

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Efeitos da restrição alimentar e realimentação no crescimento,
metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse
oxidativo de *Piaractus mesopotamicus***

**Thaís Lucato Sorrente
Bióloga**

Jaboticabal, SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Efeitos da restrição alimentar e realimentação no crescimento,
metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse
oxidativo de *Piaractus mesopotamicus***

Thaís Lucato Sorrente

Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Defesa de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP

2023

S714e Sorrente, Thaís Lucato
Efeitos da restrição alimentar e realimentação no crescimento, metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse oxidativo de *Piaractus mesopotamicus* / Thaís Lucato Sorrente. -- Jaboticabal, 2023 vi, 84 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2023

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Gisele Cristina Favero, Mariana Maluli Marinho de Mello

Bibliografia

1. Jejum. 2. Fisiologia. 3. Metabolismo energético. 4. Estresse oxidativo. 5. Pacu (peixe). I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

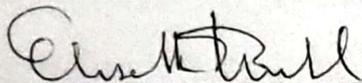
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos da restrição alimentar e realimentação no metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse oxidativo do *Piaractus mesopotamicus*

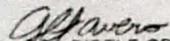
AUTORA: THAÍS LUCATO SORRENTE

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Aquicultura, área: Biologia Aquática pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. GISELE CRISTINA FÁVERO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / UFMG, Belo Horizonte-MG



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

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2023

"acima de tudo ame
como se fosse a única coisa que você sabe fazer
no fim do dia isso tudo
não significa nada
esta página
onde você está
seu diploma
seu emprego
o dinheiro
nada importa
exceto o amor e a conexão entre as pessoas
quem você amou
e com que profundidade você amou
como você tocou as pessoas à sua volta
e quanto você se doou a elas."

— Rupi Kaur

Dedico

*Aos meus pais, Luís Eduardo e Ana Alice
por serem exemplo de coragem, determinação e caridade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, misterioso e perfeito, que tudo pode ver, pelas bênçãos que possuo em minha vida.

À Deus, e aos meus guias e amigos espirituais, que me orientam, iluminam e guardam ao longo de toda jornada até aqui.

À Profa. Dra. Elisabeth Urbinati por me orientar com tanto zelo, carinho e amor. Por ser fonte de inspiração como mulher na ciência e na vida.

Ao meu pai, Luís Eduardo, obrigada por seu esforço em não deixar que nada nos falte nunca e por atender aos nossos desejos, mesmo que contrários aos seus.

À minha mãe, Ana Alice, obrigada por ser sinônimo de força, por nunca me deixar desistir, por pegar na minha mão e mostrar que sou capaz. Obrigada por proteger seus filhos e nos amar com todas as forças do seu espírito.

Gabriel, meu irmão, obrigada por me ensinar a ser mais gentil, todas as vezes que você era mais do que eu. Obrigada por me ensinar que alguns nascem prontos e outros precisam se esforçar. E tá tudo bem.

Às minhas avós e, principalmente aos meus avôs, eu agradeço pela oportunidade que seus esforços me deram. Meu coração sempre estará com vocês.

Aos meus primos e primas, e todos da minha família, vocês fazem a vida ser mais alegre e cheia de cor.

À Maria Eduarda Benetti, amiga que a vida me presenteou como uma irmã, que compartilhou cada etapa até aqui, obrigada por acolher cada palavra e sentimento, transformando tudo em risada, bom humor e vinho.

Ao irmão de FCAV, Vinícius (Sid), por ser um porto seguro ao longo do mestrado, por não soltar minha mão nas horas mais difíceis, muito menos nas boas.

À todos os amigos da graduação que permaneceram até aqui, vocês são meu maior presente, Marcelo (Má-rimba), Renan (Ozama), Mateus (Telson), Daiana (Pocahontas), Manoela (Situação), André.

Ao apoio fornecido pelos alunos do Laboratório de Tilapicultura, principalmente às alunas Thaise Motta e Gabriela Carli durante às incansáveis horas de coleta e análises.

Aos companheiros de laboratório, Allan Emilio, Camila Faria, Mariana Maluli, Fábio Gonçalves, Dayanne Raule, Thaís Daltoso, Tom Vilhalba, Júlia Diez, Beatriz, Andrey, Yasmin e em especial para aquelas que se tornaram minha segunda família nesta cidade Áurea Veras, Allana Feitoza, Adriane Bido, Julyana Cristyna e Raíssa Ribeiro obrigada por me ensinarem tanto e com tanto carinho. Obrigada pelos conselhos, pelos dias de coleta, pelas análises cansativas e repetidas, sou grata por cada minuto dentro do LAFIPE.

Aos membros da banca de exame geral de qualificação, Drs Raphael Barbeta de Jesus e Mariana Maluli Marinho de Mello pelas valiosas contribuições e questionamentos.

Ao Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal, onde este trabalho foi desenvolvido, em especial aos funcionários, Rodrigo, Ângela e Euclides pelos cafés, conversa fiada e risadas.

À amiga e técnica Damares Perecim por todo acolhimento, preocupação, conselhos, ensinamentos e risadas. Por cuidar de mim como uma das suas filhas. Minha família é eternamente grata. Vamos energizar, Damarinha!

Ao Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP por disponibilizar recursos necessários para essa pesquisa, aos professores e funcionários. Especialmente ao Valdecir e ao Márcio, sem vocês nada seria possível. Vou guardar com carinho as brincadeiras e suas risadas.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro e por acreditar nos resultados deste trabalho.

E a todos aqueles que estiveram direta e indiretamente envolvidos não apenas na conclusão dessa etapa da minha vida, mas também de todas as outras. Tudo o que aconteceu me trouxe até aqui. Sou grata pelo amor que me cerca, pelo bem que me rodeia, por aqueles que se importam comigo.

APOIO FINANCEIRO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, processo nº 131507/2021-4

Sumário

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
APOIO FINANCEIRO	v
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1. Panorama geral da aquicultura	4
2. Restrição alimentar e realimentação	4
3. Desempenho zootécnico durante a restrição	5
4. Metabolismo energético durante a restrição	6
5. Sistema imune de peixes	8
6. Sistema antioxidante e a restrição alimentar	9
7. Pacu.....	12
8. Referências.....	13
CAPÍTULO 2.....	25
Efeitos da restrição alimentar e realimentação no desempenho, metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse oxidativo de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT	27
1. Introdução	28
2. Materiais e métodos.....	30
2.1. Animais e protocolo experimental	30
2.2. Amostragens.....	31
2.3. Análises	32
2.3.1. Indicadores do desempenho zootécnico	32

2.3.2. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais	32
2.3.2.1. Concentração de glicose no plasma	32
2.3.2.2. Concentração de triglicerídeos no plasma	32
2.3.2.3. Concentração de colesterol no soro	33
2.3.2.4. Concentração de glicogênio hepático	33
2.3.2.5. Concentração de lipídio hepático e muscular	34
2.3.2.6. Índices morfométricos	34
2.3.3. Indicadores imunológicos.....	34
2.3.3.1. Atividade respiratória de leucócitos.....	34
2.3.3.2. Concentração sérica de lisozima.....	35
2.3.4. Indicadores do sistema antioxidante hepático	35
2.3.4.1. Concentração de proteína total	35
2.3.4.2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	35
2.3.4.3. Atividade da enzima catalase (CAT)	36
2.3.4.4. Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST).....	36
2.3.4.5. Concentração da glutathione reduzida (GSH)	36
2.3.4.6. Peroxidação lipídico (LPO).....	36
2.4. Análise estatística	36
3. Resultados.....	37
3.1. Ensaio experimental 1 – Aplicação de estratégias alimentares de restrição alimentar e realimentação com oferta de alimento controlada e à saciedade aparente	37
3.1.1. Indicadores de desempenho zootécnico	37
3.1.1.1. Ganho de peso (Fig. 1 A)	37
3.1.1.2. Taxa de crescimento específico (TCE) (Fig. 1 B)	38
3.1.1.3. Conversão alimentar (CA) (Fig. 1 C)	38
3.1.2. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais	39
3.1.2.1. Concentração plasmática de glicose (Fig. 2A)	39
3.1.2.2. Concentração plasmática de triglicerídeos (Fig 2B)	39

