para a produção de glicose em condições hipoglicêmicas (CHATTERJEE et al., 2006), o que explica o efeito inverso entre estes metabólitos durante os períodos de jejum em trutas.

À medida que o jejum se prolonga, o glicogênio hepático é preservado à custa da mobilização de gordura no fígado, vísceras e músculo. Assim como o glicogênio, as reservas lipídicas também são muito utilizadas para a produção de energia em peixes. Entretanto, sua utilização durante o jejum é dependente da espécie, da reserva de lipídeos nos tecidos e da estratégia empregada para mobilização de outras reservas, como os carboidratos (FURNÉ et al., 2012). Takahashi et al. (2011) e Urbinati et al. (2014) estudaram ciclos curtos de jejum e realimentação em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e matrinxãs (*Brycon amazonicus*), respectivamente. Os autores encontraram uma diminuição dos níveis de lipídeo hepático durante o jejum tanto nos juvenis de pacu como nos matrinxãs, com consequente recuperação dos estoques após a realimentação. Os níveis de lipídeo muscular também diminuíram nos matrinxãs em jejum, mas permaneceram inalterados nos pacus, inclusive após a realimentação, quando comparados aos peixes continuamente alimentados.

Com o aumento do período de jejum, podem ocorrer mudanças em relação à degradação de proteínas e aminoácidos em muitas espécies, ou seja, o jejum prolongado pode estimular o catabolismo de proteínas e aminoácidos do músculo e tornar-se a principal fonte de energia para os tecidos (GUDERLEY et al., 2003; RIOS et al., 2006; CHATZIFOTIS et al., 2011; COSTAS et al., 2011). Furné et al. (2012) avaliaram os efeitos metabólicos do jejum prolongado (72 dias) e realimentação (60 dias) em esturjão (*Acipenser naccarii*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O conteúdo de proteína muscular decresceu significativamente aos cinco dias de jejum em ambas as espécies. Porém, após a realimentação, essas concentrações foram recuperadas apenas para o esturjão.

2.2. Crescimento compensatório em peixes

A aplicação de regimes alternados de restrição e realimentação tem sido muito utilizada como ferramenta para se obter crescimento compensatório e maior

eficácia na produção de peixes. O crescimento compensatório é utilizado geralmente para descrever um aumento nas taxas de crescimento em massa ou comprimento (ALI et al., 2003). Este manejo alimentar oferece a possibilidade de melhorar as taxas de crescimento dos peixes, por meio de criteriosos esquemas de alimentação, com a correta utilização de períodos de jejum e realimentação (YENGKOKPAM et al., 2013), além de resultar na diminuição dos custos de produção (TAKAHASHI et al., 2011; XIAO et al., 2013). A compensação pode ser tão intensa que os animais submetidos à restrição alimentar podem exibir uma maior taxa de crescimento em relação aos animais continuamente alimentados (BROEKHUIZEN et al., 1994).

O crescimento compensatório é variável tanto entre as espécies como dentro de uma espécie, dependendo do seu estágio de desenvolvimento (MANGEL; MUNCH, 2005) e é caracterizado pela hiperfagia, melhora na conversão alimentar e elevada taxa de crescimento específico (WON; BORSKI, 2013), além de recuperação da composição corporal e das reservas energéticas (JOBILING, 2010). Segundo Won e Borski (2013), as respostas ao crescimento compensatório são divididas em duas fases: catabólica (mobilização) e anabólica (síntese). Os autores afirmam que a fase catabólica esgota as reservas de energia endógenas e altera o perfil endócrino, responsável por modular o apetite e o potencial de crescimento, enquanto que na fase anabólica ou realimentação, o crescimento compensatório é reabastecido pelo influxo hiperfágico de substratos e energia exógena.

A hiperfagia é o principal mecanismo envolvido nas respostas compensatórias e é definida como uma taxa de consumo de alimento significativamente mais elevada em relação aos peixes alimentados continuamente *ad libitum* (ALI et al., 2003). A utilização de esquemas de alimentação por meio de ciclos curtos de dois dias de jejum e três ou quatro dias de realimentação induziu a um crescimento compensatório total em juvenis de matrinxã, o que permitiu uma redução de até 40% na quantidade de alimento fornecido aos peixes (URBINATI et al., 2014). Segundo os autores, o consumo de dieta pelos peixes apresentou um comportamento hiperfágico para os dois esquemas de privação avaliados. Além disto, a taxa de eficiência alimentar se aproximou de 100%, indicando máximo aproveitamento do alimento para crescimento.

Segundo Ali et al. (2003), o crescimento pode atingir uma sobre compensação, quando os animais submetidos ao jejum alcançam peso maior que animais não restritos; compensação completa ou total, quando os animais alcançam o mesmo peso dos animais continuamente alimentados; compensação parcial, quando os animais que passaram por períodos de jejum e foram realimentados não chegam a alcançar o peso dos animais continuamente alimentados e não-compensação, em que os animais não apresentam ganho em peso após a realimentação (Figura 1).

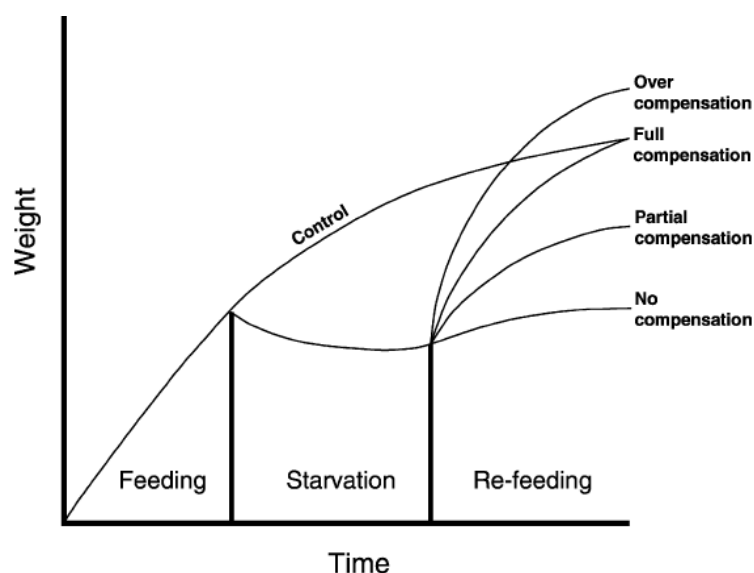


Figura 1. Padrões de crescimento compensatório (Jobling, 1994)

Xiao et al. (2013) encontraram crescimento compensatório total em *black sea bream* (*Spondyliosoma cantharus*) submetidos a ciclos de um e dois dias de jejum por semana, enquanto que períodos maiores não apresentaram respostas satisfatórias. Os autores afirmam que o grau do crescimento na espécie é dependente do comprimento da restrição alimentar. Em outros estudos, porém, houve crescimento compensatório parcial dos peixes após o jejum (HEIDE et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2011) e os autores asseguram que os períodos de

realimentação determinados foram insuficientes para levar a uma resposta compensatória total nos animais.

2.3. O papel do tecido adiposo no metabolismo energético em peixes

Os padrões de estoque e deposição de lipídeos e a natureza química dos seus componentes são muito variáveis nos vertebrados ectotérmicos. Em peixes, os principais sítios de deposição de lipídeos são o tecido adiposo mesentérico, o fígado e o músculo (SHERIDAN, 1994). O tecido adiposo é um tecido amorfo, constituído pelos adipócitos ou células de gordura, sendo o principal reservatório energético do organismo (NELSON; COX, 2004) e os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triglicerídeos em seu citoplasma (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Em peixes, assim como em mamíferos, o desenvolvimento do tecido adiposo é um processo contínuo, que inclui a hipertrofia de adipócitos existentes e a proliferação (hiperplasia) de novos adipócitos (CRUZ-GARCIA et al., 2011). Os adipócitos liberam ácidos graxos na circulação, os quais são utilizados por muitos órgãos como fonte de energia quando a disponibilidade de glicose é limitada. Os ácidos graxos são gerados pela quebra dos triglicerídeos, que contem mais energia por unidade de massa que os carboidratos (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

Sob condições normais, os adipócitos são capazes de controlar o balanço entre síntese (lipogênese) e quebra (lipólise) de triglicerídeos em resposta às necessidades fisiológicas (BOURAOUI, 2009). Atualmente, muitos estudos estão voltados para o conhecimento das condições nutricionais de um animal e seu impacto na lipogênese e lipólise do tecido adiposo, com o objetivo de alcançar melhores respostas no desempenho animal e qualidade final da carne (BENEDITO-PALOS et al., 2010; BOURAOUI et al., 2011; CRUZ-GARCIA et al., 2011; BOU et al., 2014). Enquanto os depósitos de gordura no músculo dos peixes modulam a qualidade organoléptica da carne, o tecido adiposo subcutâneo e perivisceral tem forte influência sobre o rendimento do filé e de carcaça (WEIL et al., 2013).

Albalat et al. (2005) avaliaram o efeito da composição de diferentes dietas (utilizando proteína de origem animal, como a farinha de peixe ou proteínas de origem vegetal) e o jejum, sobre a lipólise em adipócitos de dourada (*Sparus aurata*). A taxa lipolítica foi significativamente mais elevada nos adipócitos dos peixes que ingeriram dietas contendo proteínas de origem vegetal, quando comparados aos peixes que se alimentaram com a farinha de peixe. O jejum provocou um aumento três vezes maior na taxa lipolítica em adipócitos isolados. Esses resultados mostraram que a lipólise no tecido adiposo é modulada pelas condições nutricionais da espécie. Em estudos com truta arco-íris, Cruz-Garcia et al. (2011) observaram menor taxa lipolítica e menor tamanho de adipócitos nos grupos de peixes alimentados com dietas contendo óleo de peixe em relação aos grupos alimentados com dietas contendo óleos de origem vegetal. De acordo com os autores, o diferente perfil de ácidos graxos presente nos óleos vegetais em relação ao óleo de peixe pode ter sido o principal fator responsável pelas alterações observadas no tecido adiposo dos peixes.

2.4. A espécie como modelo experimental

Os peixes pertencentes à subfamília *Myleinae*, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) são considerados muito importantes para a piscicultura, pois são espécies altamente apreciadas pela qualidade de sua carne, apresentam grande importância na pesca comercial em suas regiões de origem, apresentam rusticidade e habilidade para ganhar peso e adaptabilidade aos ecossistemas aquaculturais (OLIVEIRA et al., 2004).

O pacu é uma das espécies mais promissoras para cultivo no Brasil e um dos peixes mais estudados no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, recebendo os nomes de caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu. É um peixe onívoro, que se alimenta principalmente de folhas, caules, flores, frutos e sementes. Havendo necessidade e oportunidade, ele se alimenta de insetos, aracnídeos, moluscos e peixes (URBINATI et al., 2013). Durante o período das águas (cheias), o pacu

invade as regiões alagadas em busca de alimento, sendo a principal época de alimentação e armazenamento de grandes reservas de gordura na sua cavidade abdominal (ZANIBONI-FILHO, 2004).

Espécies tropicais como o pacu possuem grande adaptação aos períodos de jejum, mobilizando reservas corporais de forma eficiente para sua sobrevivência. Com esse propósito, diferentes protocolos alimentares de jejum e realimentação têm sido estudados em juvenis de pacu, em que os peixes submetidos ao jejum apresentaram rápida recuperação das suas reservas corporais após a realimentação (SOUZA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2011; GIMBO et al., 2015). Em relação ao desempenho dos animais, alguns estudos também observaram respostas satisfatórias de hiperfagia (TAKAHASHI et al., 2011) e de crescimento compensatório (SOUZA et al., 2002). Além disto, a tendência do pacu em depositar gordura corporal, especialmente em sua cavidade abdominal, é um diferencial para o estudo das respostas de mobilização dessas reservas pelo animal frente a condições de jejum e realimentação.

3. Referências Bibliográficas

ALBALAT, A.; GÓMEZ-REQUENI, P.; ROJAS, P.; MÉDALE, F.; KAUSHIK, S.; VIANEN, G. J.; VAN DEN THILLART, G.; GUTIÉRREZ, J.; PÉREZ-SANCHEZ, J.; NAVARRO, I. Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. **American Journal of Physiology (Regulatory, Integrative and Comparative Physiology)**, v. 289, p. 259 – 265, 2005.

ALI, M. Z.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R. J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries**, v. 4, p. 147–190, 2003.

ASHOURI, G.; YAVARI, V.; BAHMANI, M.; YAZDANI, M. A.; KAZEMI, R.; MORSHEDI, V.; FATOLLAHI, M. The effect of short-term starvation on some physiological and morphological parameters in juvenile siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Actinopterygii: acipenseriformes: acipenseridae). **Acta ichthyologica et piscatoria**, v. 43, n. 2, p. 145 – 150, 2013.

BAR, N. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 71, p. 1 – 12, 2014.

BARCELLOS, L. J. G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 300, p. 231 – 236, 2010.

BENEDITO-PALOS, L.; NAVARRO, J. C.; KAUSHIK, S.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and fish oil. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 1759 – 1770, 2010.

BOURAOUI, L. Control nutricional y hormonal del metabolism del tejido adipose y la regulación de la adipogénesis en peces. **Tese (Doutorado em Aquicultura)**. Universidad de Barcelona, Barcelona, 2009, 208 páginas.

BOURAOUI, L.; SÁNCHEZ-GURMACHES, J.; CRUZ-GARCÍA, L.; GUTIÉRREZ, J.; BENEDITO-PALOS, L.; PÉREZ-SANCHEZ, J.; NAVARRO, I. Effect of dietary fish meal and fish oil replacement on lipogenic and lipoproteína lipase activities and plasma insulina in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 54 – 63, 2011.

BOU, M.; TODORCEVIC, M; FONTANILLAS, R.; CAPILLA, E.; GUTIERREZ, J.; NAVARRO, I. Adipose tissue and livermetabolic responses to different levels of dietary carbohydrates in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v. 175, p. 72 – 81, 2014.

BROEKHUIZEN, N.; GURNEY, W. S. C.; JONES, A.; BRYANT, A. D. Modelling Compensatory Growth. **Functional Ecology**, v. 8 (6), p. 770 – 782, 1994.

CHATTERJEE, N.; PAL, A. K.; DAS, T. MOHAMMED, M. S., SARMA, K.; VENKATESHWARLU, G.; MUKHERJEE, S. C. Secondary stress responses in Indian major carps *Labeo rohita* (Hamilton), *Catla catla* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry to increasing packing densities. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 472 – 476, 2006.

CHATZIFOTIS, S.; PAPADAKI, M.; DESPOTI, S.; ROUFIDOU, C.; ANTONOPOULOU, E. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 316, p. 53 – 59, 2011.