3.1.2.3. Concentração sérica de colesterol (Fig. 2C).....	39
3.1.2.4. Concentração de glicogênio no fígado (Fig. 3)	40
3.1.2.5. Concentração de lipídio hepático e muscular (Fig. 4 A e B)	41
3.1.2.6. Índices morfométricos (Índice hepatossomático/IHS e Índice de gordura víscero-somática /IGVS) (Fig. 5A e B)	43
3.1.3. Indicadores imunológicos.....	45
3.1.3.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Fig. 6A)	45
3.1.3.2. Concentração sérica de lisozima (Fig. 6B)	45
3.1.4. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo	45
3.1.4.1. Superóxido dismutase (SOD) (Fig. 7).....	46
3.1.4.2. Catalase (CAT) (Fig. 8)	46
3.1.4.3. Glutathione-S-transferase (GST) (Fig. 9)	47
3.1.4.4. Glutathione reduzida (GSH) (Fig. 10).....	48
3.1.4.5. Peroxidação lipídica (LPO) (Fig. 11)	49
3.2. Ensaio experimental 2 – Desafio imunológico com inoculação de LPS após aplicação de estratégias alimentares de restrição alimentar e realimentação com oferta de alimento controlada e à saciedade aparente	50
3.2.1. Indicadores imunológicos.....	50
3.2.1.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Fig. 12A)	50
3.2.1.2. Concentração sérica de lisozima (Fig. 12B)	51
3.2.2. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo	52
3.2.2.1. Superóxido dismutase (SOD) (Fig. 13).....	52
3.2.2.2. Catalase (CAT) (Fig. 14)	53
3.2.2.3. Glutathione-S-transferase (GST) (Fig. 15)	54
3.2.2.4. Glutathione reduzida (GSH) (Fig. 16).....	55
3.2.2.5. Peroxidação lipídica (LPO) (Fig. 17)	56
4. Discussão	57
5. Conclusão.....	63
6. Referências.....	64

RESUMO

A aquicultura vem crescendo e a intensificação da produção traz consequências negativas para os peixes e o meio ambiente. Nestes sistemas, a alimentação é oferecida com alta frequência, diferente do que ocorre no ambiente natural, o que torna possível o uso de ciclos de restrição do alimento e realimentação. Durante períodos de jejum, os peixes mobilizam reservas energéticas e na realimentação ativam mecanismos compensatórios para reposição destas reservas, o que altera a dinâmica da produção de energia, quando dois sistemas podem ser afetados: o sistema imune, de alto custo energético, e o sistema antioxidante, que é ativado durante a ativação da respiração celular para combater os radicais livres formados. Considerando o exposto, esse estudo avaliou a dinâmica metabólica, respostas imunes inatas e do sistema antioxidante, durante a restrição alimentar e a realimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Para isso, os peixes foram submetidos a ciclos de 3 dias de restrição e dois dias de realimentação por 30 dias ou a 21 dias de restrição seguidos de 9 dias de realimentação e, ao final, inoculados com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que a restrição alimentar modulou as reservas energéticas durante os 21 dias de restrição alimentar, e após 9 dias de realimentação promoveu o crescimento compensatório e a recuperação das reservas energéticas. O sistema imune (atividade respiratória dos leucócitos - ARL e lisozima sérica) não foi afetado pela restrição alimentar, mas a realimentação ativou a ARL e reduziu a concentração de lisozima. Em peixes privados de alimento, o sistema antioxidante demonstrou prejuízos na capacidade de resposta. Embora houvesse ativação de enzimas antioxidantes, a alta mobilização de energia durante o jejum provocou estresse oxidativo.

Palavras-chave: Aquicultura, Restrição Alimentar, Fisiologia, Sistema Antioxidante.

ABSTRACT

Aquaculture is growing the intensification of production has negative consequences for fish and the environment. In these systems, feed is offered at a high frequency, unlike in the natural environment, which makes it possible to use feed restriction and refeeding cycles. During periods of fasting, fish mobilize energy reserves, and during re-feeding they activate compensatory mechanisms to replenish these reserves. Thus, metabolic changes alter the dynamics of energy production, and two systems may be affected: the immune system and the antioxidant system, which responds to the production of free radicals during the activation of cellular respiration. Considering the above, this study evaluated the metabolic dynamics, innate immune and antioxidant system responses, during feed restriction and re-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). The fish were subjected to cycles of 3 days of restriction and 2 days of refeeding for 30 days or to 21 days of restriction followed by 9 days of refeeding and, at the end, inoculated with lipopolysaccharide (LPS). The results of this study showed that dietary restriction modulated energy reserves during the 21 days of dietary restriction, and after 9 days of refeeding promoted compensatory growth and recovery of energy reserves. The immune system (leukocyte respiratory activity and lysozyme) was not affected by dietary restriction, but refeeding activated ARL and reduced serum lysozyme concentration. In food-deprived fish, the antioxidant system showed impaired responsiveness. Although there was activation of antioxidant enzymes, the high energy mobilization during fasting caused oxidative stress.

Keywords: Aquaculture, Food Restriction, Physiology, Antioxidant System.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. Panorama geral da aquicultura

A agropecuária possui um papel importante na economia do Brasil e do mundo. A aquicultura é um sistema de produção de organismos aquáticos de alto valor nutritivo que tem apresentado rápido crescimento nos últimos anos. Segundo a FAO (2021), a aquicultura, em particular, provou ser uma das práticas de produção mais diversificadas do mundo em termos de espécies, métodos de cultivo e ambientes utilizados.

As principais espécies cultivadas na piscicultura de água doce, como carpas, bagres e tilápia, e que dominam a produção aquícola global, são onívoras ou herbívoras e consomem baixos níveis de proteína e farinha de peixe nas rações. O cultivo dessas espécies é facilitado pela alta taxa de reprodução, tolerância a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e acúmulo de nutrientes, permitindo serem utilizadas tecnologias básicas de custo relativamente baixo (Zhang et al., 2022).

Dessa forma, o consumo de peixes se torna acessível a consumidores de baixa e média renda e fazem uma contribuição importante para a segurança alimentar e nutricional global (Belton et al., 2018). Segundo Zhang et al. (2022), o maior consumo de alimentos aquáticos ocorrerá em países do sul do globo terrestre, os quais possuem as maiores taxas de crescimento populacional, rápida urbanização, expansão da aquicultura e desenvolvimento econômico, como África e Ásia.

O território brasileiro conta com a maior reserva de água doce do mundo (aproximadamente 5.500.000 hectares de lâmina d'água) (BRASIL, 2012), e isso contribui para o alto potencial da aquicultura no Brasil. De acordo com o Anuário Peixe BR (2022), o Brasil produziu 841.005 toneladas de peixes de cultivo (tilápia, peixes nativos e outras espécies) em 2021, representando um crescimento de 4,7% sobre a produção de 2020. Enquanto isso, a produção de peixes nativos representou 31,2% da produção nacional, neste mesmo ano.

Portanto, a atividade aquícola se destaca pelo crescimento na produção de alimentos saudáveis, contribui para a geração de empregos e renda, e conseqüente redução da fome e pobreza em diversas partes do mundo.

2. Restrição alimentar e realimentação

Para a otimização da produção são utilizadas muitas estratégias na piscicultura, desde a formulação de rações até a oferta de alimentos. Os peixes possuem

mecanismos que os tornam capazes de enfrentar, na natureza, longos períodos de privação alimentar (Souza et al., 2000; Bar, 2014; Urbinati et al., 2014; Staples, 2016). Desta forma, torna-se interessante o manejo alimentar que se utiliza de períodos de restrição e realimentação.

Durante longos períodos sem comida, os peixes mobilizam as reservas energéticas, as quais podem diferir em relação à duração dos ciclos, estação do ano e espécie. Vários estudos investigaram o uso da restrição e realimentação em *Siniperca scherzeri* (Kim et al., 2022), *Arctic charr* (Cassidy et al., 2018), *Danio rerio* (Liao et al., 2021), *Pyrrhulina brevis* (Abe et al., 2021), *Brycon amazonicus* (Urbinati et al., 2014), *Rutilus rutilus* (Van Dijk et al., 2002), *Oncorhynchus mykiss* (Fauconneau e Paboeuf, 2000), *Piaractus mesopotamicus* (Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2011; Takahashi et al., 2014); *Pagrus pagrus* (Rueda et al., 1998), *Dicentrarchus labrax* (Terova et al., 2007), *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2020), *Oreochromis niloticus* (Nebo et al., 2018; Wang et al., 2019; Robisalmi et al., 2021), entre outras.

Em pacus, Souza et al. (2000) demonstraram que períodos longos de restrição causaram alterações metabólicas adaptativas sem comprometer as taxas de crescimento durante a realimentação. Porém, em aplicações de curto prazo, indivíduos de tamanho menor, foram incapazes de atingir a mesma taxa de crescimento (Takahashi et al., 2011). Em outro estudo, Gimbo et al. (2015) relataram que a estratégia alimentar não prejudicou as respostas imunes inatas do pacu após 30 dias sem alimento. Adicionalmente, após a realimentação, juvenis que passaram por 30 dias de jejum apresentaram hiperfagia e crescimento compensatório (Favero et al., 2020).

3. Desempenho zootécnico durante a restrição

Regimes de manejo alimentar baseados em ciclos de jejum e realimentação podem induzir o crescimento compensatório dos peixes (Xiao et al., 2013), e, deste modo, são importantes os dados de desempenho zootécnico. O manejo alimentar que envolve ciclos de restrição alimentar tem grande potencial na aquicultura, melhora o desempenho do crescimento dos peixes, a eficiência alimentar e a produção (Chatakondi e Yant, 2001; Salgado-Ismodes et al., 2020; De Verdal et al., 2018) e minimiza problemas hídricos, tais como a eutrofização (Tacon et al., 2022).

O crescimento compensatório dos animais é caracterizado pela restauração rápida de peso no decorrer da administração de alimentos durante a realimentação (Won e Borski, 2013), que ocorre pela compensação do metabolismo, através de mecanismos bioquímicos, aumentando a ingestão de alimentos (hiperfagia), ou a utilização deste, reforçando o ganho de peso (Urbinati et al., 2014; Kim e Lovell, 1995). A realimentação pode provocar três respostas diferentes: sobrecompensação, em que os animais em restrição atingem tamanho maior do que aqueles alimentados continuamente; compensação parcial, em que os animais, após a restrição não atingem o mesmo tamanho daqueles alimentados continuamente, porém apresentam boa conversão alimentar; e não compensação, quando não há respostas compensatórias durante a realimentação (Hayward et al., 1997; Heide et al., 2006; Takahashi et al., 2011). Vários estudos, utilizando diferentes protocolos experimentais, encontraram diferentes respostas acerca da melhoria na conversão alimentar dos peixes após o período de realimentação (Hayward et al., 1997; Nikki et al., 2004; Cho, 2005), assim como a resposta metabólica ao jejum e realimentação concomitante ao crescimento dos peixes (Urbinati et al., 2014; Gaylord e Gatlin III, 2001; Ferrando et al., 2009; Abdel-Tawwab et al., 2006). A resposta do crescimento compensatório é variável quanto ao grau da restrição alimentar, espécie de peixe, estágio de vida, temperatura da água e presença de nutrientes e suplementos na dieta (Hayward et al., 1997; Turano et al., 2008; Wu et al., 2002; Falahatkar, 2012; Cho e Heo, 2010; Xiao et al., 2013; Favero et al., 2018).

4. Metabolismo energético durante a restrição

Passar por um longo período sem comida faz parte do ciclo de vida de muitas espécies de peixes e sua sobrevivência não é prejudicada, pois os animais podem se recuperar completamente após a realimentação. Para tanto, essas espécies estão bem adaptadas para mobilizar suas reservas metabólicas para manter as suas funções vitais (Navarro e Gutierrez, 1995). Entretanto seus efeitos são variáveis quanto a espécie de peixe (Polakof et al., 2012), estação do ano (Cho, 2005; Cho, 2006), temperatura (Van Dijk et al., 2002), fotoperíodo (Bjørnevik et al., 2017), fase de vida (Liang et al., 2017) e duração do jejum (Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2012).

Durante o jejum ou em situações de baixo consumo energético, as principais reservas requisitadas pelo organismo são o glicogênio, lipídios e proteínas (Secor e Carey, 2016). Na maioria das espécies de peixes, a ordem de requisição desses substratos começa pelo glicogênio, seguido pelas reservas lipídicas no fígado, músculos e vísceras, e posteriormente, proteínas, como relatado em *Piaractus mesopotamicus* (Souza et al., 2003; Favero et al., 2018), *Colossoma macropomum* (Santos et al., 2021), *Oreochromis niloticus* (Sakya et al., 2020), *Labeo rohita* (Yengkokpam et al., 2008), *Clarias batrachus* (Kumar e Prakash, 2021), *Carassius auratus gibelio* (Li et al., 2018) e *Lutjanus guttatus* (Hernández et al., 2019).

A glicogenólise ocorre pela quebra do glicogênio por meio das enzimas glicogênio fosforilase, fosfoglicomutase e glicose-6-fosfatase, liberando glicose na corrente sanguínea (Enes et al., 2011). O glicogênio é mantido pela gliconeogênese, utilizando lactato, piruvato e alguns aminoácidos (Polakof et al., 2012). Para determinar a modulação energética em animais que passam por períodos de privação de alimento, a glicose sanguínea é a variável fisiológica mais utilizada (McCue, 2010). Entretanto, as concentrações de glicose no sangue são mantidas em um nível constante durante o jejum devido à glicogenólise e à gliconeogênese (Navarro e Gutierrez, 1995). Estudos com diferentes espécies de peixes não relataram alterações nas concentrações de glicose durante a restrição alimentar e após a realimentação (Zapryanova et al., 2021; Favero et al., 2021; Eslamloo et al., 2017). Entretanto, Rossi et al. (2015) verificaram redução dos níveis plasmáticos de glicose em peixes sob restrição alimentar de 7 e 28 dias, assim como Favero et al. (2018) em pacus após 15 dias de restrição alimentar.

O jejum influencia a mobilização de diferentes tecidos adiposos. Os lipídios podem ser armazenados no fígado, gordura intestinal/visceral e músculo, variando a importância quantitativa de cada tecido entre as espécies (Tunçelli e Pirhonen, 2021; Zheng et al., 2016; Weil et al., 2013; Jezierska et al., 1982). No plasma, quando a ingestão de energia é maior que o gasto, o tecido adiposo armazena a energia na forma de triglicerídeos (lipogênese), e durante o jejum essa energia é liberada na forma de ácidos graxos (lipólise) (Weil et al., 2013). Xu et al. (2022) observaram em *Scophthalmus maximus* que a inanição mobilizou diferentes ácidos graxos para o fornecimento de energia no fígado e no músculo. Medidas de metabólitos lipídicos circulantes, triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos são frequentemente usados para

inferir as taxas nas quais os lipídios são mobilizados durante a inanição (Bar, 2014; McCue, 2010). É de grande importância para a produção, o manejo da deposição da gordura principalmente em termos de qualidade da carne, uma vez que o armazenamento dos lipídios no músculo afeta o valor nutricional e as propriedades sensoriais da carne (Wood et al., 2008).

As proteínas são as últimas reservas a serem mobilizadas durante a modulação energética (Navarro e Gutierrez, 1995). Em sua maioria, os aminoácidos são utilizados como substratos para a gliconeogênese (Polakof et al., 2012). Níveis circulantes de proteínas e/ou aminoácidos livres têm sido usados como um substituto para as taxas nas quais as proteínas são mobilizadas durante a inanição, dentre estes, alanina e glutamina contribuem com a maior quantidade para a gliconeogênese derivada de proteínas (Marqueze et al., 2017; Bar, 2014). Dessa forma, a modulação de carboidratos, lipídios e proteínas é um indicio da homeostase energética nos peixes.

5. Sistema imune de peixes

Os peixes possuem para sua defesa um conjunto de componentes celulares e humorais, chamado de sistema imunológico. Este sistema é capaz de identificar elementos pertencentes ao próprio organismo ou substâncias exógenas, as quais representam um risco ao equilíbrio do organismo, como microrganismos e toxinas (Rauta et al., 2012; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). O sistema imunológico de peixes é dividido, como o de outros vertebrados, em sistema imune inato ou não específico e em sistema imune adaptativo ou específico (Urbinati et al., 2020; Mokhtar et al., 2023).

O sistema imune inato é conhecido como a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos e atua de forma rápida e inespecífica. O tegumento (pele e o muco) e as células de defesa, como os granulócitos, monócitos, macrófagos e células natural killer (NK) e alguns componentes humorais fazem parte do sistema imune inato (Abbas, 2015). Sua ativação ocorre pela detecção de agentes infecciosos por PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos) presentes nos patógenos, através dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) (Elward e Gasque, 2003; Boltaña et al., 2011), desencadeando uma sinalização intracelular que leva à morte do agente externo (Kum e Sekkin, 2011).

Ao degradar e fagocitar os microrganismos nocivos ao peixe, os neutrófilos e macrófagos, componentes celulares do sistema imune inato, produzem ânions superóxidos, através da “explosão oxidativa” (do inglês, oxidative burst) que atua como bactericida extracelular (Secombes, 1996; Schwarz, 1996). Estes componentes celulares também produzem enzimas que apresentam atividade lítica contra parasitas, bactérias e vírus, conhecidos como lisozimas (Callewaert e Michiels, 2010) e está presente no soro, secreções e mucosas (Grinde et al., 1988). A lise contra invasores ocorre devido estas enzimas atuarem na digestão de carboidratos (peptidoglicano) da parede bacteriana (Magnadottir, 2006; Saurabh e Sahoo, 2008)

O sistema complemento é um dos principais mediadores da resposta inflamatória, atraindo células fagocíticas (Nonaka et al., 2001). Esse sistema é composto por um conjunto de cerca de 35 proteínas que atuam em uma cascata de reações enzimáticas destruindo os patógenos ao romper a estrutura da membrana celular, permitindo a fagocitose e inativando as toxinas produzidas pelo patógeno. Podem participar das respostas inatas, pela via alternativa, e/ou das respostas adquiridas, pela via clássica (Urbinati et al., 2020).