COSTAS, B.; ARAGÃO, C.; RUIZ-JARABO, I.; VARGAS-CHARCOFF, L.; ARJONA, F. J.; DINIS, M. T.; MANCERA, J. M.; CONCEIÇÃO, L. E. C. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 495 – 504, 2011.

CRUZ-GARCIA, L.; SÁNCHEZ-GURMACHES, J.; BOURAOUI, L.; SAERA-VILA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; GUTIERREZ, J.; NAVARRO, I. Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v. 158, p. 391 – 399, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 192 – 203, 2007.

FURNÉ, M.; MORALES, A. E.; TRENZADO, C. E.; GARCÍA-GALLEGO, M.; HIDALGO, M. C.; DOMEZAIN, A.; RUS, A. S. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, p. 63 – 76, 2012.

GIMBO, R.Y., FÁVERO, G.C., FRANCO MONTTOYA, L.N., URBINATI, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, p. 295 – 300, 2015.

GUDERLEY, H.; LAPOINTE, D.; BE'DARD, M.; DUTIL, J-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v. 135, p. 347 – 356, 2003.

HEIDE, A.; FOSS, A.; STEFANSSON, S. O.; MAYER, I.; NORBERG, B.; ROTH, B.; JENSSEN, M. D.; NORTVEDT, R.; IMSLAND, A. K. Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: effects of short term starvation periods and subsequent feeding. **Aquaculture**, v. 261, p. 109 – 117, 2006.

HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, p. 121 – 132, 2000.

HOSEINI, S. M.; YOUSEFIZ, M.; RAJABIESTERABADI, H.; PAKTINAT, M. Effect of short-term (0–72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of applied ichthyology**, v. 30, p. 569 – 573, 2014.

JOBLING, M.; JOHANSEN, S. J. S. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 473 – 478, 1999.

JOBLING, M. Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin? **Aquaculture International**, v. 18, p. 501 – 510, 2010.

KENNEDY, G. C. The role of depot fat in hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 140, p. 578 – 592, 1953.

MANGEL, M.; MUNCH, S. B. A life-history perspective on short- and long-term consequences of compensatory growth. **The American Naturalist**, v. 166, p. 155 – 176, 2005.

McCUE, M. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology, (Part A)**, v. 156, p. 1 – 18, 2010.

NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. Fasting and starvation. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 4, p. 394 – 434, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, fourth edition, 2004.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; CYRINO, J. E. P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce intensiva**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004. p. 217 – 237.

PEREZ-JIMÉNEZ, A.; GUEDES, M. J.; MORALES, A. E.; OLIVA-TELES, A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture**, v. 265, p. 325 – 335, 2007.

PEREZ-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**, v. 38, p. 1145 – 1157, 2012.

PETERSON, B.; SMALL, B. C. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, p. 231 – 240, 2004.

POLAKOF, S.; PANSEERAT, S.; SOENGAS, J.; MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology, Part B**, v. 182, n. 8, p. 1015 – 1045, 2012.

RIOS, F. S.; MORAES, G.; OBA, E. T.; FERNANDES, M. N.; DONATTI, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding. **Journal of Comparative Physiology, Part B**, v. 176, p. 721 – 728, 2006.

RIOS, F. S.; CARVALHO, C. S.; PINHEIRO, G. H. D.; DONATTI, L.; FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 91, n. 1, p. 87 – 94, 2011.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, p. 847 – 853, 2006.

RUEDA, F. M.; MARTINEZ, F. J.; ZAMORA, S.; KENTOURI, M.; DIVANACH, P. Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture Research**, v. 29, p. 447 – 542, 1998.

SHERIDAN, M. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107 (B), p. 495 - 508, 1994.

SOUZA, V. L.; URBINATI, E. C.; GONÇALVES, D. C.; SILVA, P. C. Composição corporal e índices biométricos do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetidos a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 533 – 540, 2002.

SOUZA, V. L.; URBINATI, E. C.; MARTINS, M. I. E. G.; SILVA, P. C. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 19 – 28, 2003.

TAKAHASHI, L. S.; 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, p. 259 – 266, 2011.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora da Universidade Federal Santa Maria, UFSM, 2013. p. 206.

URBINATI, E. C.; SARMIENTO, S. J.; TAKAHASHI, L. S. Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Aquaculture**, v. 433, p. 430 – 433, 2014.

VALENTI, W. C., POLI, C. R., PEREIRA, J. A, BORGHETTI, J. R. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 399 p., 2000.

WEIL, C.; LEFEVRE, F.; BUGEON, J. Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 157 – 173, 2013.

WON, E. T.; BORSKI, R. J. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1 – 13, 2013.

WOOD, J.D., ENSER, M., FISHER, A.V., NUTE, G.R., SHEARD, P.R., RICHARDSON, R.I., HUGHES, S.I., WHITTINGTON, F.M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 78, p. 343 – 358, 2008.

XIAO, J-X.; ZHOU, F.; YIN, N.; ZHOU, J.; GAO, S.; LI, H.; SHAO, Q-J.; XU, J. Compensatory growth of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* with cyclical feed deprivation and refeeding. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 1045 – 1057, 2013.

YENGKOKPAM, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D.; KUMAR, S.; JAIN, K. K. Compensatory growth, feed intake and body composition of *Labeo rohita* fingerlings following feeding deprivation. **Aquaculture Nutrition**, v. 20 (2), p. 101 – 108, 2013.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.; BELTRAME, E. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004, p. 33.

CAPÍTULO 2

Dinâmica metabólica e desempenho de juvenis de pacu submetidos a ciclos curtos e longo de jejum e realimentação

CAPÍTULO 2 - Dinâmica metabólica e desempenho de juvenis de pacu submetidos a ciclos curtos e longo de jejum e realimentação

RESUMO – Com o objetivo de avaliar a dinâmica da mobilização energética e o desempenho produtivo, em diferentes tempos de jejum e realimentação, durante 60 dias, 450 juvenis de pacu ($41,5 \pm 12,9$ g) foram distribuídos em 18 tanques e os tratamentos utilizados foram as seguintes estratégias alimentares: peixes continuamente alimentados (grupo controle); peixes submetidos a ciclos curtos e alternados de seis dias de jejum e seis dias de realimentação (6/6) e peixes submetidos a um ciclo longo de 30 dias de jejum e 30 dias de realimentação (30/30). Os peixes foram amostrados ao final de cada fase dos ciclos para coleta de sangue, tecidos e dados de crescimento e alimentação. Em peixes de ambos os tratamentos, 6/6 e 30/30, ocorreu diminuição nas concentrações de glicose e triglicerídeos plasmáticos e glicogênio hepático, e aumento nas concentrações séricas de colesterol e ácidos graxos livres em relação ao grupo controle. Os peixes do tratamento 30/30 apresentaram menores concentrações de lipídeo hepático e muscular após o jejum. O jejum também levou a um decréscimo do índice hepatossomático (IHS) em peixes de ambos os tratamentos, provavelmente pela diminuição do glicogênio e lipídeo teciduais. Não houve mobilização de proteína muscular durante o jejum, em ambos os tratamentos. Peixes submetidos ao jejum e realimentação apresentaram rápida recuperação de suas reservas energéticas, porém as estratégias definidas neste estudo não foram suficientes para levar à resposta hiperfágica e de crescimento compensatório nos peixes.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, metabolismo energético, privação alimentar, crescimento.

1. INTRODUÇÃO

Os vertebrados diferem em sua habilidade para tolerar períodos de jejum, empregando uma ampla variedade de estratégias fisiológicas para sobreviver a essas condições (McCUE, 2010; BAR, 2014). Os peixes exibem uma extraordinária resiliência ao jejum, comparados a outros animais (BAR, 2014) e podem sobreviver

por um longo tempo sem se alimentar, como ocorre em seu ciclo natural de vida, em meses de inverno, durante a migração para desova e em estágios de pré-desova, que são períodos em que os animais naturalmente não se alimentam. Portanto, estas espécies são bem adaptadas a mobilizar suas reservas metabólicas e constituintes corporais para sobreviver aos períodos de privação alimentar (NAVARRO; GUTIERREZ, 1995).

A privação alimentar pode, também, ser aplicada artificialmente na aquicultura, como estratégia, por exemplo, para induzir o crescimento compensatório (CARUSO et al., 2012). O jejum resulta em diminuição da atividade metabólica basal e em alterações endócrinas, como a redução nas concentrações de hormônios anabólicos e aumento nas concentrações de hormônios catabólicos (HORNICK, 2000). Em muitas espécies de peixes, é possível distinguir importantes fases ao longo do período de jejum, como mudanças hormonais e fisiológicas, com significativa perda de peso corporal, mobilização de lipídeos e, em períodos mais longos, mobilização de proteínas, principalmente do músculo esquelético (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Ao iniciar a realimentação, há uma mudança no metabolismo dos peixes, aumento no consumo alimentar e/ou melhora na utilização e aproveitamento do alimento (URBINATI et al., 2014).

Há vários estudos voltados à utilização de estratégias de jejum e realimentação tanto em espécies de peixes marinhos quanto peixes de água doce, com diferentes respostas metabólicas (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2011; FURNÉ et al., 2012, PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012; XIAO et al., 2013; URBINATI et al., 2014), de crescimento (TAKAHASHI et al., 2011; XIAO et al., 2013; URBINATI et al., 2014), composição corporal (RUEDA et al., 1998; SOUZA et al., 2002) e resposta imune (LAÍZ-CARRIÓN et al., 2012; GIMBO et al., 2015). O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), peixe tropical de água doce, é um modelo muito interessante para esses estudos de jejum e realimentação, pois possui importantes estratégias fisiológicas para se adaptar a essas condições adversas. Além disto, estabelecer um manejo alimentar adequado, baseado em ciclos de jejum e realimentação (TAKAHASHI et al., 2011) é uma importante ferramenta para reduzir custos de produção e os efeitos negativos ao meio ambiente, sem afetar a eficiência produtiva dos peixes (URBINATI et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de mobilização de reservas energéticas e os aspectos produtivos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a diferentes condições de privação alimentar, ou seja, ciclos curtos e alternados de seis dias de jejum e realimentação (6/6) e ciclo longo de 30 dias de jejum e realimentação (30/30).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e condições experimentais

O presente estudo foi conduzido no Setor de Tilapicultura, do Centro de Aquicultura (CAUNESP), e no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Jaboticabal.

Foram utilizados 450 pacus juvenis, provenientes de uma piscicultura comercial da cidade de Santa Cruz da Conceição, SP, distribuídos em 18 tanques plásticos, com capacidade útil de 250 L, dispostos em um sistema de recirculação, com aeração contínua e água proveniente de poço artesiano, na densidade de 25 peixes por tanque experimental.

Após um período de aclimação de 15 dias, iniciou-se o período experimental (60 dias), em que os peixes ($41,5 \pm 12,9$ g) receberam os distintos tratamentos.

Durante o experimento, foram avaliadas semanalmente as seguintes variáveis físico-químicas da água: temperatura ($26,3 \pm 0,48$ °C), concentração de oxigênio dissolvido ($6,30 \pm 0,3$ mg L⁻¹), usando um oxímetro digital YSI (*Yellow Spring Instruments*), modelo 550A, e potencial hidrogeniônico (pH 7,4), através do uso de um peagômetro portátil, marca pH-TEK, modelo pH 100. Amostras de água foram coletadas no início e no final do período experimental para determinação da amônia total ($< 0,5$ mg L⁻¹), nitrito ($< 0,02$ mg L⁻¹) e nitrato ($< 0,7$ mg L⁻¹).

2.2. Protocolo experimental

Foram utilizadas as seguintes estratégias de alimentação (Fig. 1):

- Tratamento 6/6: peixes submetidos a ciclos de jejum durante seis dias seguidos de realimentação, até saciedade aparente, por outros seis dias.
- Tratamento 30/30: peixes submetidos a jejum durante 30 dias e posteriormente realimentados, até saciedade aparente, por 30 dias.
- Tratamento controle: peixes continuamente alimentados, até saciedade aparente, durante 60 dias.

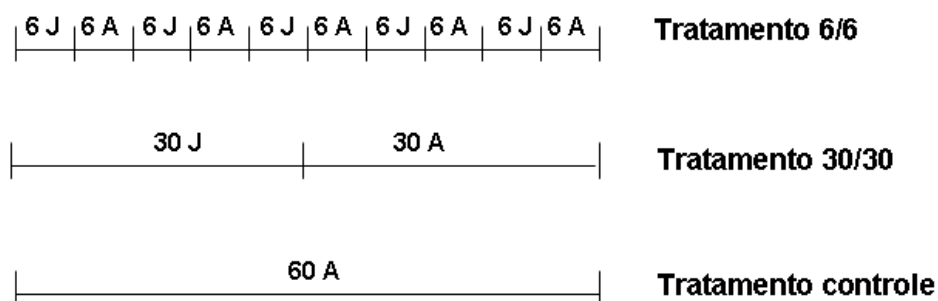


Figura 1. Estratégias de alimentação utilizadas durante 60 dias. Letra “J” corresponde ao jejum e letra “A”, corresponde ao período de alimentação.

De acordo com os tratamentos, os peixes foram alimentados às 09h 00min e 16h 00min, com dieta formulada, para atender às exigências nutricionais em proteína e energia (26% de proteína bruta e 4100 kcal kg⁻¹ de energia bruta) (ABIMORAD et al., 2007) ou submetidos ao jejum, de acordo com o tratamento correspondente. Os peixes foram alimentados até atingir a saciedade aparente, ou seja, até o momento em que os animais não buscavam mais o alimento.

Um total de 36 peixes (12 peixes de cada tratamento) foram coletados a cada seis dias durante todo o período experimental para amostragens das variáveis metabólicas. Exceção foi feita na coleta inicial de seis dias, em que foram coletados apenas 24 peixes no total, já que as condições iniciais de ambos os tratamentos 6/6 e 30/30 eram semelhantes. Para os índices de desempenho, os dados foram amostrados no início e final do período experimental (60 dias).

2.3. Dieta experimental

Os ingredientes utilizados para preparação da dieta foram finamente moídos, pesados e misturados, sendo acrescidos de água fria, processados em moedor de carne, formando “péletes” de tamanho adequado aos peixes e posteriormente colocados em estufa com circulação de ar a 55 °C para secagem. Após secagem, a dieta foi armazenada em sacos plásticos e mantida a -20 °C para conservação do produto. Na Tabela 1 encontram-se a formulação e composição da dieta preparada.

Tabela 1. Formulação e composição da dieta experimental.

Ingredientes	g kg⁻¹
Farinha de peixe	10,80
Farelo de soja	24,50
Levedura	6,00
Milho	37,62
Farelo de trigo	11,00
Quirera de arroz	4,00
Óleo de soja	1,00
Óleo de peixe	1,00
Fosfato bicálcico	2,00
Calcário	1,00
Antifúngico	0,30
Antioxidante BHT	0,03
Suplemento vitamínico e mineral ⁽¹⁾	0,50
Metionina	0,08
Lisina	0,08
Vitamina C	0,09
Composição proximal	
Matéria seca (%)	90,70
Proteína bruta (%)	26,00
Extrato etéreo (%)	6,70
Fibra bruta (%)	6,70
Cinzas (%)	4,90
Extrato não nitrogenado ⁽²⁾ (%)	46,4
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4100,3

⁽¹⁾ Concentrações de garantia por kg do produto: Vit. A (500.000 UI); Vit. D3 (200.000 UI); Vit. E (5.000 UI); Vit. B1 (1.500 mg); Vit. B2 (4.000 mg); Vit. B6 (1.500 mg); Vit. C (350.000 mg); Vit. K3 (15.000 mg); Ac. Fólico (500 mg); Ac. Pantotênico (4.000 mg); Biotina (50 mg); Cobalto (10 mg); Cobre (500 mg); Ferro (5.000 mg); Inositol (1.000 mg); Iodo (50 mg); Manganês (1.500 mg); Nicotinamida (7.000 mg); Selênio (10 mg); Zinco (5.000 mg); B.H.T. (12.500 mg); Colina (40.000 mg); Veículo q.s.p. (1.000 mg). ⁽²⁾ Extrativo não nitrogenado = Matéria seca - (proteína bruta + extrato etéreo + fibra bruta + cinzas).

Semanalmente, foi registrada a quantidade de dieta consumida em cada tanque experimental.

2.4. Variáveis sanguíneas

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (1 g / 10 L de água) e pesados individualmente. A coleta de sangue, por punção da veia caudal dos animais, foi realizada da seguinte forma:

- Plasma: uma alíquota do sangue foi colocada em microtubos de 2,0 mL, contendo 10 µl de solução anticoagulante EDTA e fluoreto de potássio (Glistab, Kit Labtest) para separação do plasma. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos à 3000 RPM e 4 °C (centrífuga ALC International, modelo PK121 R) e o plasma retirado para determinação de glicose e triglicerídeos por método enzimático (Kit Labtest, códigos 84 e 87, respectivamente).

- Soro: alíquotas restantes de sangue foram colocadas em microtubos de 2,0 mL, sem anticoagulante, para separação do soro. As amostras foram deixadas em repouso durante três horas, à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugadas a 3000 RPM, durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga ALC International, modelo PK121 R). O soro separado foi utilizado para determinação das concentrações de proteínas totais (metodologia do Biureto, Kit Labtest, código 99), colesterol (precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, Kit Labtest, código 76) e ácidos graxos não esterificados (NEFA, Kit Randox, código FA 115), por métodos enzimáticos.

2.5. Amostras de tecidos para análise e cálculo dos índices morfo-somáticos

Os peixes foram eutanasiados e laparotomizados para remoção do fígado, retirada de amostras de músculo branco e da gordura visceral. O fígado foi pesado para o cálculo do índice hepatossomático (IHS) e congelado a -20 °C para determinação do lipídeo total (BLIGH; DYER, 1959) e glicogênio (MOON et al., 1989). Amostras de músculo branco foram retiradas e congeladas a -20 °C para determinação da proteína total (BRADFORD, 1976) e lipídeo total (BLIGH; DYER, 1959). Além disso, realizou-se a retirada de toda a gordura da cavidade abdominal dos peixes para pesagem e posterior cálculo do índice gordura víscero-somático (IGVS).

- Índice hepatossomático (%) = (Peso fígado / peso corporal) x 100
- Índice gordura víscero-somático (%) = (Peso gordura visceral / Peso corporal) x 100

2.6. Desempenho produtivo

Para avaliar os parâmetros de desempenho produtivo, 12 peixes de cada tratamento foram amostrados, a cada seis dias (2 peixes/tanque), para determinação do peso corporal. Foram avaliados o consumo de dieta por peixe, o ganho em peso, a conversão alimentar, a taxa de crescimento específico, a taxa de eficiência protéica e o fator de condição (K).

2.7. Análise estatística

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), constituído por três tratamentos e seis repetições. A normalidade dos dados (Cramer Von Mises) e a homogeneidade das variâncias (Brown-Forsythe) foram testadas antes da aplicação da análise de variância (ANOVA). Alguns dados precisaram ser transformados, como: glicose e triglicerídeo plasmáticos em $\log_{10}$, colesterol sérico em raiz quadrada, lipídeo muscular em $1/\text{raiz quadrada}$, consumo, ganho em peso e conversão alimentar em $\log_{10}$. Quando encontradas diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de *Duncan*, ao nível de 5% de significância, pelo programa estatístico SAS (*Statistical Analyses System*), versão 9.0. Os gráficos foram elaborados pelo programa de software *GraphPad Prism 5*.

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis metabólicas sanguíneas

A Figura 1 apresenta os resultados das variáveis metabólicas sanguíneas. Enquanto os peixes do grupo controle mantiveram estáveis as concentrações de

glicose no plasma (Fig. 1A), os peixes do tratamento 6/6 apresentaram flutuações (redução e aumento) nas concentrações associadas às fases de privação alimentar e realimentação, respectivamente. Já nos peixes do tratamento 30/30, a glicose se manteve significativamente mais baixa que nos outros grupos de peixes durante a falta de alimento, mostrando recuperação na realimentação. As concentrações atingidas ultrapassaram os valores observados nos outros peixes durante os 12 primeiros dias de realimentação.

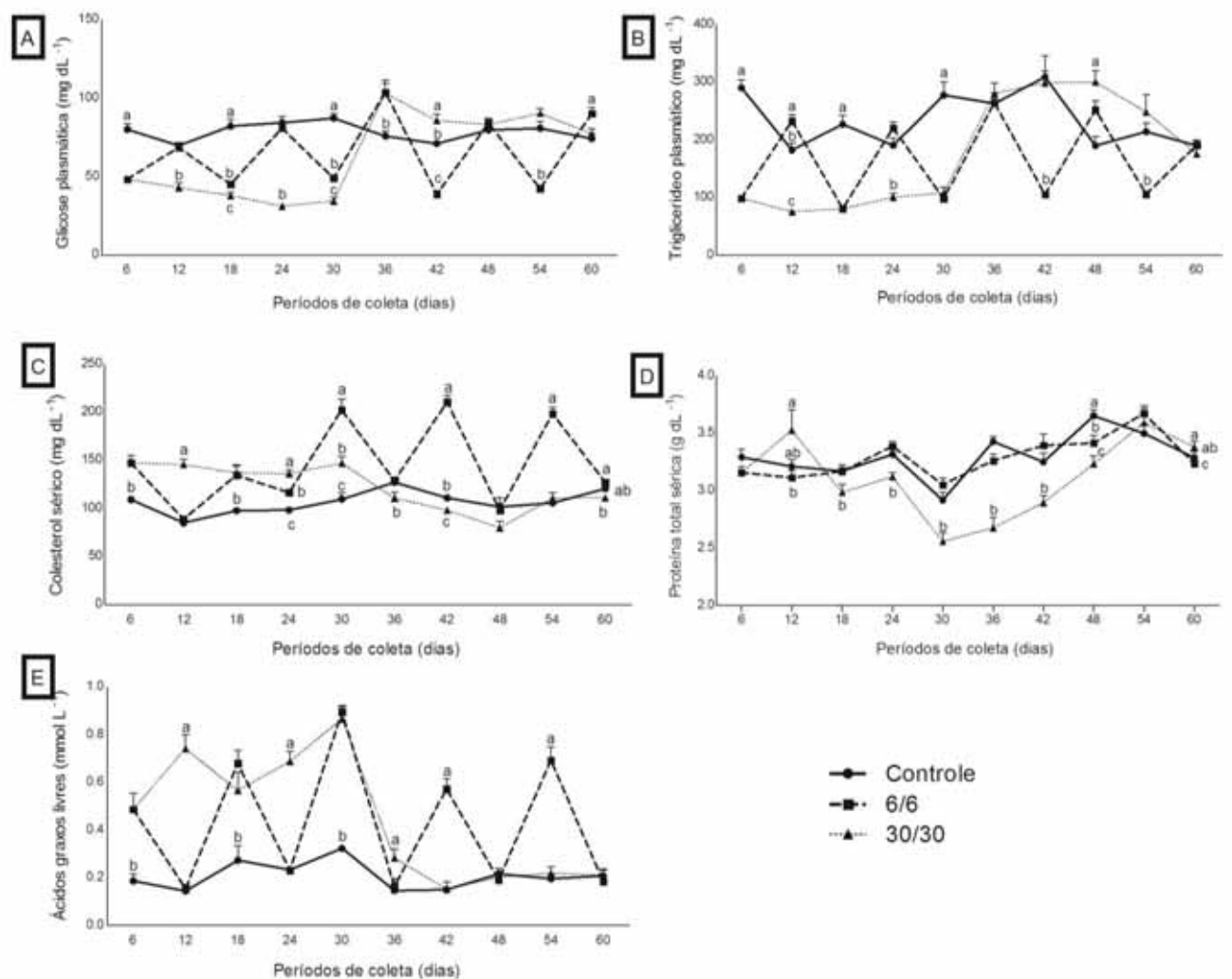


Figura 2. Glicose (mg dL⁻¹) (A) e triglicerídeo plasmáticos (mg dL⁻¹) (B), colesterol (mg dL⁻¹) (C) e proteína total séricos (g dL⁻¹) (D) e ácidos graxos livres (mmol L⁻¹) (E) em pacu submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias. Controle (continuamente alimentados), 6/6 (ciclos curtos de jejum a cada seis dias e realimentação por mais seis dias), 30/30 (ciclo longo de jejum de 30 dias e realimentação durante mais 30 dias). Letras comparam os tratamentos em cada período de coleta (P < 0,05). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 12).

O perfil das concentrações de triglicerídeos no plasma foi muito semelhante ao observado para a glicose (Fig. 1B), com estabilidade no grupo controle, flutuações no grupo 6/6 e recuperação das concentrações na realimentação no grupo 30/30. Em relação ao colesterol sérico (Figura 1C), há uma estabilidade nas concentrações do metabólito nos peixes do grupo controle, enquanto oscilações, com elevação e redução, são observadas nos peixes do grupo 6/6, associadas às fases de privação e realimentação, respectivamente. Já nos peixes do grupo 30/30, valores mais elevados que do grupo controle são observados durante a privação alimentar, com redução após a realimentação.

Em relação à proteína sérica (Fig. 2D), concentrações mais baixas são observadas nos peixes do tratamento 30/30 ao final do período de privação alimentar, com recuperação gradual até o final da realimentação (54 dias experimentais) quando os valores dos 3 grupos de peixes se igualam.

As concentrações de ácidos graxos livres (Fig. 2E) mostraram um perfil claro associado às fases dos ciclos de privação alimentar e realimentação. Enquanto no grupo controle não foram observadas mudanças nas concentrações, no grupo 6/6 estas oscilaram, aumentando na fase de jejum e reduzindo na fase de realimentação. Também no grupo 30/30, as concentrações elevadas, e significativamente diferentes das do grupo controle, foram observadas durante a ausência do alimento.

3.2. Variáveis metabólicas teciduais

Na Figura 2 são observadas as variáveis metabólicas teciduais. Foram avaliadas as reservas energéticas do fígado (glicogênio e lipídeos) e músculo branco (lipídeos e proteína) dos peixes submetidos a três estratégias alimentares.

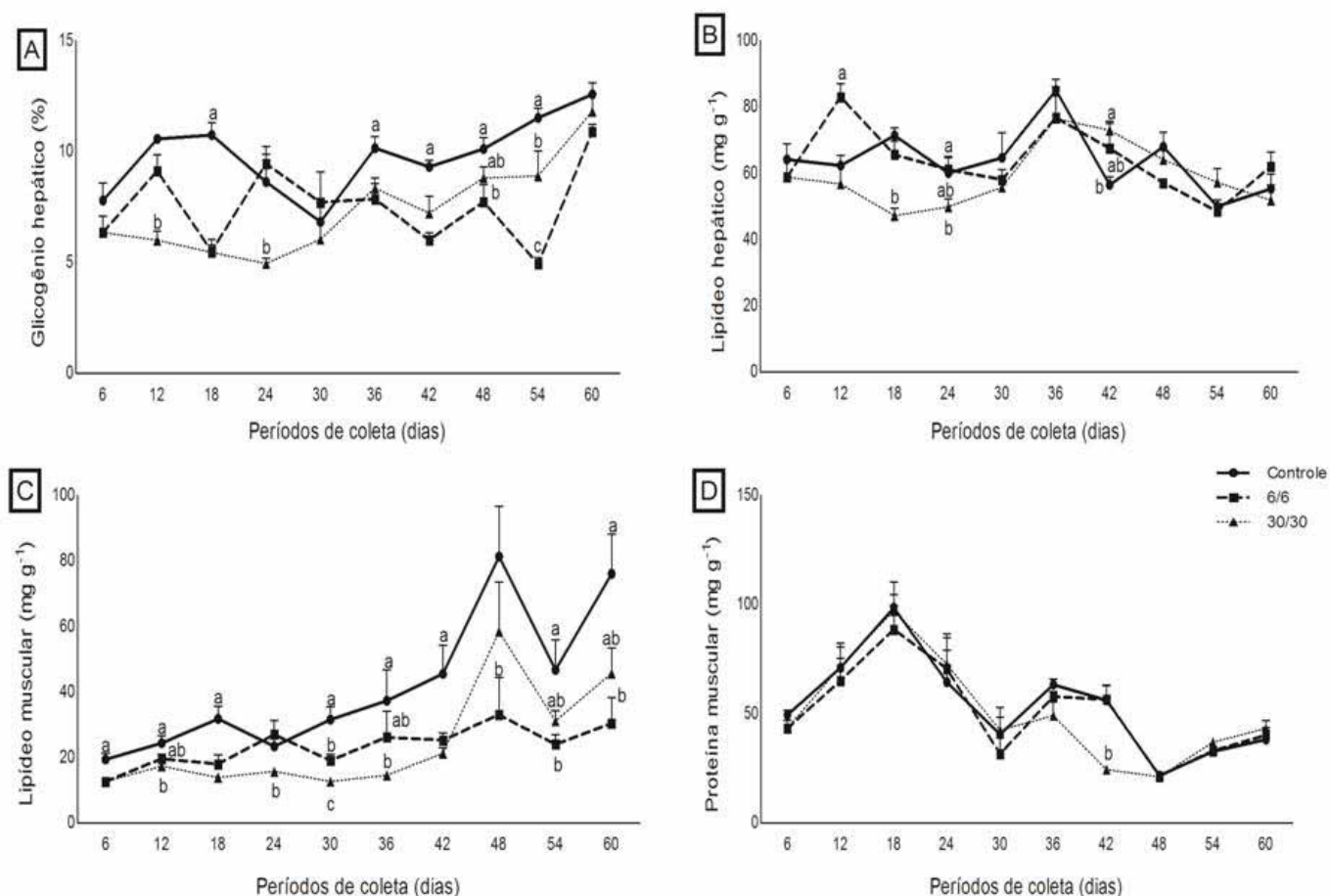


Figura 3. Glicogênio (%) (A) (n = 8) e lipídeo hepático (mg g⁻¹) (B) (n = 6), lipídeo (mg g⁻¹) (C) (n = 6) e proteína musculares (mg g⁻¹) (D) (n = 8) em pacus submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias. Controle (continuamente alimentados), 6/6 (ciclos curtos de jejum a cada seis dias e realimentação por mais seis dias), 30/30 (ciclo longo de jejum de 30 dias e realimentação durante mais 30 dias). Letras comparam os tratamentos em cada período de coleta (P < 0,05). Barras verticais representam o erro padrão da média.