O sistema imune específico de defesa atua no organismo contra um antígeno específico (Abbas, 2015). A presença desse antígeno desencadeia uma cascata de reações que provoca o aumento de anticorpos próprios circulantes específicos para aquele invasor, e geram memória imune (Bernstein et al., 1998), portanto, é necessário tempo para que o sistema adaptativo seja ativado (Carey et al., 1999). Os componentes celulares do sistema imune específico são as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, e os componentes humorais são as imunoglobulinas (Urbinati et al., 2020).

Para a ativação do sistema imune inato e específico, o organismo requer uma intensa mobilização de energia. Dessa forma, durante a aplicação de ciclos de restrição alimentar, a mobilização intensa de energia para a manutenção do organismo pode prejudicar a homeostase do sistema imune dos peixes, deixando-os vulneráveis aos desafios do ambiente.

6. Sistema antioxidante e a restrição alimentar

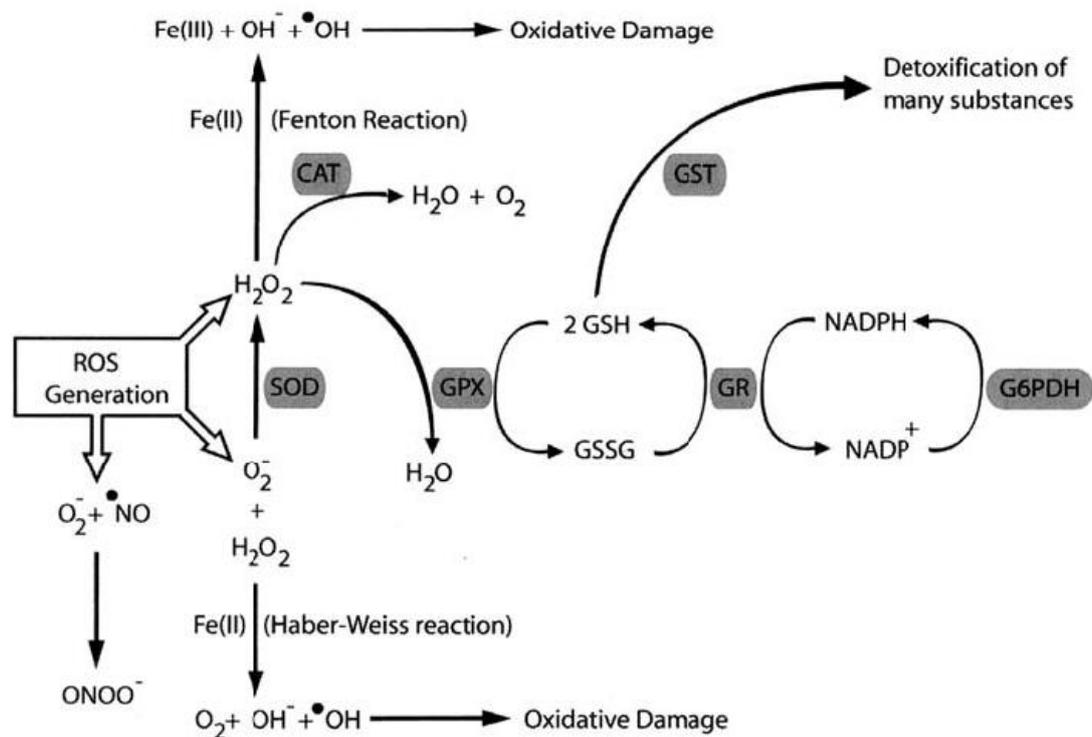


Figura 1. Integração do sistema de defesa antioxidante enzimático (Hermes de Lima, 2005).

A restrição alimentar altera a modulação energética dos peixes, principalmente de açúcares e tecidos adiposos (Enes et al., 2009). Pensando-se que a dinâmica metabólica dos organismos sofre profundas alterações relacionadas à produção de energia durante a restrição alimentar e a realimentação, os mecanismos de oxirredução na cadeia de fosforilação mitocondrial podem ser afetados por essas estratégias dietéticas.

A liberação de radicais livres, a partir dos mecanismos de oxirredução, ocorre naturalmente durante o metabolismo aeróbico das células (Frisard e Ravussin, 2006) nas membranas, citoplasma e principalmente nas mitocôndrias. As mitocôndrias geram a maior parte dos radicais livres, devido a cadeia transportadora de elétrons, provenientes da glicose e oxigênio durante a produção de energia (Apel e Hirt, 2004). A geração de espécies reativas de oxigênio é um processo fisiológico contínuo nas células, cumprindo funções biológicas relevantes, e atua como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. A cadeia de transporte de elétrons é responsável pelo transporte de elétrons através de proteínas de membrana que criam um gradiente de prótons, o qual produz a energia necessária para gerar ATP (energia) (Jacob, 1995).

As espécies reativas de oxigênio são uma família de radicais livres, incluindo superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são produzidos como resultado de reações com oxigênio (Bounous e Molson, 2003). Devido a presença de elétrons desemparelhados, os radicais livres são moléculas instáveis. Como resultado, eles podem ser altamente reativos, reagindo localmente para aceitar ou doar elétrons para outras moléculas para tornarem-se estáveis. Exemplos importantes dessas reações são a peroxidação lipídica de membranas, avaliadas a partir da quantificação da concentração plasmática de malondialdeído (Cherian et al., 2019), e danos às proteínas e DNAs, a partir de reticulação ou fragmentação, quebras de fita simples e duplas ligações cruzadas entre proteínas e DNA. Por isso, estão associadas a algumas patologias como diabetes, obesidade, câncer, transtornos neurodegenerativos e doenças associadas ao envelhecimento (Jacob, 1995; Bounous e Molson, 2003; Apel e Hirt, 2004).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Jacob, 1995). O sistema antioxidante consiste em uma série de enzimas e numerosos compostos antioxidantes endógenos e dietéticos que reagem e inativam as espécies reativas ao oxigênio (EROs) (Roberts e Sindhu, 2019).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Jacob e Burri, 1996). As enzimas antioxidantes endógenas incluem a superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), entre outras. Enquanto isso, os antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, vitamina E, β -caroteno, glutathione reduzida (GSH) e numerosos fitoquímicos. As células devem manter seus níveis antioxidantes por meio da síntese de novas enzimas ou através da ingestão alimentar desses (Roberts e Sindhu, 2019; Jacob e Burri, 1996).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das primeiras enzimas a serem requisitadas pelo sistema antioxidante, e tem como função biológica catalisar a conversão do ânion

superóxido (O_2^-) liberado nas mitocôndrias e peroxissomos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é menos reativo e pode ser utilizado por outras enzimas (McCord e Fridovich, 1969).

A catalase (CAT) decompõe peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando moléculas de água e oxigênio, entretanto é dependente de NADPH (Eaton et al., 1991; Vasykiv et al., 2011). É encontrada em todos os organismos vivos, principalmente no sangue, fígado, baço e rins (Oliveira e Schoffen, 2010). A SOD e CAT de peixes são estrutural e funcionalmente semelhantes às de mamíferos (Wilhelm-Filho et al., 2001).

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) tem como função reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água utilizando da glutaciona reduzida (GSH) como cofator e gerando como produto a glutaciona oxidada (GSSG) (Oliveira e Schoffen, 2010; Halliwell, 2007).

A enzima glutaciona-S-transferase (GST) tem importante papel na detoxificação e eliminação intracelular de compostos eletrolíticos e xenobióticos, a partir da catalisação da conjugação da molécula de glutaciona em diversas outras moléculas (Kantoniemi et al., 1996; Chelvanayagam et al., 2001).

A glutaciona reduzida (GSH) pertence aos antioxidantes celulares não enzimáticos, sendo uma flavoproteína dependente do NADPH (Antunes-Neto, 2005). Está envolvida no transporte de aminoácidos e detoxificação, participando na proteção das células contra os mecanismos ativos de desintoxicação (Stamler e Slivka, 1996; Jiang et al., 2015).