As concentrações de glicogênio hepático (Fig. 3A) refletem as fases dos ciclos de jejum e realimentação. Nos peixes do tratamento 6/6 ocorrem periodicamente redução das concentrações no jejum e elevação na realimentação. Da mesma forma, no ciclo longo de jejum (30 dias) são observadas as menores concentrações do glicogênio, que vão se recuperar a partir da amostragem do dia 42, 6 dias após o início da realimentação. Ao final do tempo experimental, as concentrações se igualam em todos os grupos de peixes.

As concentrações de lipídeo hepático (Fig. 3B) também acompanham as diferentes fases dos ciclos alimentares aplicados nos peixes, com as menores concentrações nas fases de ausência de alimento e recuperação na realimentação.

As reservas de lipídeo muscular (Fig. 3C) refletiram, de forma geral, as mudanças de ausência ou presença do alimento durante os ciclos alimentares, com concentrações mais baixas nos peixes durante o jejum e elevação na realimentação.

O perfil das concentrações de proteína muscular praticamente não foi alterado com as diferentes estratégias alimentares (Figura 2D). Não houve diferença significativa entre os tratamentos, exceto aos 42 dias, em que os peixes do grupo 30/30 apresentaram menores concentrações protéicas em relação ao controle e ao tratamento 6/6.

3.3. Índices biométricos

Os índices hepatossomático (IHS) e gordura víscero-somática (IGVS) podem variar de acordo com alterações na utilização de energia pelo animal. Observa-se (Figura 3A) que os peixes dos tratamentos que passaram pelo jejum apresentaram redução significativa do IHS, ao final de cada fase de restrição dos ciclos, com recuperação nas fases de realimentação, chegando a ultrapassar os valores dos peixes controle, continuamente alimentados. Os valores do IHS foram, em geral, mais elevados nos peixes do tratamento 30/30.

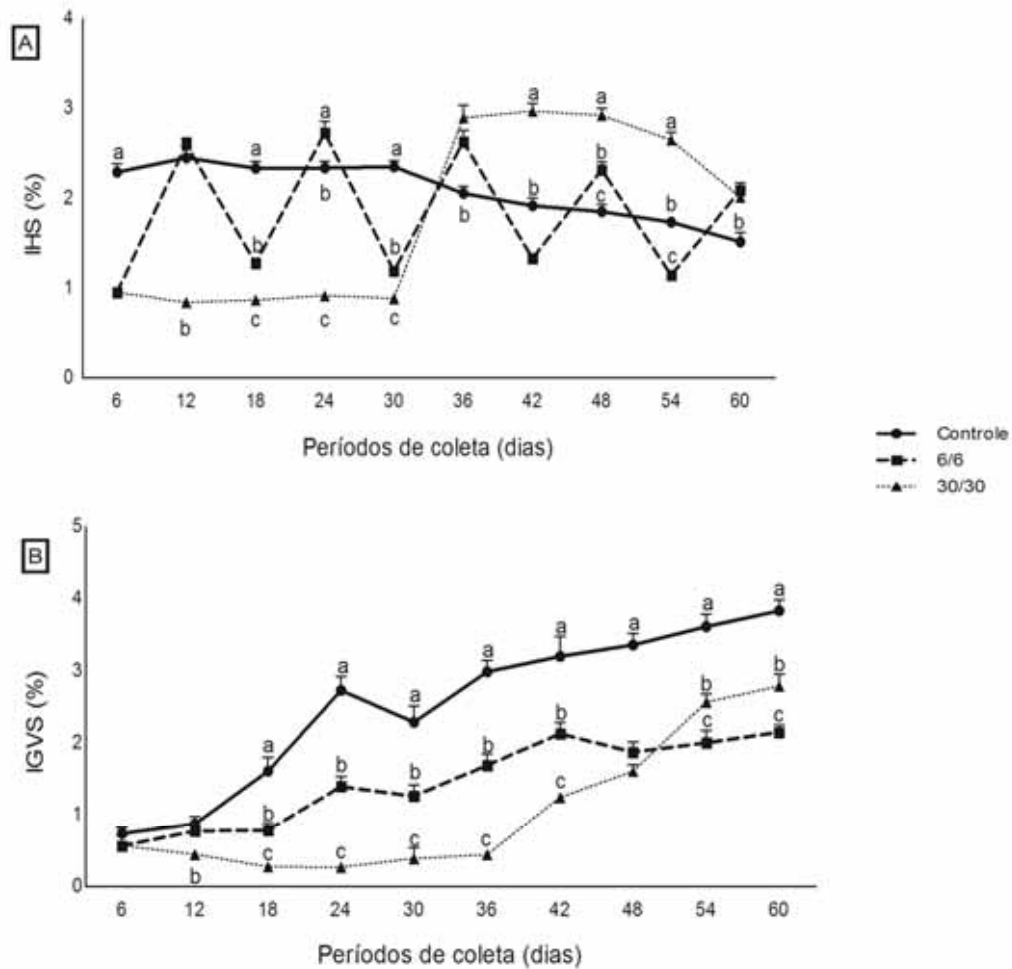


Figura 4. Índice hepatossomático (%) (IHS) (A) e índice gordura víscero-somática (%) (B) (IGVS) em pacus submetidos a três estratégias alimentares durante 60 dias. Controle (continuamente alimentados), 6/6 (ciclos curtos de jejum a cada seis dias e realimentação por mais seis dias), 30/30 (ciclo longo de jejum de 30 dias e realimentação durante mais 30 dias). Letras comparam os tratamentos em cada período de coleta ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 12$).

Nos peixes controle, o depósito de gordura visceral (Figura 3B) aumentou gradualmente, bem como nos peixes do tratamento 6/6, embora em valores significativamente mais baixos a partir do 3º ciclo, ou seja, 18 dias de tratamento. Já nos peixes do tratamento 30/30, o índice diminuiu aos 12 e 18 dias e iniciou recuperação a partir de 36 dias, ultrapassando os valores dos peixes 6/6 nas duas

últimas amostragens, embora nenhum tenha alcançado os valores observados no grupo controle.

3.4. Variáveis de desempenho

Os resultados das variáveis de desempenho são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis de desempenho aos 60 dias de experimento

	Tratamentos			ANOVA Valores de <i>P</i>
	Controle	6/6	30/30	
Ganho em peso ¹ (g)	47,12 ± 6,08 a	16,46 ± 4,16 b	15,29 ± 2,96 b	0,002
Taxa de crescimento espec. ² (% dia ⁻¹)	1,24 ± 0,09 a	0,52 ± 0,11 b	0,51 ± 0,09 b	0,0001
Consumo de dieta por peixe (g)	88,59 ± 6,58 a	48,80 ± 2,82 b	50,01 ± 2,18 b	< 0,0001
Conversão alimentar aparente ³	1,95 ± 0,15 b	3,27 ± 0,71 a	3,80 ± 0,61 a	0,0396
Taxa de eficiência protéica ⁴ (%)	2,02 ± 0,17 a	1,07 ± 0,28 b	1,17 ± 0,21 b	0,0137
Fator de condição ⁵	1,91 ± 0,04	1,97 ± 0,03	2,03 ± 0,05	0,1492

¹Ganho em peso = peso final – peso inicial

²Taxa de crescimento específico (TCE) = $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias} \times 100$

³Conversão alimentar aparente (CAA) = consumo de dieta / ganho em peso

⁴Taxa de eficiência protéica (TEP) = ganho em peso / consumo de proteína

⁵Fator de condição (K) = $[\text{peso corporal} / (\text{comprimento})^3] \times 100$

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem estatisticamente entre si (Duncan $P < 0,05$)

Valores representam as médias ± erro padrão (n = 6)

Em relação aos resultados de desempenho, observa-se que os peixes de ambos os tratamentos em jejum (6/6 e 30/30) apresentaram valores significativamente menores de ganho em peso e consumo e menores taxas de crescimento específico e eficiência protéica, além de pior conversão alimentar após os 60 dias experimentais. No entanto, o fator de condição (K) não diferiu significativamente entre os tratamentos avaliados.

4. DISCUSSÃO

4.1. Respostas metabólicas

Muitos são os estudos relacionados ao metabolismo energético e crescimento em diversas espécies de peixes submetidas a períodos longos ou curtos de jejum e realimentação (URBINATI et al., 2014; PERES et al., 2014; KIM et al., 2014;

HOSEINI et al., 2014; VIEGAS et al., 2013; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012; GODAVARTHY et al., 2012; FURNÉ et al., 2012; CARUSO et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2011; COSTAS et al., 2011; CHATZIFOTIS et al., 2011), porém, os efeitos fisiológicos do jejum variam consideravelmente em relação às diferentes espécies, assim como a idade dos peixes e o comprimento do período de privação alimentar (CARUSO et al., 2010). O pacu é uma espécie de grande interesse para esses estudos, pois possui importantes estratégias fisiológicas para enfrentar os períodos de privação alimentar por estar adaptado a mobilizar suas reservas endógenas para sobreviver às condições de escassez de alimento no seu ambiente natural ou mesmo em cativeiro.

A glicose é considerada um dos principais metabólitos em peixes e suas concentrações podem oscilar com os períodos de jejum e realimentação (BLASCO et al., 1992). No presente estudo, os tratamentos em jejum apresentaram uma redução na glicose plasmática em relação ao grupo controle, porém essas concentrações foram mantidas ao longo do período de privação alimentar, sem apresentar esgotamento total de suas reservas. Caruso et al. (2012), Costas et al. (2011) e Chatzifotis et al. (2011) não encontraram diferenças nas concentrações glicêmicas em *Pagrus pagrus*, *Senegalese sole* e *Dicentrarchus labrax*, respectivamente, alimentados continuamente ou sob condições de jejum. Kim et al. (2014) afirmam que essas e outras espécies, como o *Paralichthys olivaceus*, podem ter apresentado uma reorganização metabólica para manter suas concentrações glicêmicas mesmo sem a presença do alimento. Em muitas espécies em jejum, essa manutenção dos requerimentos de glicose está relacionada ao aumento da quebra do glicogênio em glicose (glicogenólise) e síntese *de novo* de glicose, por meio da gliconeogênese (a partir do lactato, glicerol ou alguns aminoácidos) (KIM et al., 2014; POLAKOF et al., 2012; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007; SMUTNÁ et al., 2002).

O glicogênio é a forma de carboidrato estocado no fígado e, quando necessário, é quebrado enzimaticamente e transportado para tecidos extra-hepáticos na forma de glicose (NAVARRO e GUTIERREZ, 1995). Em muitas espécies, o glicogênio é uma reserva energética prontamente disponível, sendo mobilizado logo no início do jejum para manutenção da homeostase glicêmica (FURNÉ et al., 2012; BARCELLOS et al., 2010; METÓN et al., 2003; PERES et al.,

1999; HUNG et al., 1997), como observado no presente estudo com o pacu, em que houve uma diminuição das reservas de glicogênio já nos primeiros seis dias de jejum. Peres et al. (2014) também encontraram uma significativa redução nos depósitos de glicogênio em *Dicentrarchus labrax* durante períodos de jejum menores que 14 dias, enquanto que as reservas de gordura perivisceral foram preservadas. Costas et al. (2011) afirmam que os peixes onívoros, sob situações de privação alimentar, conservam seus estoques de proteínas e lipídeos mobilizando primeiramente o glicogênio. Entretanto, outras espécies de mesmo hábito alimentar, como *Cyprinus carpio* preservam os estoques de glicogênio, degradando proteínas para gliconeogênese e utilizando lipídeos como substratos energéticos (NAVARRO e GUTIÉRREZ, 1995).

Similar ao glicogênio houve também uma diminuição nas concentrações de lipídeo hepático, especialmente no tratamento 30/30, submetido a um ciclo longo de jejum. Como encontrado em outros estudos (TAKAHASHI et al., 2011, em *Piaractus mesopotamicus*; CHATZIFOTIS et al., 2011 e PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007, em *Dicentrarchus labrax*) a mobilização destas reservas hepáticas durante o jejum refletiu na perda de peso do fígado e, conseqüentemente na diminuição do IHS. Furné et al. (2012) também observaram uma diminuição do lipídeo hepático em *Acipenser naccarii* submetido a 72 dias de jejum, mas não encontraram diferenças nas concentrações desse metabólito em *Oncorhynchus mykiss* no mesmo período de jejum. Os autores afirmam que a utilização do lipídeo como fonte de energia durante a privação alimentar é dependente da espécie e também das reservas de lipídeos no tecido e da estratégia utilizada para mobilizar outras reservas, como os carboidratos. Matrinxãs (*Brycon amazonicus*) submetidas a curtos períodos de privação alimentar e realimentação apresentaram mobilização lipídica durante o jejum, caracterizada pela diminuição dos lipídeos no fígado, porém suas reservas de glicogênio hepático foram preservadas (URBINATI et al., 2014).

As concentrações de triglicerídeos plasmáticos, colesterol e ácidos graxos livres séricos nos tratamentos em jejum diferiram do tratamento controle neste estudo. Os períodos de jejum foram marcados pela diminuição dos triglicerídeos plasmáticos, fato também observado em outros estudos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012; LAIZ-CARRIÓN et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2011; COSTAS et al., 2011;

HUNG et al., 1997) e pelo aumento expressivo do colesterol e ácidos graxos livres no soro. A diminuição das concentrações de triglicerídeos durante o jejum reflete a falta de lipídeos provenientes do alimento (HUNG et al., 1997) e à sua utilização como substrato energético e ativação da lipólise para compensar a queda nas concentrações glicêmicas (HOSEINI et al., 2014; PEREZ-JIMÉNEZ et al., 2007). Segundo PERES et al. (2014), os triglicerídeos, mobilizados principalmente no início do jejum, são considerados como marcadores da condição nutricional do animal.

De acordo com Weil et al. (2013), os principais depósitos de lipídeos em peixes estão localizados no tecido adiposo, músculo e fígado e são espécie-dependentes. Observa-se neste estudo que, independente da estratégia de jejum utilizada (6/6 ou 30/30), houve diminuição do índice de gordura víscero-somática (IGVS), diminuição nas concentrações de lipídeo muscular e aumento nas concentrações de ácidos graxos livres no soro em relação aos peixes continuamente alimentados, resultado da quebra e mobilização de triglicerídeos destes tecidos. Takahashi et al. (2011) também encontraram diminuição do lipídeo muscular e do IGVS e maior concentração de ácidos graxos livres no plasma em pacus submetidos a ciclos repetidos de jejum e realimentação durante 36 dias. Segundo Holm et al. (2000), os lipídeos, transportados pelo sangue principalmente na forma de triglicerídeos, por meio de lipoproteínas, são hidrolisados com a ajuda da enzima *hormone-sensitive lipase* (HSL), em diacilgliceróis e, em seguida, em monoacilgliceróis. Posteriormente, com a participação da enzima *monoglyceride lipase* (MGL) ocorre a última etapa, em que uma molécula de triglicerídeo leva à produção de três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol.

Ambas as estratégias de alimentação promoveram aumento nas concentrações de colesterol circulante. Em peixes, assim como em mamíferos, o colesterol pode ser obtido da dieta ou sintetizado *de novo*, principalmente no fígado e intestino (BERG et al., 2002; MAITA et al., 2006). Em situações normais de alimentação, o colesterol endógeno é diretamente regulado pelos níveis de colesterol presentes na dieta. Assim, um consumo elevado de alimento leva ao decréscimo na produção de colesterol endógeno. Por outro lado, o jejum promove um aumento dos níveis circulantes de colesterol devido ao estímulo da síntese endógena (BERG et al., 2002). O efeito do jejum nas concentrações de colesterol é

divergente, pois vários estudos com peixes têm apresentado diferentes respostas como aumento ou decréscimo do colesterol ao longo da privação (KIM et al., 2014). Godavarthy et al. (2012) encontraram um aumento do colesterol nos rins, cérebro, músculo e fígado de *Anabas testudineus* submetidos a 60 dias de jejum. Já em *Oncorhynchus mykiss* (HEMING e PALECZNY, 1987), *Salmo trutta* (REGOST et al., 2001) e *Acipenser naccari* e *Oncorhynchus mykiss* (FURNÉ et al., 2012) houve decréscimo no colesterol sérico ao longo do jejum. Segundo Figueiroa et al. (2000), a concentração desse metabólito pode variar dependendo da duração do período de privação alimentar ao qual o animal é submetido.

Ashouri et al. (2013) não observaram alterações nas concentrações de proteína total no plasma de *Acipenser baerii* após períodos de privação alimentar de 0, 2, 4 e 8 dias, afirmando que o período de jejum utilizado não é suficiente para que as reservas de glicogênio hepático e lipídeos sejam totalmente consumidas e ocorra proteólise. Entretanto, Shi et al. (2010) encontraram redução na proteína sanguínea em *Acipenser schrenckii* com apenas dois dias de jejum e afirmam que cada espécie apresenta respostas distintas na utilização destes metabólitos. No presente estudo houve diminuição nas concentrações de proteína total sérica no tratamento submetido a um longo período de jejum, quando comparado ao grupo controle, porém, essa queda ocorreu somente a partir dos 18 dias de jejum. Outros estudos também apresentaram uma redução significativa nas concentrações de proteína total no sangue em diferentes espécies submetidas a períodos prolongados de jejum (PERES et al, 2014; PERES et al., 2013; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012; COSTAS et al., 2011).

Os períodos curtos e longo de jejum não foram suficientes para que houvesse quebra da proteína muscular e sua posterior utilização como fonte energética para os pacus. Esses resultados corroboram aos encontrados por Takahashi et al. (2011), com a mesma espécie, e por Hung et al. (1997), em que *Acipenser transmontanus* submetidos a 10 semanas de jejum apresentaram uma maior mobilização de nutrientes provenientes das vísceras e fígado quando comparados à mobilização de proteínas no músculo branco. Os autores afirmam que a espécie pode melhor conservar sua proteína muscular quando comparada aos lipídeos durante o jejum.

A realimentação foi marcada por grande parte do restabelecimento das reservas energéticas plasmáticas e séricas, reservas teciduais e índices biométricos. Períodos de seis dias de realimentação, como observado no tratamento 6/6, foram suficientes para uma recuperação completa das reservas de glicose e triglicerídeos plasmáticos, que diminuíram durante a privação alimentar. Além disso, as concentrações de colesterol e de ácidos graxos livres foram menores durante a realimentação em ambos os tratamentos 6/6 e 30/30, atingindo valores próximos ao grupo controle. Furné et al. (2012) encontraram uma recuperação das reservas hepáticas e variáveis plasmáticas (glicose e colesterol) em *Acipenser naccarii* e *Oncorhynchus mykiss* realimentadas, após um período de 72 dias de jejum. Os autores afirmam que essa recuperação é proveniente do restabelecimento das atividades enzimáticas, diminuídas durante o jejum. Os peixes que foram submetidos a um período longo de jejum apresentaram uma recuperação nas concentrações de proteína total sérica, porém somente aos 24 dias de realimentação (54 dias experimentais).

As reservas de glicogênio hepático aumentaram em quase todos os períodos de realimentação em ambos os tratamentos 6/6 e 30/30. Porém, somente em determinados períodos esses estoques alcançaram o grupo continuamente alimentado, como também observado no estudo de Souza et al. (2002), com pacus submetidos a ciclos alternados de jejum e realimentação. Segundo Takahashi et al. (2011), a alta disponibilidade de carboidratos presentes na dieta pode explicar essa recuperação durante os períodos de realimentação da espécie. Já Barcellos et al. (2010) afirmam que a recuperação momentânea do glicogênio em peixes realimentados após o jejum parece ser uma tática do animal por um rápido estoque energético para posterior utilização na síntese de material corpóreo.

Além do aumento das reservas de glicogênio hepático, em ambos os tratamentos realimentados, e de lipídeo hepático, observado principalmente no tratamento 30/30, a realimentação levou à elevação do IHS. De acordo com Takahashi et al. (2011), esses aumentos sugerem uma resposta metabólica compensatória do fígado em restaurar seus estoques energéticos durante os períodos de realimentação. Esses resultados corroboram aos encontrados em outros

estudos com pacus (TAKAHASHI et al., 2011) e com outras espécies (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007; METÓN et al., 2003; BLACK e LOVE, 1986).

Os depósitos de gordura visceral (IGVS) aumentaram com a realimentação, porém, em ambos os tratamentos submetidos ao jejum, os períodos de realimentação adotados não foram suficientes para que essas reservas fossem recuperadas completamente e alcançassem os mesmos índices do grupo controle. De acordo com Souza et al. (2002), a recuperação dos estoques de gordura mesentérica é mais lenta, sendo as reservas hepáticas utilizadas primeiramente. No presente estudo, as concentrações de lipídeo muscular do tratamento 30/30 aumentaram a partir de 12 dias de realimentação (aos 42 dias de experimento), superando o tratamento 6/6 e alcançando valores próximos ao grupo controle. Pérez-Jiménez et al. (2012) encontraram um decréscimo no IGVS em *Dentex dentex* submetido a jejum durante cinco semanas e realimentado por três semanas, e também uma recuperação dos estoques de lipídeo muscular. Os autores afirmam sobre a importância das estratégias de jejum na melhoria da qualidade final do produto oferecido ao consumidor, uma vez que essas estratégias influenciem a composição muscular e os depósitos de gordura em peixes.

4.2. Desempenho

Em muitas espécies de peixes que passam por períodos de jejum, a taxa de crescimento durante a realimentação pode ser maior que nos animais continuamente alimentados (URBINATI et al., 2014; XIAO et al., 2013; YARMOHAMMADI et al., 2012; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012; CHO, 2005; RUEDA et al., 1998). No presente estudo, os peixes que foram submetidos a ciclos curtos ou longo de jejum e posteriormente realimentados, não apresentaram crescimento compensatório. Aos 60 dias experimentais, os peixes continuamente alimentados apresentaram uma melhor conversão alimentar, além de maior ganho em peso (GP) e maiores taxas de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência protéica (TEP), em relação aos grupos submetidos ao jejum.

Segundo Urbinati et al. (2014), o crescimento compensatório pode ser causado por vários mecanismos que são disparados durante os períodos de

realimentação, como o decréscimo no custo metabólico, o aumento do consumo, também conhecido como hiperfagia, e a melhor utilização do alimento. Como observado no presente estudo, ambos os tratamentos submetidos ao jejum e posteriormente realimentados (6/6 e 30/30) não apresentaram aumento do consumo e nem melhor utilização do alimento, já que as taxas de eficiência protéica (TEP), por exemplo, também foram menores em relação ao tratamento controle, considerando-se um período total de 60 dias experimentais. Takahashi et al. (2011) também não encontraram crescimento compensatório em pacus submetidos a ciclos alternados de três dias de jejum e três dias de realimentação (à vontade ou controlada). Entretanto, esses peixes obtiveram respostas hiperfágicas, por meio da maior ingestão de dieta em relação ao grupo continuamente alimentado durante 36 dias.

De acordo com Ali et al. (2003), o crescimento compensatório em peixes é dependente de vários fatores, como os protocolos alimentares utilizados (comprimento e intensidade da privação alimentar), a influência de fatores sociais, como densidade de estocagem e interações sociais, variações climáticas, entre outros. A utilização de ciclos curtos de apenas dois dias de jejum e 3 ou 4 dias de realimentação levou a um crescimento compensatório completo em *Brycon amazonicus* (URBINATI et al., 2014) em consequência do aumento no consumo de alimento durante a realimentação. Os autores observaram uma economia de quase 40% no fornecimento de alimento, afirmando a importância na melhora com o manejo desta espécie e a sustentabilidade no processo de cultivo. Já Xiao et al. (2013) aplicaram um protocolo alimentar em black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) baseado em grupos continuamente alimentados e grupos submetidos à privação alimentar por 1, 2, 3 e 4 dias e posteriormente realimentados nos dias remanescentes da semana, durante oito semanas. Os autores afirmam que o grau do crescimento compensatório para a espécie é dependente do comprimento da privação alimentar, pois curtos períodos de jejum (1 e 2 dias) resultaram em compensação completa, enquanto que períodos mais longos não foram adequados para os peixes alcançarem o peso do grupo controle, mesmo com todos os tratamentos apresentando respostas hiperfágicas durante a realimentação.

Alguns autores (TAKAHASHI et al., 2011; HEIDE et al., 2006) sugerem que a principal razão pela falta de compensação no crescimento, como ocorrido neste estudo, ou o crescimento parcial dos animais, como observado em *Hippoglossus hippoglossus* (HEIDE et al., 2006), está ligado aos períodos pós-jejum definidos em cada protocolo alimentar, considerados insuficientes para permitir que os peixes alcancem o peso dos grupos continuamente alimentados ou apresentem crescimento compensatório total.

5. CONCLUSÕES

- Em ambos os ciclos de jejum e realimentação, os peixes mobilizaram e reestocaram os mesmos substratos energéticos.
- Ao final dos ciclos de jejum e realimentação, exceto pelo lipídeo muscular e visceral, as reservas energéticas dos peixes experimentais se igualaram às dos peixes controle, mostrando habilidade do pacu na recuperação da homeostase metabólica.
- O tecido adiposo foi a principal fonte de energia do pacu em condições de balanço energético negativo.
- Os tempos de realimentação estabelecidos em ambos os ciclos não foram suficientes para a recuperação do crescimento dos peixes.

6. REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E. G.; SQUASSONI, G. H.; CARNEIRO, D. J. Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 374 – 380, 2008.

ALI, M., NICIEZA, A., WOOTTON, R.J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries**, v. 4, p. 147 – 190, 2003.

ASHOURI, G.; YAVARI, V.; BAHMANI, M.; YAZDANI, M. A.; KAZEMI, R.; MORSHEDI, V.; FATOLLAHI, M. The effect of short-term starvation on some physiological and morphological parameters in juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 43, p. 145 – 150, 2013.

BAR, N. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 71, p. 1 – 12, 2014.

BARCELLOS, L. J. G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 300, p. 231 – 236, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. The complex regulation of cholesterol biosynthesis takes place at several levels. In: BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*, 5th Edition, 2002.

BLACK, D.; LOVE, M. R. The sequential mobilization and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 156, p. 469 – 479, 1986.

BLASCO, J.; FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 162, p. 539 – 546, 1992.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v. 37, p. 911 – 917, 1959.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

CARUSO, G.; MARICCHIOLO, G.; MICALE, V.; GENOVESE, L.; CARUSO, R.; DENARO, M. G. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 71 – 83, 2010.

CARUSO, G.; DENARO, M. G.; CARUSO, R.; GENOVESE, L.; MANCARI, F.; MARICCHIOLO, G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. **Marine Environmental Research**, v. 81, p. 18 – 25, 2012.

CHATZIFOTIS, S.; PAPADAKI, M.; DESPOTI, S.; ROUFIDOU, C.; ANTONOPOULOU, E. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 316, p. 53 – 59, 2011.

CHO, S. H. Compensatory growth of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* L. and changes in biochemical composition and body condition indices during starvation and after refeeding in winter season. **Journal of Aquaculture Society**, v. 36 (4), p. 508 – 514, 2005.

COSTAS, B.; ARAGÃO, C.; RUIZ-JARABO, I.; VARGAS-CHACOFF, L.; ARJONA, F. J.; DINIS, M. T.; MANCERA, J. M.; CONCEIÇÃO, L. E. C. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1958) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 495 – 504, 2011.

FIGUEIROA, R. Y.; RODRÍGUEZ-SABARÍS, R.; ALDEGUNDE, M.; SOENGAS, J. L. Effects of food deprivation on 24 h-changes in brain and liver carbohydrates and ketone body metabolism of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 631 – 646, 2000.

FURNÉ, M.; MORALES, A. E.; TRENZADO, C. E.; GARCÍA-GALLEGO, M.; HIDALGO, M. C.; DOMEZAIN, A.; RUS, A. S. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 182, p. 63 – 76, 2012.

GIMBO, R. Y.; FAVERO, G. C.; FRANCO MONTTOYA, N. L.; URBINATI, E. C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, p. 295 – 300, 2015.

GODAVARTHY, P.; KUMARI, Y. S.; BIKSHAPATHY, E. Starvation induced cholesterogenesis in hepatic and extra hepatic tissues of climbing Perch, *Anabas testudineus* (Bloch). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 489 – 494, 2012.