Em mamíferos, a privação de alimentos tem sido relacionada a efeitos pró-oxidantes, sendo responsável pela maioria dos efeitos prejudiciais às células, uma vez que o aumento da geração de EROs não é adequadamente neutralizado pelos sistemas antioxidantes do organismo (Morales et al., 2004). Entretanto, em peixes, pouco se sabe sobre o funcionamento do sistema antioxidante durante as estratégias de restrição alimentar seguido de realimentação, dessa forma, estudos dessa natureza são importantes.

7. Pacu

O pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), teleósteo representante da superordem Ostariophysi, ordem Characiformes e família Characidae, pertence à categoria dos peixes redondos e possui coloração acinzentada com gradações de

amarelo e verde no seu ventre. Essa ordem de peixes de água doce é dominante na América do Sul, principalmente nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. No Brasil, ocorre nas planícies alagadas do Centro-Oeste (Urbinati e Takahashi, 2021).

Seu hábito alimentar compreende desde folhas, caules, flores, frutos e sementes, sendo assim, um peixe onívoro, o que torna seu cultivo favorecido, pois demandam pouco ou nenhum ingrediente de origem animal, além da fácil adaptação da espécie aos diversos sistemas de produção e boa aceitação em dietas comerciais (Urbinati e Takahashi, 2021). Sua produção ocorre por meio de técnicas semi-intensivas ou intensivas em tanques de terra de 500 a até 10.000 m², além de serem adaptáveis à produção em tanques rede (Valladão et al., 2016).

Esta espécie é migratória e pode alterar o seu hábito alimentar de acordo com a sazonalidade da oferta de alimentos. Além de possuir facilidade de adaptação em ambiente de cativeiro aliado ao seu rápido crescimento e ganho de peso elevado, é uma excelente opção de carne branca de ótima qualidade (Abimorad et al., 2007).

Na natureza, essa espécie é exposta a períodos de inanição ou ingestão restrita de alimentos devido às alterações temporais e espaciais de alimento no ambiente aquático, ou mesmo, pela migração para desova (Souza *et al.*, 2003), e o mesmo pode ocorrer nas pisciculturas por razões práticas. A partir disso, estudos têm demonstrado que o pacu é um peixe que responde bem ao manejo alimentar que inclui ciclos de jejum e realimentação (Souza et al., 2000; Gimbo et al., 2015; Favero et al., 2018; Favero et al., 2020). Assim, estabelecer estratégias adequadas de manejo alimentar, com ciclos de jejum e realimentação pode reduzir os custos de produção e os efeitos negativos no meio ambiente, e com isso aumentar a produção (Urbinati et al., 2014). Considerando o exposto, esta tese avaliou os mecanismos bioquímicos de mobilização energética durante o jejum e os mecanismos compensatórios que ocorrem durante a realimentação e sua relação com os mecanismos de defesa imunológica inata e o sistema antioxidante no pacu.

8. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição. **Saunders Elsevier**, 2015.

ABDEL-TAWWAB, M., KHATTAB, Y.A.E., AHMAD, M.H., SHALABY, A.M.E. Compensatory growth, feed utilization, whole-body composition, and

- hematological changes in starved juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Applied Aquaculture**, v.18, p.17-36, 2006.
- ABE, H.A., REIS, R.G.A., PAIXAO, P.E.G., FUJIMOTO, R.Y. Effect of short-term fasting and re-feeding on growth performance of larvae and juveniles *Pyrrhulina brevis*, an amazon ornamental fish. **Journal of Applied Aquaculture**, p.1-13, 2021. DOI: 10.1080/10454438.2021.1904084.
- ABIMORAD, E.G., CARNEIRO, D.J., URBINATI, E.C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v.38, p.36-44, 2007.
- ANTUNES NETO, J.M.F., SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. **Rev. Bras. Ciênc. Mov**, v.13, p.73-80, 2005.
- ANUÁRIO Peixe-BR 2021 - PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PeixeBR. Associação Brasileira da Piscicultura. Disponível em: <http://www.peixebr.com.br>.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373, 2004.
- ASSIS, Y.P.A.S., PORTO, L.A., MELO, N.F.A.C., PALHETA, G.A., LUZ, R.K., FAVERO, G.C. Feed restriction as a feeding management strategy in *Colossoma macropomum* juveniles under recirculating aquaculture system (RAS). **Aquaculture**, v. 529, p. 735689, 2020.
- BAR, N. Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.71, p.1447-1458, 2014.
- BELTON, B., BUSH, S.R., LITTLE, D.C. Not just for the wealthy: rethinking farmed fish consumption in the global South. **Global Food Security**, v.16, p.85–92, 2018.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2^a ed., p.215-242, 1998.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D., URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, p.1484-1506, 2014.
- BJØRNEVIK, M., HANSEN, H., ROTH, B., FOSS, A., VIKINGSTAD, E., SOLBERG, C., IMSLAND, A.K. Effects of starvation, subsequent feeding and photoperiod on flesh quality in farmed cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture Nutrition**, v.23, p. 285-292, 2017.

- BOLTAÑA, S., ROHER, N., GOETZ, F.W., MACKENZIE, S.A. PAMPs, PRRs and the genomics of gram-negative bacterial recognition in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v.35, p.1195-1203, 2011.
- BOUNOUS, G., SUKKAR, S., MOLSON, J.H. The antioxidant system. **Anticancer research**, v. 23, p. 1411-1416, 2003.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, DF, p. 128, 2012.
- CALLEWAERT, L., MICHIELS, C.W. Lysozymes in the animal kingdom. **Journal of Biosciences**, v.35, p.127-160, 2010.
- CAREY, C., COHEN, N., ROLLINS-SMITH, L. Amphibians declines: an immunological perspective. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p.459-472, 1999.
- CASSIDY, A., BLIER, P.U., LE FRANÇOIS, N.R., DIONNE, P., MORIN, P. JR, SIMON, G.L. Effects of fasting and refeeding on protein and glucose metabolism in Arctic charr. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.226, p.66-74, 2018.
- CHATAKONDI, N.G., YANT, R.D. Application of compensatory growth to enhance production in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, p.278-285, 2001.
- CHELVANAYAGAM, G., PARKER, M.W., PHILIP, B. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-biological Interactions*, v.133, p.256-260, 2001. <http://hdl.handle.net/1885/90725>
- CHERIAN, D.A., PETER, T., NARAYANAN, A., MADHAVAN, S.S., ACHAMMADA, S., VYNAT, G.P. Malondialdehyde as a marker of oxidative stress in periodontitis patients. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 11, n. Suppl 2, p. S297, 2019.
- CHO, S.H., HEO, T.-Y. Effect of dietary nutrient composition on compensatory growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* using different feeding regimes. **Aquaculture Nutrition**, v. 7, p.90-97, 2011.
- CHO, S.H., LEE, S-M., PARK, B.H J., S-C., LEE, J., BAE, J., OH, S-Y. Compensatory growth of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* L., and changes in proximate composition and body condition indexes during fasting and after refeeding in summer season. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.37, p.168-174, 2006.
- 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 the World Aquaculture Society**, v.36, p.508-514, 2005.

DE VERDAL, H., KOMEN, H., QUILLET, E., CHATAIN, B., ALLAL, F., BENZIE, J.A.H., VANDEPUTTE, M. Improving feed efficiency in fish using selective breeding: a review. **Reviews in Aquaculture**, v.10, p. 833-851, 2018.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.118, p.3-4, 1991.

ELWARD, K., GASQUE, P. “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. **Molecular Immunology**, v.40, p.85-94, 2003.

ENES, P., PANSERAT, S., KAUSHIK, S., OLIVA-TELES, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 519-539, 2009.

ENES, P., PANSERAT, S., KAUSHIK, S., OLIVA-TELES, A. Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) juveniles. **Reviews in Fisheries Science**, v.19, p.201-215, 2011.

ESLAMLOO, K., MORSHEDI, V., AZODI, M., AKHAVAN, S.R. Effect of starvation on some immunological and biochemical parameters in tinfoil barb (*Barbonymus schwanenfeldii*). **Journal of Applied Animal Research**, v.45, p.173-178, 2017.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO.

FALAHATKAR, B. The metabolic effects of feeding and fasting in beluga *Huso huso*. **Marine Environmental Research**, v.82, p.69-75, 2012.

FAUCONNEAU, B., PABOEUF, G. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell and Tissue Research**, v. 301, p.459-463, 2000.

FAVERO, G.C., GIMBO, R.Y., FRANCO MONTOYA, L.N., CARNEIRO, D.J., URBINATI, E.C. A fasting period during grow-out make juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) leaner but does not impair growth. **Aquaculture**, v.524, p.735242, 2020.