HEIDE, A.; FOSS, A.; STEFANSSON, S. O.; MAYER, I.; NORBERG, B.; ROTH, B.; JENSSEN, M. D.; NORTVEDT, R.; IMSLAND, A. K. Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: effects of short term starvation periods and subsequent feeding. **Aquaculture**, v. 261, p. 109 – 117, 2006.

HEMING, T.; PALECZNY, E. J. Compositional changes in skin mucus and blood serum during starvation of trout. **Aquaculture**, v. 66, p. 265 – 273, 1987.

HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, p. 121 – 132, 2000.

HOSEINI, S. M.; YOUSEFI, M.; RAJABIESTERABADI, H.; PAKTINAT, M. Effect of short-term (0 – 72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Applied Ichthyology**, v. 30, p. 569 – 573, 2014.

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.

KIM, J-H.; JEONG, M-H.; JUN, J-C.; KIM, T-I. Changes in hematological, biochemical and non-specific immune parameters of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, following starvation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29 (9), p. 1360 – 1367, 2014.

LAIZ-CARRIÓN, R.; VIANA, I. R.; CEJAS, J. R.; RUIZ-JARABO, I.; JEREZ, S.; MARTOS, J. A.; EDUARDO, A. B.; MANCERA, J. M. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture International**, v. 20, p. 585 – 599, 2012.

MAITA, M.; MAEKAWA, J.; SATOH, K-I.; FUTAMI, K.; SATOH, S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. **Fisheries Science**, v. 72, p. 513 – 519, 2006.

McCUE, M. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology (part A)**, v. 156, p. 1 – 18, 2010.

METÓN, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis – gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 225, p. 99 – 107, 2003.

MOON, T. W.; FOSTER, G. D.; PLISETSKAYA E. M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.2189-2193, 1989.

NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. Fasting and starvation. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 4, p. 394 – 434, 1995.

PERES, H.; GONÇALVES, P.; OLIVA-TELES, A. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 179, p. 415 – 423, 1999.

PERES, H.; SANTOS, S.; OLIVA-TELES, A. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 1339 – 1347, 2014.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; GUEDES, M. J. ; MORALES, A. E. ; OLIVA-TELES, A. Metabolic responses to short starvation starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture**, v. 265, p. 325 – 335, 2007.

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**, v. 38, p. 1145 – 1157, 2012.

POLAKOF, S.; PANSEERAT, S.; SOENGAS, J. L.; MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 182, p. 1015 – 1045, 2012.

REGOST, C.; ARGEL, J.; CARDINAL, M.; LAROCHE, M.; KAUSHIK, S. J. Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. **Aquaculture**, v. 193, p. 325 – 345, 2001.

RUEDA, F. M.; MARTINEZ, F. J.; ZAMORA, S.; KENTOURI, M.; DIVANACH, P. Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture Research**, v. 29, p. 447 – 542, 1998.

SHI, X.; ZHUANG, P.; ZHANG, L.; CHEN, L.; XU, B.; FENG, G.; HUANG, X. Optimal starvation time before blood sampling to get baseline data on several blood chemical parameters in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 544 – 548, 2010.

SOUZA, V. L.; URBINATI, E. C.; GONÇALVES, D. C.; SILVA, P. C. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, v. 24 (2), p. 533 – 540, 2002.

SMUTNÁ, M.; VORLOVÁ, L.; SVOLODOVÁ, Z. Pathobiochemistry of ammonia in the internal environment of fish (Review). **Acta Veterinaria Brno**, v. 71, p. 169 – 181, 2002.

TAKAHASHI, L. S.; 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, p. 259 – 266, 2011.

URBINATI, E. C.; SARMIENTO, S. J.; TAKAHASHI, L. S. Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Aquaculture**, v. 433, p. 430 – 433, 2014.

VIEGAS, I.; RITO, J.; GONZÁLEZ, J. D.; JARAK, I.; CARVALHO, R. A.; METÓN, I.; PARDAL, M. A.; BAANANTE, I. V.; JONES, J. G. Effects of food-deprivation and refeeding on the regulation and sources of blood glucose appearance in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v. 166, p. 399 – 405, 2013.

WEIL, C.; LEFÉVRE, F.; BUGEON, J. Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 157 – 173, 2013.

XIAO, J-X.; ZHOU, F.; YIN, N.; ZHOU, J.; GAO, S.; LI, H.; SHAO, Q-J.; XU, J. Compensatory growth of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* with cyclical feed deprivation and refeeding. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 1045 – 1057, 2013.

YARMOHAMMADI, M.; SHABANI, A.; POURKAZEMI, M.; SOLTANLOO, H.; IMANPOUR, M. R. Effect of starvation and re-feeding on growth performance and content of plasma lipids, glucose and insulin in cultured juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, p. 692 – 696, 2012.

CHAPTER 3

O artigo abaixo foi redigido para atender às normas de publicação da Revista
“Comparative Biochemistry and Physiology”

Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

ABSTRACT

We evaluated whether body fat content affects the energetic metabolism and growth in pacu submitted to daily feeding, fasting and refeeding. For 15 days, fish were fed with different diets to obtain lean and fat conditions, and then subjected, for 20 days, to: 1) continuously feeding (control), or 2) fasting for 15 days and re-feeding for five days. Blood (glucose, triglycerides, cholesterol, NEFA, total protein) and tissue (liver lipid and glycogen, muscle lipid, mesenteric fat) metabolic indicators, and growth performance parameters (weight gain - WG, specific growth rate – SGR, daily feed intake – DFI, and feed conversion ratio - FCR) were measured. Fasting led both lean and fat pacu to make notable use of their energy reserves, through glycogenolysis and lipolysis, reflected in reduced blood glucose and triglycerides, liver glycogen, and muscle and mesenteric lipid levels. Lipolysis was confirmed by the high levels of NEFA, especially in fat pacu. Refeeding led to higher plasma glucose and liver lipid in lean fish. Muscle fat increased in fat fish but was not restored in lean fish, while MFI remained the same in fat fish and increased in lean fish. Although refeeding occurred only for five days, lean fish grew more and were more efficient at utilizing food (higher WG and better FCR). In conclusion, our results suggest that fat pacu have relatively higher glycogenic and lipogenic abilities and the higher deposition of lipids in fish does not mean higher availability of energy for growth when compensatory growth is stimulated by refeeding after fasting.

Keywords: energy dynamics, fat stores, food deprivation, growth, mesenteric fat, metabolism, refeeding

1. Introduction

Periods of food scarcity are commonly tolerated by many species of fish in their natural environment and are caused by factors such as seasonal changes, prey availability, migration and spawning (Metcalf et al., 1999; Binner et al., 2008; Cipriano et al., 2015). Fish exhibit extraordinary resilience to food deprivation in comparison with other animals (McCue, 2010; Bar, 2014). Successful adaptation to the unfavorable condition of food deprivation depends mainly on the dynamics of the energy reserves as carbohydrates, fat stores and muscle components that support biological processes, such as growth and reproduction, among others (Navarro and Gutierrez, 1995; McCue, 2010; Furné et al., 2012).

Lipids play a major role as metabolic energy for fish maintenance and are stored in different body sites (Sheridan, 1994; Tocher, 2003; Weil et al., 2013). The management of fat deposition in farm animals has become highly important, especially in terms of meat quality, since lipid storage in muscle affects the nutritional value and sensory properties of meat (Wood et al., 2008). The fillet fat content is a major determinant of color, texture and flavor of fresh as well as smoked products (Johansson et al., 2000; Robb et al., 2002). Nutritional studies have suggested that lines of fish selected for low (lean line) or high (fat line) muscle fat content differed in the regulation of lipid and glucose metabolism. Kolditz et al. (2008) reported that the fat line showed enhanced glycolytic potential in both muscle and liver and decreased hepatic fatty acid oxidation compared to the lean line. In another study, Skiba-Cassy et al. (2009) indicated that genetic selection of rainbow trout for muscle fat content resulted in fish with an enhanced ability to use plasma glucose, possibly due to enhanced lipogenesis. Finally, Kamalam et al. (2012) showed enhanced lipogenic potential coupled with higher liver glycogen content in the fat line, suggesting that this line has a better ability to store glucose than the lean line, without affecting growth or glucose utilization in the peripheral tissues.

Considering these findings, we wondered whether fish without any genetic selection process and with different body fat contents would utilize different metabolic mechanisms to provide energy to meet their energetic demands of growth after fasting and the refeeding. Inducing compensatory growth through food deprivation is

a common practice in the aquaculture industry (Hayward et al., 1997; Ali et al., 2003). Therefore, it is very important to establish appropriate feeding management strategies in fish which are based on cycles of fasting and refeeding in order to reduce production costs and negative effects on the environment without affecting production efficiency (Takahashi et al., 2011; Urbinati et al., 2014).

Several studies have investigated the metabolic response to fasting and refeeding together with growth performance in fish (Luo et al., 2009; Takahashi et al., 2011; Trombley et al., 2012; Yengkokpam et al., 2014; Urbinati et al., 2014), but none of these considered these feeding strategies in lean versus fat fish. The tropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is an interesting model for studies of metabolic dynamics during fasting and refeeding, since it normally shows high fat content in muscles and mesenteric depot. In adverse situations, such as food restriction, this species exhibits an adaptive feeding behavior in order to adjust its metabolism and growth to these conditions (Souza et al., 2000). In this study, we investigated the effects of fasting and refeeding on energetic and growth parameters in pacu under two body conditions (lean and fat fish). Our results represent an important contribution to the understanding of the dynamics of energy mobilization in conditions of fish food deprivation and refeeding.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Fish and experimental protocol

The study utilized 204 fish (38.9 ± 11.1 g) supplied by the UNESP Aquaculture Center (CAUNESP) and kept in 12 430-liter fiber tanks (20 fish per tank) for acclimatization for two weeks. Water temperature (30.5 ± 0.3 °C) and oxygen levels (> 5.0 mg L⁻¹) were monitored and the photoperiod was 12 h light: 12 h dark.

Pre-experimental diets

Fish were separated into two groups and fed for 15 days as follows: one group was fed at apparent satiation twice daily with the experimental diet (see Table 1) with an additional 5% of soybean oil and the other group was fed once daily at 3% body

weight with a second diet prepared for lean fish (Table 2). After 15 days, 6 fish from each group were euthanized (benzocaine 0.4 g L⁻¹) to measure body weight and adipose tissue. Fish body weight did not differ significantly between the “lean” and “fat” groups, but did differ in terms of mesenteric fat content.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the pre-experimental and experimental diets.

Ingredient	Pre-experimental diet*	Experimental diet**
Fishmeal	18.7	10.8
Soybean meal	9.0	24.5
Viscera meal	13.0	-
Yeast	-	6.0
Corn	11.0	37.6
Wheat meal	9.0	11.0
Rice meal	16.6	-
Broken rice	-	4.0
Corn starch	2.0	-
Soybean oil	0.4	1.0
Fish oil	-	1.0
Methionine	-	0.08
Lysine	-	0.08
Premix	0.5	0.5
Vitamin C	-	0.09
Limestone	-	1.0
Dicalcium phosphate	0.5	2.0
BHT	0.02	0.03
Antifungal	-	0.3
Kaolin	19.2	-
<i>Proximate Composition (% Dry matter)</i>		
Crude protein (%)	27.8	26.0
Crude fat (%)	7.5	6.7
Crude fiber (%)	3.0	6.7
Carbohydrates (%)	25.0	46.4
Gross energy (kcal kg ⁻¹)	3358.8	4100.3

* Pre-experimental diet used to obtain the lean fish group.

** Experimental diet used throughout the trial period. During the pre-experimental period, it received the addition of 5% soybean oil to obtain the fat fish group.

Experimental Procedure

Once the lean and fat groups were established, a final group (192 fish), consisted of 96 lean fish (51.6 ± 11.2 g) and 96 fat fish (54.5 ± 8.4 g), were kept in 12 tanks with a density of 16 fish per tank. During 20 days, half of the sample (containing equal numbers of fat and lean fish) was continuously fed (control) and the other half were fasted for 15 days and re-fed for five days. Control fish and re-fed fish

from the experimental group were fed until apparent satiation twice a day (9:00 and 16:00 h) with an experimental diet (Table 1) and their consumption was recorded. The assessment of metabolic and growth performance parameters was obtained from 9 fish per treatment at baseline and on the 15th and 20th days.

2.2. Sampling

Three fish from each tank (n=9) were anaesthetized with benzocaine (0.1 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and blood samples were collected from the caudal vessel. Part of each sample was dispensed in microtubes containing the anticoagulant Glistab® (<http://www.labtest.com.br/reagentes>) (plasma) and another part in microtubes without anticoagulant (serum). For plasma separation, blood samples were centrifuged (10 min at 3000 x g) and glucose and triglyceride concentrations were determined. For serum, blood was allowed to clot at room temperature for 3 hours and centrifuged (10 min at 3000 x g) and cholesterol and protein assays were performed. The remaining serum was stored at -20 °C until the non-esterified fatty acid (NEFA) analysis (<http://www.randox.com/reagents/nefa>). Adipose tissue was removed, weighed and used to calculate the mesenteric fat index (MFI) [(tissue weight / body weight) x 100]. Liver and a dorsal portion of white muscle were removed and stored at -20 °C for further assays.

2.3. Specific procedures

2.3.1. Metabolic assays

The plasma glucose and triglycerides, as well as serum cholesterol and protein levels were measured by colorimetric method (<http://www.labtest.com.br/reagentes>). Liver glycogen was performed according to Moon et al. (1989), and both liver and muscle lipid percentages were determined according to Bligh and Dyer (1959).

2.3.2. Growth performance and feed utilization

Growth performance and feed utilization were calculated for each body condition at the end of the 20-day trial. The indexes measured were: weight gain (WG) (g) = final body weight – initial body weight; daily feed intake (DFI) (g day^{-1}) = $100 \times (\text{feed intake (g)} / \text{average body weight (g)} / \text{days})$; specific growth rate (SGR) (%) = $100 \times [(\ln \text{ mean final weight}) - (\ln \text{ mean initial weight}) / \text{experimental days}]$ and feed conversion ratio (FCR) = Feed intake (g) / weight gain (g).

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed in an entirely randomized design by two-way ANOVA. A factorial 2x2 (two body conditions (lean or fat fish) x two feeding strategies (fasting/refeeding and control groups) in each sampling period (15th and 20th days of experimental trial) followed by Duncan's post-hoc tests, was used to examine the effect of fasting/refeeding on metabolic parameters. Some data were transformed prior to statistical analysis as they failed normality (Cramer Von Mises) and homoscedasticity tests (Brown-Forsythe). These transformations were: Log_{10} (FFA, MFI, muscle lipid) and SQRT (triglycerides). Baseline data were analyzed by t-test for mean comparison between fish groups. Growth performance parameters were analyzed by two-way ANOVA, using a factorial 2 x 2 (two body conditions (lean or fat fish) x two feeding strategies (fasting/refeeding and control groups) at the end of the experimental period. Values in the text and figures are expressed as means $\pm$ standard error (S.E) of the mean. $P < 0.05$ was the level of statistical significance in all analyses.