- FAVERO, G.C., SANTOS, F.A.C., JÚLIO, G.S.C., PEDRAS, P.P.C., FERREIRA, A.L., SILVA, W.S., FERREIRA, N.S., NEVES, L.C., LUZ, R.K. Effects of short feed restriction cycles in *Piaractus brachypomus* juveniles. **Aquaculture**, v.536, p.736-745, 2021.
- FAVERO, G.C., GIMBO, R.Y., FRANCO MONTOYA, L., ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Research**, v.49, p.359-366, 2018.
- FERRANDO, S., GAMBARDELLA, C., BOTTARO, M., SAROGLIA, M., TEROVA, G., TAGLIAFIERRO, C. The compensatory growth in juveniles of sea bass: gastric distributive pattern of molecules regulating metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1163, p.389-393, 2009.
- FRISARD, M., RAVUSSIN, E. Energy metabolism and oxidative stress. **Endocrine**, v.29, p.27-32, 2006.
- GAYLORD, T.G., GATLIN III, D.M. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.194, p.337-348, 2001.
- GIMBO, R.Y., FAVERO, G.C., FRANCO MONTOYA, L., URBINATI, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.43, p.295-300, 2015.
- GRINDE, B., JOLLÈS, J., JOLLÈS, P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **European Journal of Biochemistry**, v.173, p.269-273, 1988.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v.35, p.1147-1150, 2007.
- HAYWARD, R.S., HAYWARD, R.S., NOLTIE, D.B., WANG, N. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.126, p.316-322, 1997.
- HEIDE, A., FOSS, A., STEFANSSON, S.O., MAYER, Y., NORBERG, B.C., 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.
- HERNÁNDEZ, C., HURTADO-OLIVA, M.A., PEÑA, E. Effect of short-term starvation on hematological and blood biochemical parameters in juvenile spotted rose snapper

Lutjanus guttatus (Steindachner, 1869). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.47, p.9-17, 2019.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v.15, p.755-766, 1995.

JACOB, R.A., BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 6, p. 985S-990S, 1996.

JEZIERSKA, B., HAZEL, J.R., GERKING, S.D. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*, with attention to fatty acids. **Journal of Fish Biology**, v.21, p.681-692, 1982.

JIANG, J., SHI, D., ZHOU, X-Q., YIN, L., FENG, L., LIU, Y., JIANG, W-D., ZHAO, Y. Effects of glutamate on growth, antioxidant capacity, and antioxidant-related signaling molecule expression in primary cultures of fish enterocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1143-1153, 2015.

KANTONIEMI, A., VÄHÄKANGAS, K., OIKARI, A. The capacity of liver microsomes to form benzo [a] pyrene-diolepoxide-DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.35, p. 136-141, 1996.

KIM, M.K., LOVELL, R.T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. **Aquaculture**, v.135, p.285-293, 1995.

KIM, Y-O., OH, S-Y., KIM, T. Effect of Fasting and Refeeding on Juvenile Leopard Mandarin Fish *Siniperca scherzeri*. **Animals**, v.12, p.889, 2022.

KUM, C., SEKKIN, S. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs. **Recent Advances in Fish Farms**, p.169-210, 2011.

KUMAR, A., PRAKASH, S. Alterations in hematological and biometric parameters of *Clarias batrachus* (Linn, 1758) following short-term starvation. **International Journal of Biological Innovations**, v.3, 2021. <https://doi.org/10.46505/ijbi.2021.3119>

LI, H., XU, W., JIN, J., YANG, Y., ZHU, X., HAN, D., LIU, H., XIE, S. Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture**, v. 496, p. 166-175, 2018.

LIANG, X., WANG, J., GONG, G., XUE, M., DONG, Y., WU, X., WANG, X., CHEN, C., LIANG, X., QIN, Y. Gluconeogenesis during starvation and refeeding phase is affected

by previous dietary carbohydrates levels and a glucose stimuli during early life in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Animal Nutrition**, v.3, p.284-294, 2017.

LIAO, Z., LIN, D., JIA, J., CAI, R., YU, Y., LI, W. Innate Immune Response to Fasting and Refeeding in the Zebrafish Kidney. **Biomolecules**, v.11, p.825, 2021.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**, v.20, p.137-151, 2006.

MARQUEZE, A., GARBINO, C.F., TRAPPL, M., KUCHARSKI, M., FAGUNDES, M., FERREIRAK, D., OAKOSKI G., ROSA J.G.S. Protein and lipid metabolism adjustments in silver catfish (*Rhamdia quelen*) during different periods of fasting and refeeding. **Brazilian Journal of Biology**, v.78, p.464-471, 2017.

MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MCCUE, M.D. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.156, p.1-18, 2010.

MOKHTAR, D.M., ZACCONE, G., ALESCI, A., KUCIEL, M., HUSSEIN, M.T., SAYED, R.K.A. Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. **Fishes**, v.8, p.93, 2023.

MORALES, A., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M.C., ABELLÁN, E., CARDENETE, M. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.139, p.153-161, 2004.

NAVARRO, I., GUTIERREZ, J. Fasting and starvation. In: **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier, 1995. p.393-434.

NEBO, C., GIMBO, R.Y., KOJIMA, J.T., OVERTURF, K., DAL-PAI-SILVA, M., PORTELLA, M.C. Depletion of stored nutrients during fasting in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Journal of Applied Aquaculture**, v.30, p.157-173, 2018.

NIKKI, J., PIRHONEN, J., JOBLING, M, KARJALAINEN, J. Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. **Aquaculture**, v.235, p.285-296, 2004.

- NONAKA, M. Evolution of the complement system. **Current Opinion in Immunology**, v.13, p.69-73, 2001.
- OLIVEIRA, M.C., SCHOFFEN, J.P.F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.1333-1342, 2010.
- POLAKOF, S., PANSERAT, S., SOENGAS, J.L., MOON, T.W. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, n. 8, p. 1015-1045, 2012.
- RAUTA, P., NAYAK, B., DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology Letters**, v.148, p.23-33, 2012.
- ROBERTS, C.K., SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v.84, p.705-712, 2009.
- ROBISALMI, A., ALIPIN, K., GUNADI, B. Effect of periodic feed retrictions and refeeding on compensatory growth and blood physiology of of red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Jurnal Iktiologi Indonesia**, v.21, p.23-38, 2021.
- ROSSI, A., CAZENAVE, J., BACCHETTA, C., CAMPANA, M., PARMA, M.J. Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, *Callichthyidae*) during starvation. **Ecological indicators**, v.56, p.161-170, 2015.
- 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.447-452, 1998.
- SAKYI, M.E., JIA CAI, J., TANG, J., ABARIKE, E.D., XIA, L., LI, P., KUEBUTORNYE, F.K.A., ZOU, Z., LIANG, Z., JIAN, J. Effects of starvation and subsequent re-feeding on intestinal microbiota, and metabolic responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Reports**, v.17, p.100370, 2020.
- SALGADO-ISMODES, A., TAIPALE, S., PIRHONEN, J. Effects of progressive decrease of feeding frequency and re-feeding on production parameters, stomach capacity and muscle nutritional value in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.519, p.734919, 2020.
- SANTOS, R.F., SILVA, S.E.M., BRANDÃO, M.F., LÔBO, M.V.M.S., PAZ, D.J.F., GIMBO, R.Y. Acute response of refeeding in tambaqui submitted to long-term fasting. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 22: e2122232021, 2021.

- SAURABH, S., SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v.39, p.223-239, 2008.
- SCHWARZ, K.B. Oxidative stress during viral infection: a review. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, p.641-649, 1996.
- SECOMBES C.J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 63-103.
- SECOR, S. M., CAREY, H.V. Integrative physiology of fasting. **Comparative Physiology**, v.6, p.773–825, 2016.
- 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, p.19-28, 2003.
- SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.15, p.371-379, 2000.
- STAMLER, J.S., SLIVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutrition Reviews**, v.54, p.1-30, 1996.
- STAPLES, J.F. Metabolic flexibility: hibernation, torpor, and estivation. **Comparative Physiology**, v.6, p.737-71, 2016.
- TACON, A.G.J., METIAN, M., MCNEVIN, A.A. Future Feeds: Suggested guidelines for sustainable development. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v.30, p.135-142, 2022.
- 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.
- TAKAHASHI, L.S., BILLER-TAKAHASHI, J.D., URBINATI, E.C. Physiological response to *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) infection by pacu *Piaractus mesopotamicus* subjected to short cycles of food restriction and refeeding. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.45, p.567-576, 2014.
- TEROVA, G., RIMOLDI, S., CHINI, V., GORNATI, R., BERNARDINI, G., SAROGLIA, M. Cloning and expression analysis of insulin-like growth factor I and II in liver and

muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during long-term fasting and refeeding. **Journal of Fish Biology**, v.70, p.219-233, 2007.

TUNÇELLI, G., PIRHONEN, J. Effects of weekend starvation and the duration of daily feeding on production parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.543, p.737028, 2021.

TURANO, M.J., BORSKI, R.J., DANIELS, H.V. Effects of cyclic feeding on compensatory growth of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) foodfish and water quality in production ponds. **Aquaculture Research**, v.39, p.1514-1523, 2008.

URBINATI, E.C., BILLER-TAKAHASHI, J.D., ZANUZZO, F.S. Stress and immune system in fish. In: BALDISSEROTTO, B; URBINATI E.C; CYRINO J.E.P. (Eds.). **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. Elsevier, Academic Press, 2020. p.93-114.

URBINATI, E.C., TAKAHASHI, L.S. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. In: BALDISSEROTTO, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ª edição revisada e ampliada. Editora UFSM, Santa Maria, 2023.

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.

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

VAN DIJK, P., STAAKS, G., HARDEWIG, I. The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach, *Rutilus rutilus*. **Oecologia**, v.13, p.496-504, 2002.

VASYLKIV, O.Y., KUBRAK, O.I., STOREY, K.B., LUSHCHA, V.I. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.101, p.1-5, 2011.

WANG, J., DU, J-J., JIANG, B., HE, R-Z., LI, A.X. Effects of short-term fasting on the resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus agalactiae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v.94, p.889-895, 2019.

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

- WILHELM FILHO, D., TORRES, M.A., TRIBESS, T.B., PEDROSA, R.C., SOARES, C.H.L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish *acará* (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.719-726, 2001.
- WON, E.T., BORSKI, R.J. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v.4, p.74, 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.
- WU, L., XIE, S., ZHU, X., CUI, Y., WOOTTON, R.J. Feeding dynamics in fish experiencing cycles of feed deprivation: a comparison of four species. **Aquaculture Research**, v.33, p.481-489, 2002.
- XIAO, J., ZHOU, F., YIN, N., ZHOU, J., GAO, S., LI, H., SHAO, Q., 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.
- XU, H., BI, Q., MENG, X., DUAN, M., WEI, Y., LIANG, M. Response of lipid and fatty acid composition of turbot to starvation under different dietary lipid levels in the previous feeding period. **Food Research International**, v.151, p.110905, 2022.
- YENGGOKPAM, S., PAL, A.K., SAHU, N.P., JAIN, K.K., DALVI, R., MISRA, S., DEBNATH, D. Metabolic modulation in *Labeo rohita* fingerlings during starvation: Hsp70 expression and oxygen consumption. **Aquaculture**, v.285, p.234-237, 2008.
- ZAPRYANOVA, D., URKU, C. SIMEONOV, R., ATANASOFF, A., NIKOLOV, G., SANDEVA, G. The effect of dietary addition of a synbiotic after long-term starvation on certain biochemical parameters and liver structure in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Archiva Zootechnica**, v.24, p.37-46, 2021.

ZHANG, W., BELTON, B., EDWARDS, P., HENRIKSSON, P.J.G., LITTLE, D.C., NEWTON, R., TROELL, M. Aquaculture will continue to depend more on land than sea. **Nature**, v.603, n.7900, p E2-E4, 2022.

ZHENG, J., ZHU, Q-L., SHEN, B., ZENG, B., ZHU, A-Y., WU, C-W. Effects of starvation on lipid accumulation and antioxidant response the right and left lobes of liver in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. **Ecological Indicators**, v.66, p.269-274, 2016.

CAPÍTULO 2

Efeitos da restrição alimentar e realimentação no crescimento, metabolismo, imunidade e no sistema antioxidante/estresse oxidativo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

RESUMO

Investigamos o efeito da restrição e da realimentação em pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em seis grupos de peixes que foram : 1) alimentados diariamente por 30 dias (3% p.v.); 2) alimentados diariamente por 30 dias (saciedade aparente); 3) passaram por restrição alimentar por 3 dias e realimentação por 2 dias, por 30 dias (3% p.v.); 4) passaram por restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias, por 30 dias (saciedade aparente); 5) passaram por restrição por 21 dias e realimentação por 9 dias (3% p.v.) e 6) passaram por restrição por 21 dias e realimentação por 9 dias (saciedade aparente). Ao final de 21 e 30 dias, os peixes foram amostrados para retirada de material biológico e, aos 30 dias, desafiados com inoculação de lipopolissacarídeo (LPS). Foi avaliada a dinâmica metabólica e o desempenho dos sistemas imune e antioxidante, por meio dos indicadores: níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicerídeos, níveis de lipídeo no fígado e músculo, glicogênio no fígado e quantidade de gordura visceral e hepática; atividade respiratória de leucócitos, atividade hemolítica do sistema complemento, atividade sérica da lisozima; proteína total hepática, atividade das enzimas glutathione S-transferase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, concentração da glutathione reduzida e malondialdeído. Além disso, os peixes foram pesados para observar o crescimento. Os resultados desse estudo mostraram que a restrição alimentar modulou as reservas energéticas durante os 21 dias de restrição alimentar, e após 9 dias de realimentação promoveu o crescimento compensatório e a recuperação das reservas energéticas. O sistema imune (atividade respiratória dos leucócitos e lisozima) não foi afetado pela restrição alimentar, mas a realimentação ativou a ARL e reduziu a concentração sérica de lisozima. Em peixes privados de alimento, o sistema antioxidante demonstrou prejuízos na capacidade de resposta. Embora houvesse ativação de enzimas antioxidantes, a alta mobilização de energia durante o jejum provocou estresse oxidativo.

Palavras-chave: Peixe, Restrição Alimentar, Metabolismo, Sistema Imune

ABSTRACT

We investigated the effect of restriction and re-feeding in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in six groups of fish that were: 1) fed daily for 30 days (3% p.v.); 2) fed daily for 30 days (apparent satiation); 3) were restricted for 3 days and re-feeding for 2 days, for 30 days (3% p. v.); 4) were restricted for 3 days and refeeding for 2 days, for 30 days (apparent satiety); 5) were restricted for 21 days and refeeding for 9 days (3% p.v.) and 6) were restricted for 21 days and refeeding for 9 days (apparent satiety). At the end of 21 and 30 days, after the different feeding management periods, the fish were sampled for biological material and, at 30 days, challenged with LPS inoculation to evaluate the metabolic dynamics and the performance of the immune and antioxidant systems. The indicators tested were: plasma glucose, cholesterol and triglyceride levels, liver and muscle lipid levels, liver glycogen and amount of visceral fat; leukocyte respiratory activity, hemolytic activity of the complement system, serum lysozyme activity, total liver protein, activity of the enzymes glutathione S-transferase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, concentration of reduced glutathione and malondialdehyde. In addition, the fish were weighed and measured to observe zootechnical performance. The results of this study showed that dietary restriction modulated energy reserves during the 21 days of dietary restriction, and after 9 days of refeeding promoted compensatory growth and recovery of energy reserves. The immune system (ARL and lysozyme) was not affected by dietary restriction, but refeeding activated ARL and reduced serum lysozyme concentration. In food deprived fish, the antioxidant system showed impaired responsiveness. Although there was activation of antioxidant enzymes, the high energy mobilization during fasting caused oxidative stress.

Keywords: Fish, Food Restriction, Metabolism, Immune System

1. Introdução

A aquicultura é uma das atividades mais antigas da história da humanidade (Isabella, 2020). A FAO (2021) afirma a urgência da necessidade de transformar os sistemas agroalimentares para garantir segurança alimentar, melhorar a nutrição e garantir dietas saudáveis para a população, sem agredir os recursos naturais. Para atender a demanda global, a aquicultura deverá intensificar e otimizar as práticas de criação (David et al., 2021; Gentry et al., 2017; David et al., 2018), além de preocupar-se com os impactos ambientais causados pelas águas residuais e os resíduos sólidos (Xu et al., 2022; Rakib et al., 2022), os quais levam à proliferação de algas (Trottet et al., 2022), eutrofização (Chaves et al., 2021), hipóxia (Kucuksezgin et al., 2021) e acidificação da água (Ahmed et al., 2019), além do aumento das concentrações de patógenos devido ao acúmulo de material orgânico na água (Wanja et al., 2020; El-Gohary et al., 2020).