2.5. Bioethical statement

The experimental procedures were approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocol 001798/12, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, Brazil) and performed in accordance with the Guidelines of the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasília, Brazil.

3. Results

To evaluate whether body fat content affects the response of pacu to a negative energetic status, we submitted lean and fat juvenile pacu to a 15-day fasting period followed by a 5-day refeeding period and measured the energetic dynamics in blood and tissues, as well as growth and feeding performance. At baseline, lean and fat fish had similar body weight (lean: 51.6 ± 11.2 g vs. 54.5 ± 8.4 g, mean $\pm$ SD), but fat fish presented a higher amount of mesenteric and muscle fat, as well as blood triglycerides.

3.1. Metabolic parameters

Plasma glucose (Figure 1A)

At baseline, plasma glucose levels were significantly higher in fat fish than in lean fish (Fig. 1A). After fasting, both lean and fat fish showed decreased blood glucose levels compared to baseline and to their respective controls, but they did not differ between each other. After refeeding, both lean and fat fish showed increased blood glucose levels. While fat fish glucose levels reached control values, lean fish had a significantly greater increase, reaching the highest glucose levels among all groups.

Plasma triglycerides (Figure 1B)

At baseline, triglyceride levels were significantly higher in fat fish relative to lean fish, but after fasting, both lean and fat fish had a pronounced decrease in these levels compared to baseline and to their controls (Fig. 1B). After refeeding, both lean and fat fish showed increased triglyceride levels compared to fasting levels. Similarly to glucose results, while fat fish recovered baseline triglyceride levels, lean fish exceeded those levels.

Serum cholesterol (Figure 1C)

For all conditions studied (baseline, fasting and refeeding), cholesterol levels were significantly lower in lean fish relative to fat fish. After fasting, cholesterol levels increased in both lean and fat fish relative to baseline and to their respective controls. After refeeding, cholesterol levels decreased in lean and fat fish, reaching control levels. Therefore, the fasting condition significantly increased cholesterol levels for both lean and fat fish, relative to controls.

Serum non-esterified fatty acids (NEFA) (Figure 1D)

The NEFA levels did not differ between lean and fat groups at baseline (Fig. 1D). After fasting, both lean and fat fish showed a significant increase in NEFA levels, but this increase was more pronounced in fat fish. After refeeding, all levels returned to baseline values for all fish.

Serum total protein (Figure 1E)

During the entire experiment, total protein levels were significantly higher in fat fish relative to lean fish. After fasting, the levels in both lean and fat fish were reduced compared to those observed at baseline, but not to those of the control groups. After refeeding, serum protein levels increased in the lean fish only.

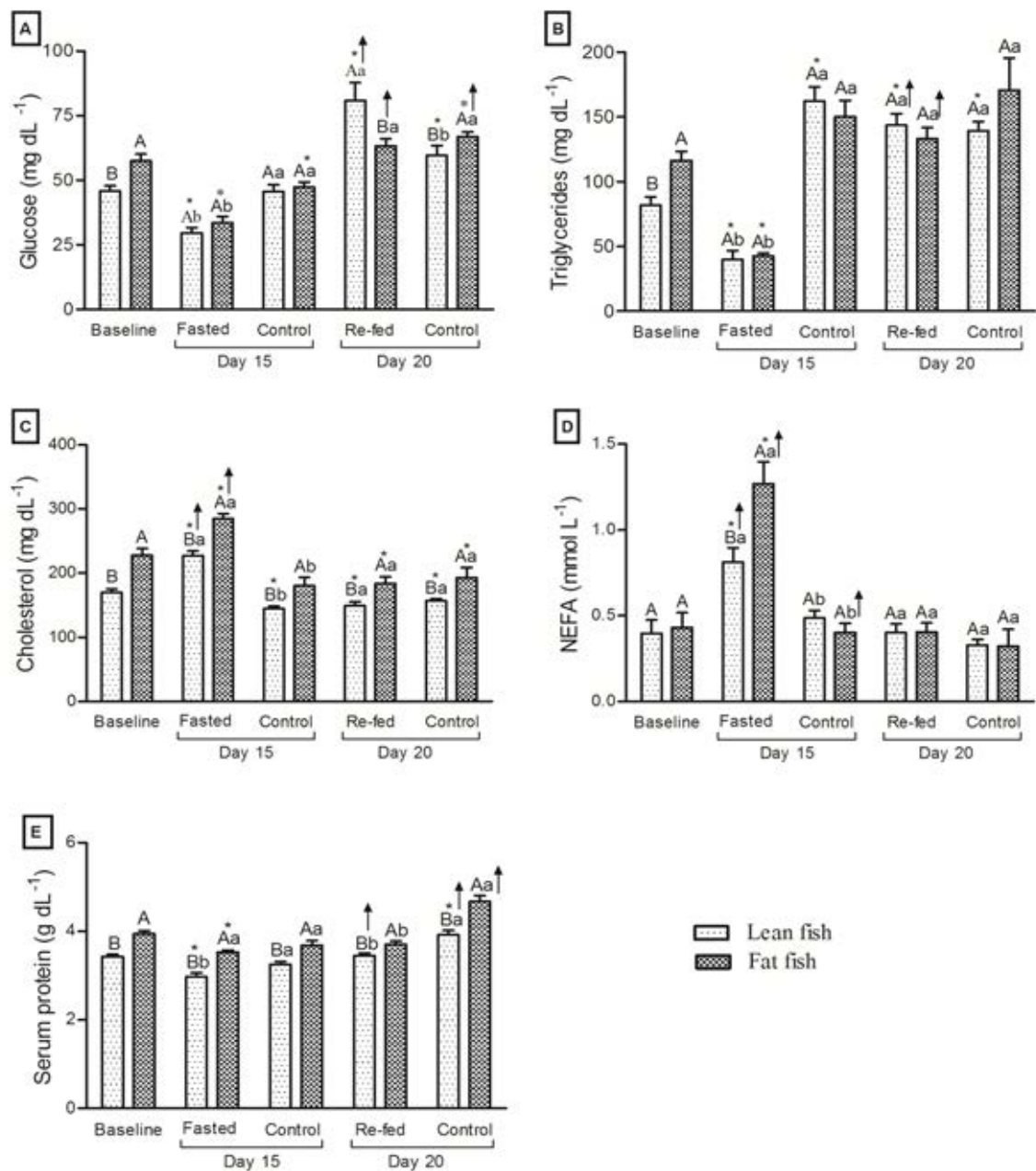


Figure 1. Plasma glucose (A) and triglycerides (B), serum cholesterol (C), non-esterified fatty acids (NEFA) (D) and protein (E) levels for lean and fat pacu in the experimental period (fasted for 15 days and re-fed for 5 days) and control (continuously fed for 20 days) groups. Capital letters indicate differences on body fat content within the same sampling period. Lower case letters compare experimental vs. control feeding strategies for lean and fat fish for each sampling period. Asterisks indicate differences between each fish group (lean, fat, experimental and control) to its respective baseline level. Arrows indicate differences between fasting and refeeding values for lean, fat, and control groups. Values are expressed as means $\pm$ standard error (S.E.). All comparisons were statistically different at $p < 0.05$.

Liver Glycogen (Figure 2A)

At baseline, liver glycogen levels did not differ between groups. After fasting, the levels in both lean and fat fish decreased significantly compared to baseline. After refeeding, liver glycogen levels increased for all fish groups. Both control fish groups reached baseline levels and were higher in fat fish than in lean fish.

Liver Lipid (Figure 2B)

For liver lipid levels, the only difference observed between lean and fat groups occurred for the experimental group after refeeding, with lean fish showing significantly higher levels.

Muscle Lipid (Figure 2C)

At baseline, fat fish had significantly higher muscle lipid levels compared to lean fish. After fasting, muscle lipid levels decreased in lean and fat fish. After refeeding, muscle lipid levels in lean fish remained unchanged but increased in fat fish.

Mesenteric Fat Index (MFI) (Figure 2D)

The MFI of fat fish was significantly higher than in lean fish in all conditions. Interestingly, while the lean fish showed reduced MFI levels after fasting, they increased those levels significantly after refeeding. Moreover, fat fish did not show alterations in MFI levels for any of the conditions.

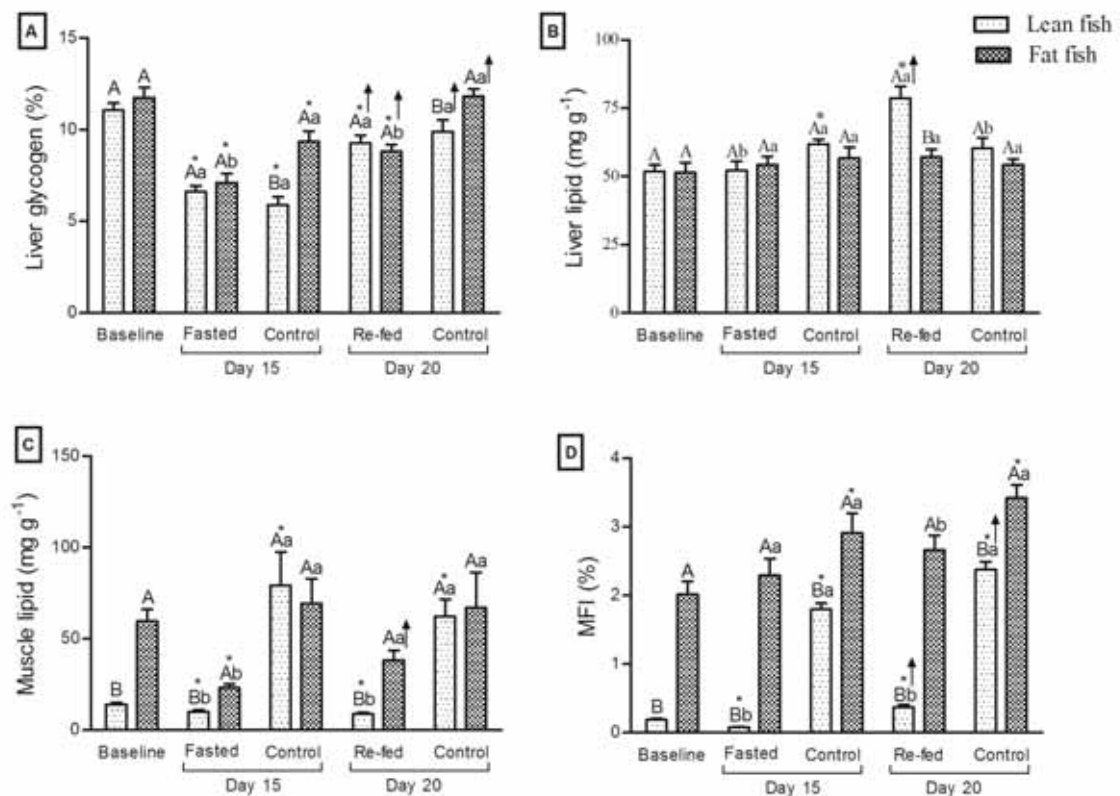


Figure 2. Liver glycogen (A), liver lipid (B), muscle lipid (C) levels and mesenteric fat index (MFI) (D) for lean and fat pacu in the experimental period (fasted for 15 days and re-fed for 5 days) and control (continuously fed for 20 days) groups. Capital letters indicate differences between lean and fat fish within the same sampling period. Lower case letters compare experimental vs. control feeding strategies for lean and fat fish for each sampling period. Asterisks indicate differences between each fish group (lean, fat, experimental and control) to its respective baseline level. Arrows indicate differences between fasting and refeeding values for lean, fat, and control groups. Values are expressed as means $\pm$ standard error (S.E.). All comparisons were statistically different at $p < 0.05$.

3.2. Growth performance

As mentioned above, both lean and fat fish across control and experimental groups began the experiment with similar body weight. During the 20-day experimental period, the experimental group as a whole gained less weight than the control group. In both the control and experimental groups, lean and fat fish differed

significantly from each other in terms of weight gain (WG): in both cases, lean fish showed greater WG compared to fat fish (Fig. 5A). For specific growth rate (SGR) (Fig. 5B), values were higher in the control group compared to the re-fed group, but no differences were observed between lean and fat fish in either group. In terms of daily feed intake (DFI), control fish consumed more food overall than the experimental fish, and lean fish consumed more than fat fish in the control group only (Fig. 5C). Finally, no differences were observed in feed conversion ratio (FCR) between lean and fat fish in the control group, while lean fish in the experimental group displayed a significantly better FCR than fat fish (Fig. 5D).

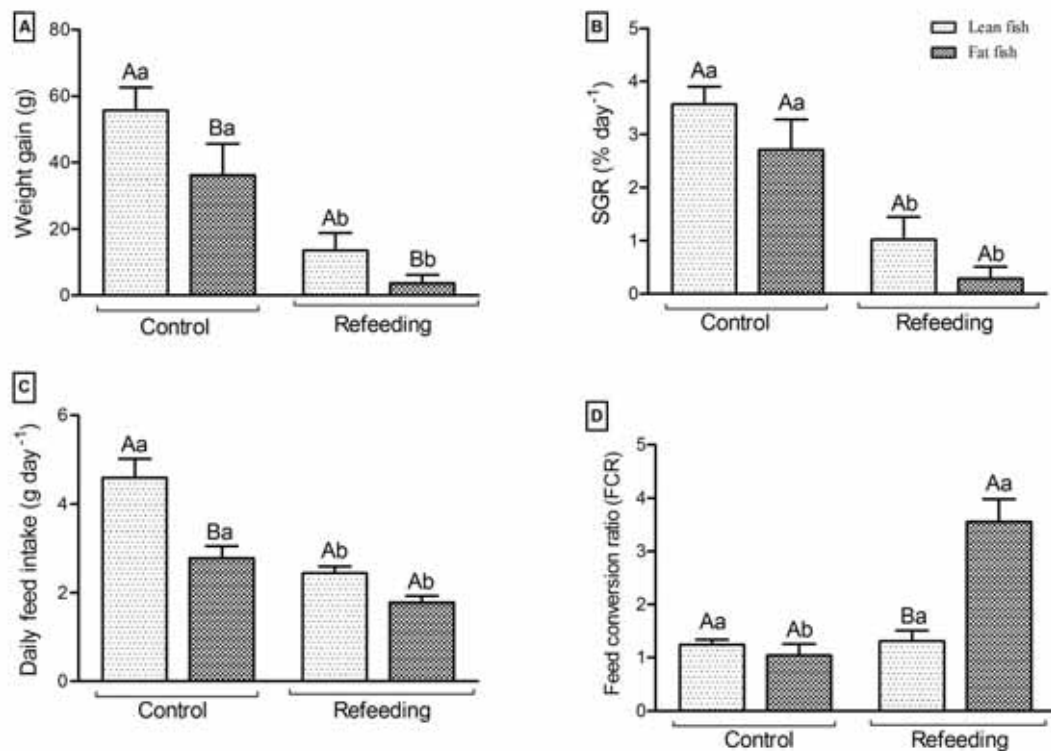


Figure 3. Weight gain (WG) (A), specific growth rate (SGR) (B), daily feed intake (DFI) (C) and feed conversion ratio (FCR) (D) of lean and fat fish fasted for 15 days and re-fed for 5 days (re-fed) and fish continuously fed (control) for 20 days. Capital letters compare lean and fat fish from both control and re-fed groups. Lower case letters compare experimental vs. control feeding strategies for lean and fat fish. Values are expressed as means $\pm$ standard error (S.E.). All comparisons were statistically different at $p < 0.05$.

4. Discussion

Our study describes the metabolic profile, growth and feed utilization of pacu under two body conditions (lean and fat) after a 15-day fasting period, followed by 5 days of refeeding. Our results show that, overall, body fat content changed the metabolic and growth performance response of control as well as experimental fish throughout the experimental period.

Control Fish

At baseline, fat control fish had higher glucose, triglyceride, cholesterol and serum protein levels compared to lean control fish. This relationship between groups was maintained throughout the experiment, with the exception of triglycerides, which did not differ between lean and fat fish. At baseline, liver glycogen levels did not differ between groups, but fat fish showed increased levels relative to lean fish starting at day 15. For both muscle lipid concentrations and MFI, fat fish had higher relative values at baseline. By day 15, muscle lipid concentrations had levelled-out between groups, while for MFI, fat fish continued to have higher values than lean fish, despite the increase in mesenteric fat deposition in lean fish. All differences observed at baseline were due to the pre-experimental diets. Once lean and fat fish began the experimental trial, they were all fed the same diet. While fat fish displayed a moderate reduction in energy levels, lean fish showed an increase in energy and feeding frequency (from once to twice a day).

Experimental Fish

Fasting

Fasting, led both lean and fat pacu to make notable use of their energy reserves, through glycogenolysis and lipolysis. This was reflected in reduced blood glucose, liver glycogen, blood triglycerides, and muscle and mesenteric lipid levels, despite the fact that there were no alterations in liver lipid levels for either group. Interestingly, while lean fish used significant amounts of both muscle and mesenteric lipids, fat fish preferred the use of muscle lipids only. In general, during food deprivation, glucose requirements are satisfied by glycogen depletion

(glycogenolysis) or by *de novo* synthesis of glucose (gluconeogenesis) (Furné et al., 2012; Polakof et al., 2012). However, in the fish studied here, glycogenolysis was not sufficient to normalize glucose levels in either lean or fat fish. Lipolysis was confirmed in our study by the high levels of NEFA, especially in fat pacu. In fish, lipids are distributed among mesenteric fat, liver and muscle (Sheridan, 1994) and, during fasting, they are mobilized from those sites and broken down, resulting in increased circulating levels of NEFA, as was observed in the lean and fat pacu in our study. However, we observed that hepatic lipids were not broken during fasting in either group. In sum, lean and fat fish displayed different energy use strategies during fasting: while lean fish mainly used mesenteric reserves, fat fish preferred muscle reserves.

Refeeding

Refeeding led to higher plasma glucose and liver lipid concentrations in lean relative to fat fish. On the other hand, muscle fat increased in fat fish but was not restored in lean fish, while MFI remained the same in fat fish and increased slightly in lean fish. These findings suggest that fat fish have a relatively greater lipogenic potential than lean fish. Unexpectedly, lean fish showed an increase in liver lipid levels, which has no clear explanation in light of our findings. This lipogenic capacity was also observed in fat control fish, which also accumulated more mesenteric fat throughout the experiment.

Our results suggest that fat pacu have relatively higher glycogenic and lipogenic abilities. A similar finding was reported for lines of rainbow trout selected for low (lean line) or high (fat line) muscle fat content (Skiba-Cassy et al., 2009). In that study, fish from the fat line showed an enhanced ability to use plasma glucose, possibly due to enhanced lipogenesis. Using the same lines of rainbow trout, Kamalam et al. (2012) showed enhanced lipogenic potential coupled with higher liver glycogen content in the fat line, reflecting a better relative ability to store glucose without affecting growth or glucose utilization in the peripheral tissues. It is important to note that the studies cited above focused on rainbow trout that were selected for high fat content in the muscle, which represents better meat quality in that line of fish, both for fresh and smoked products (Johansson et al., 2000; Robb et al., 2002). In

contrast, visceral and abdominal fat contribute to the non-edible parts of the fish that are detrimental to dressing yields (Rye and Gjerde, 1996; Elvingson and Johansson, 1993).

Cholesterol levels were consistently higher in fat fish relative to lean fish. Interestingly, during fasting, cholesterol levels increased significantly for both lean and fat groups, and decreased during refeeding. In contrast to our study, plasma cholesterol was shown to decrease in fasted *Oncorhynchus mykiss* (Heming and Paleczny, 1987), *Salmo trutta* (Regost et al., 2001) and *Acipenser naccarii* (Furné et al., 2012). On the other hand, Godavarthy et al. (2012) observed an increase in cholesterol levels in several tissues in *Anabas testudineus* after 60 days of starvation. Cholesterol is a structural lipid involved in the synthesis of steroid hormones, including cortisol, which regulates several physiological processes including energetic metabolism (Mommensen et al., 1999). The increase observed after fasting in both fish groups in our study may be associated to the energetic demand that fish face during food deprivation. In a previous study from our own group, also conducted with pacu, Gimbo et al. (2015) described elevated levels of circulating cortisol in fasted fish that were experimentally infected with bacteria. This suggested that the hormone could promote gluconeogenesis, which may help fish cope with the stressful condition of fasting and infection. Peterson and Small (2004) also reported increased levels of cortisol in fasted channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after 30 days of fasting. Therefore, stress induced by fasting may be the cause of the observed increased levels of cholesterol in both fat and lean fish during fasting in our study.

Regarding growth performance, although refeeding occurred during a very short period (5 days), at the end of the study, lean fish grew more and were more efficient at utilizing food (higher WG and better FCR) relative to fat fish. Since feed intake was similar between groups, better growth in lean fish may have resulted from the difference in feed conversion rate. This indicates that the ability to store less fat confers a noticeable advantage to the lean fish, while slower-growing fat fish deposited more lipids in their body. This is consistent with the observation that the efficiency of energy utilization decreases when the amount of energy deposited as lipids increases compared to energy deposited as protein (Einen and Roem, 1997; Azevedo et al., 2004). Quillet et al. (2007) tested the possible effects of diet

composition on carcass quality (growth, body shape and processing yields) and fat deposition (quantity and body location) in trout from lean and fat lines. A significant effect was recorded for size: lean fish were slightly heavier and longer than fat fish. The study also showed differences in the utilization of nutrients (higher *de novo* lipid synthesis in fat fish, and increased protein retention in lean fish), which were also observed in the present study.

Finally, the mobilization of fat from muscles in lean pacu yields a fish product with reduced fat content, which is a desirable feature for this fish across markets. In a previous study, the cultivated pacu presented lipid contents of 12.2% while the wild species contained 7.9% lipids. Despite the high lipid contents of the cultivated pacu, the n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in muscle tissue were higher in wild fish (485.1 mg/g flesh) than in their respective cultivated strains (106.1 mg/g flesh) (Tamanati et al., 2009).

5. Conclusions

In conclusion, the higher deposition of lipids in fish does not mean higher availability of energy for growth when compensatory growth is stimulated by refeeding after a period of fasting. Therefore, in order to successfully obtain compensatory growth through food deprivation and to establish appropriate feeding management protocols in aquaculture, a key step seems to be to avoid the deposition of lipids in fish.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank the Centro de Aquicultura of UNESP (CAUNESP) for supplying the fish for this research, and Ms. Damares Perecim for the technical support. This research was funded by the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries* 4, 147-190.
- Azevedo, P.A., Leeson, S., Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2004. Growth, nitrogen and energy utilization of juveniles from four salmonid species: diet, species and size effects. *Aquaculture* 234, 393-414.
- Bar, N., 2014. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 71, 1447-1458.
- Binner, M., Kloas, W., Hardewig, I., 2008. Energy allocation in juvenile roach and burbot under different temperature and feeding regimes. *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 103-116.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
- Cipriano, R.C., Smith, M.L., Vermeersch, K.A., Dove, A.D.M., Styczynski, M.P., 2015. Differential metabolite levels in response to spawning-induced inappetence in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 13, 52-59.
- Einen, O., Roem, A.J., 1997. Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquaculture Nutrition* 3, 115-126.
- Elvingson, P., Nilsson, J., 1994. Phenotypic and genetic parameters of body and compositional traits in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Research* 25, 677-685.
- Furné, M., Morales, A., Trenzado, C., García-Gallego, M., Carmen Hidalgo, M., Domezain, A., Sanz Rus, A., 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B* 182, 63-76.
- Gimbo, R.Y., Fávero, G.C., Franco Montoya, L.N., Urbinati, E.C., 2015. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish & Shellfish Immunology* 43, 295-300.
- Godavarthy, P., Sunila Kumari, Y., Bikshapathy, E., 2012. Starvation induced cholesterogenesis in hepatic and extra hepatic tissues of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch). *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 489-494.
- Hayward, R.S., Noltie, D.B., Wang, N., 1997. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. *Transactions of the American Fisheries Society* 126, 316-322.
- Heming, T.A., Paleczny, E.J., 1987. Compositional changes in skin mucus and blood serum during starvation of trout. *Aquaculture* 66, 265-273.
- Johansson, L., Kiessling, A., Kiessling, K.H., Berglund, L., 2000. Effects of altered ration levels on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Quality and Preference* 11, 247-254.
- Kamalam, B.S., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2012. Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *The Journal of Experimental Biology* 215, 2567-2578.

- Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., Médale, F., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294, 1154-1164.
- Luo, Z., Tan, X.Y., Wang, W.M., Fan, Q.X., 2009. Effects of long-term starvation on body weight and body composition of juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with special emphasis on amino acid and fatty acid changes. *Journal of Applied Ichthyology* 25, 184-189.
- McCue, M.D., 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156, 1-18.
- Metcalfe, N.B., Fraser, N.H.C., Burns, M.D., 1999. Food availability and the nocturnal vs. diurnal foraging trade-off in juvenile salmon. *Journal of Animal Ecology* 68, 371-381.
- Mommsen, T., Vijayan, M., Moon, T., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Moon, T.W., Foster, G.D., Plisetkaya, E.M., 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. *Canadian Journal of Zoology* 67, 2189-2193.
- Navarro, I., Gutierrez, J., 1995. Fasting and starvation. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 4, 394-434.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M.C., García-Alcázar, A., Abellán, E., Morales, A.E., 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1145-1157.
- Peterson, B.C., Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology* 26, 231-240.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J., Moon, T., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 182, 1015-1045.
- Quillet, E., Le Guillou, S., Aubin, J., Labbé, L., Fauconneau, B., Médale, F., 2007. Response of a lean muscle and a fat muscle rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) line on growth, nutrient utilization, body composition and carcass traits when fed two different diets. *Aquaculture* 269, 220-231.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Laroche, M., Kaushik, S.J., 2001. Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture* 193, 325-345.
- Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warriss, P.D., Nute, G.R., 2002. Muscle lipid content determines the eating quality of smoked and cooked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 205, 345-358.
- Rye, M., Gjerde, B., 1996. Phenotypic and genetic parameters of body composition traits and flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 27, 121-133.
- Sheridan, M.A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 107, 495-508.

- Skiba-Cassy, S., Lansard, M., Panserat, S., Médale, F., 2009. Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 297, 1421–1429.
- Souza, V.L., Oliveira, E.G., Urbinati, E.C., 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 15, 371–379.
- Takahashi, L.S., Biller, J.D., Criscuolo-Urbinati, E., Urbinati, E.C., 2011. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95, 259-266.
- Tanamati, A., Stevanato, F.B., Visentainer, J.E.L., Matsushita, M., Souza, N.E., Visentainer, J.V., 2009. Fatty acid composition in wild and cultivated pacu and pintado fish. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 183–187.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107-184.
- Trombley, S., Maugars, G., Kling, P., Björnsson, B.T., Schmitz, M., 2012. Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology* 175, 92-99.
- Urbinati, E.C., Sarmiento, S.J., Takahashi, L.S., 2014. Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Aquaculture* 433, 430-433.
- Weil, C., Lefèvre, F., Bugeon, J., 2013. Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23, 157-173.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78, 343-358.
- Yengkokpam, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., Kumar, S., Jain, K.K., 2014. Compensatory growth, feed intake and body composition of *Labeo rohita* fingerlings following feed deprivation. *Aquaculture Nutrition* 20, 101-108.

CAPÍTULO 4

Considerações Finais

Capítulo 4 – Considerações finais

Diversos estudos comprovam as vantagens da utilização de protocolos de jejum e realimentação em peixes como ferramenta para se promover crescimento compensatório, além de reduzir a quantidade de alimento e as consequências ambientais. Muitas espécies, após submetidas a períodos de jejum, apresentam recuperação de suas reservas energéticas, respostas hiperfágicas e um rápido aumento de peso, o crescimento compensatório, durante a realimentação. Entretanto, esses resultados são espécie-específicos, o que significa que os protocolos de alimentação utilizados para uma espécie podem não ser aplicáveis a outras. Além disto, essas respostas são dependentes de fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade de alimento e idade do animal. Os resultados desse estudo apontam que o pacu é uma espécie capaz de mobilizar suas reservas endógenas para sobreviver às condições de escassez de alimento, mesmo em períodos mais longos de jejum, além de apresentar respostas satisfatórias de hiperfagia e crescimento compensatório após realimentação.

A presente pesquisa também mostra os efeitos metabólicos e de crescimento após jejum e realimentação em pacus sob duas condições corporais distintas (peixes magros e gordos), baseado no conteúdo de gordura mesentérica e muscular. O conteúdo lipídico é um dos principais determinantes de qualidade da carne em peixes, já que o estoque de lipídeos no músculo afeta o valor nutricional e as propriedades sensoriais da carne. Diferentemente de algumas espécies de peixes, que são selecionadas geneticamente para obtenção de maior conteúdo de gordura muscular, tendo em vista a sua rica composição em ácidos graxos poli-insaturados, o excesso de gordura em espécies como o pacu prejudica a qualidade final do produto. Como observado nesta pesquisa, os pacus com menor conteúdo de gordura (magros), além de mais desejáveis no mercado, mostraram melhores respostas metabólicas e de crescimento quando submetidos a condições de jejum e realimentação.