Dessa forma, é importante desenvolver manejos alimentares que diminuam os impactos ambientais, além de reduzir custos na produção (Turano et al., 2008; Argüello-Guevara et al., 2018; Bjørnevik et al., 2021), como a utilização de protocolos alimentares que realizam ciclos de restrição e realimentação (Oh et al., 2013; Urbinati et al., 2014; Py et al., 2022). Este manejo alimentar tem melhorado o desempenho do crescimento dos peixes e a eficiência da produção devido ao crescimento compensatório que ocorre após alimentação (Ali et al., 2003; Salgado-Ismodes et al., 2020). O mecanismo de resposta no crescimento compensatório após a restrição de alimento é explicado, em parte, pelo aumento do consumo da ração (hiperfagia) (Hayward et al., 1997; Wang et al., 2000; Gaylord e Gatlin, 2001; Gurney et al., 2003; Känkänen e Pirhonen, 2009; Jobling, 2010; Álvarez Fernández et al., 2011; Xiao et al., 2013), redução no custo metabólico (O'Connor et al., 2000), ou aumento da eficiência da conversão alimentar (Jobling, 2010; Skalski et al., 2005; Xiao et al., 2013).

A privação de alimentos é comum em peixes de ambientes naturais (Cipriano et al., 2015; Metcalfe et al., 1999) e artificiais (Souza et al., 2003; Oh et al., 2013; Urbinati et al., 2014), sem afetar sua sobrevivência. Quando não há nutrientes disponíveis para manter a atividade metabólica e os processos fisiológicos vitais a uma taxa constante, o organismo mobiliza os nutrientes armazenados e durante a realimentação ocorre um processo compensatório de utilização e reposição destas reservas (Navarro e Gutiérrez, 1995; Souza et al., 2000; Fávero et al., 2018; Fávero et al., 2020). As

principais reservas utilizadas são o glicogênio, seguido pelas reservas lipídicas no fígado, músculo e vísceras, e as proteínas, as últimas reservas a serem consumidas (Secor e Carey, 2016, Li et al., 2018; Su et al., 2022).

A restrição alimentar mobiliza energia para a manutenção dos sistemas biológicos deixando os organismos suscetíveis a desafios do meio aquático (Gimbo et al., 2015; Liao et al., 2021), já que o sistema imune inato dos peixes tem alto custo energético (Gimbo et al., 2015; Bird, 2019; Almajwa et al., 2019; Ganeshan et al., 2019; Hosomi e Kunisawa, 2020). Além disso, devido mobilização e as alterações na produção de energia durante a restrição alimentar pode alterar os mecanismos de oxirredução durante a respiração celular para geração de ATP (Jacob, 1995). A produção de radicais livres nos mecanismos de oxirredução ocorre naturalmente durante o metabolismo aeróbico das células (Frisard e Ravussin, 2006), os quais são neutralizados por um sistema antioxidantes de defesa, que limita os níveis intracelulares dos radicais livres e controla possíveis danos resultantes da oxidação de biomoléculas e danos em células e tecidos (Jacob e Burri, 1996). O sistema antioxidante consiste em uma série de enzimas e compostos antioxidantes endógenos e dietéticos que inativam as espécies reativas ao oxigênio (EROs) (Roberts e Sindhu, 2019). A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses.

Considerando o exposto, nosso objetivo foi avaliar se durante os mecanismos de mobilização energética durante o jejum e mecanismos compensatórios que ocorrem durante a realimentação (com quantidade controlada ou à saciedade aparente) afetam o mecanismo de defesa imunológica inata e/ou o de produção celular de energia e consequentemente o sistema antioxidante de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O pacu foi escolhido por sua importância comercial na América do Sul (Valladão et al., 2018), tendo sido modelo biológico em estudos prévios sobre a aplicação de ciclos de restrição alimentar e realimentação (Souza et al., 2000; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2011, Takahashi et al., 2014; Favero et al., 2018; Favero et al., 2020) e mostrado grande tolerância a esse tipo de estratégia alimentar.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e protocolo experimental

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 6600/22), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal. O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, campus Jaboticabal.

Foram utilizados 240 juvenis de pacu ($45,67 \pm 12,94\text{g}$ e $12,57 \pm 1,62\text{cm}$), fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 unidades experimentais (caixas de 100 litros), com 10 peixes por unidade, com renovação constante de água e aeração suplementar, e aclimatados por duas semanas, sendo alimentados até saciedade aparente, duas vezes por dia com ração comercial extrusada Nutripiscis® SI 6/8mm (28% PB e 3.600 kcal EB/kg). O fotoperíodo foi de 12 horas luz:12 horas escuro. Após sete dias de aclimação, os peixes foram pesados e medidos (biometria inicial), e distribuídos em seis grupos correspondentes às estratégias alimentares (alimentação diária, alimentação em ciclos de restrição, e realimentação e restrição alimentar seguida de realimentação) e tratamentos (alimentação com 3% do peso vivo e até a saciedade aparente). Cada grupo tinha quatro réplicas, com 10 peixes por réplica (40 peixes/grupo). Os grupos são os que seguem:

- G1: Peixes alimentados diariamente com ração comercial (ad) por 30 dias com 3% do peso vivo.
- G2: Peixes alimentados diariamente com ração comercial (ad) por 30 dias até a saciedade aparente.
- G3: Peixes em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (3r2ra) com ração comercial por 30 dias com 3% do peso vivo.
- G4: Peixes em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (3r2ra) com ração comercial por 30 dias até a saciedade aparente.
- G5: Peixes em restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (r) com ração comercial com 3% do peso vivo.

- G6: Peixes em restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (r) com ração comercial até a saciedade aparente.

Após a biometria inicial, foi calculado 3% do peso vivo da caixa, para oferta nos respectivos grupos (G1, G3 e G5). Esse valor foi reajustado aos 21 dias, após a primeira amostragem. Os peixes dos G2, G4 e G6 foram alimentados até a saciedade e a quantidade de ração consumida por dia foi anotada.

Durante o período experimental, a temperatura da água das caixas foi $27,81 \pm 3,78$ °C e a concentração de oxigênio dissolvido foi $4,22 \pm 0,41$ mg/L.

O experimento foi dividido em dois ensaios: o ensaio 1 refere-se aos 30 dias de aplicação das estratégias/tratamentos descritos acima, enquanto o ensaio 2 foi realizado ao término dos 30 dias, quando os peixes foram submetidos a um desafio imunológico por inoculação com LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*).

2.2. Amostragens

Os grupos G1 e G2 serviram como grupos controle para as outras duas estratégias alimentares e respectivos tratamentos. Aos 21 dias, foram amostrados dois peixes por caixa de todas as estratégias/tratamentos (48 peixes). O mesmo ocorreu aos 30 dias de experimento (48 peixes) de acordo com a programação descrita na Figura 1 (Ensaio 1).

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21													
G1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C O L E T A	22	23	24	25	26	27	28	29	30	C O L E T A		
G2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
G3	+	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	+		+		+	
G4	+	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+		+	+		+	
G5
G6

Tabela 1. Delineamento das estratégias para alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que incluíram ciclos de restrição e realimentação.

Após 21 e 30 dias, dois peixes de cada réplica, de todos os tratamentos, foram anestesiados com benzocaína (0,5 g/10 mL de álcool/15L de água) e foram coletadas amostras de sangue, por punção dos vasos caudais. Após anestesia, os peixes foram pesados e medidos para cálculo de desempenho zootécnico e então retirado o sangue para separação de plasma e soro para determinação dos indicadores metabólicos (glicose e triglicérides plasmáticos e colesterol sérico) e indicadores imunológicos (atividade respiratória de leucócitos, atividade sérica da lisozima e sistema complemento). Após coleta do sangue, os peixes foram eutanasiados com sobredose do anestésico (1g/15L) para retirada da gordura visceral e fígado para determinação

dos indicadores metabólicos (índice hepatossomático, lipídio e glicogênio hepáticos) e do sistema de defesa antioxidante (atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutathione S-transferase (GST); concentração da glutathione reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO).

Após a segunda amostragem, os peixes restantes foram inoculados intraperitonealmente com LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* O26:B6 – Lote 3755) em solução salina (0,6%) em concentração previamente estabelecida em nosso laboratório (1,5 mg kg⁻¹) (Mello et al., 2019), e novamente amostrada 3h, 6h e 24h após a inoculação (Ensaio 2).

2.3. Análises

2.3.1. Indicadores do desempenho zootécnico

O peso dos animais obtido inicialmente e a cada coleta foram usados para calcular o ganho de peso (GP) (gramas) obtido ao longo do experimento ($GP = \text{peso final} - \text{peso inicial}$), a taxa de crescimento específico (TCE) (%) = $100[(\ln \text{peso final médio} - \ln \text{peso inicial médio})/\text{tempo}]$ e a conversão alimentar (CA) = $\text{consumo total de ração} \div \text{ganho de peso}$ no período analisado.

2.3.2. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais

2.3.2.1. Concentração de glicose no plasma

O sangue, mantido em gelo, foi colocado em microtubos contendo ou não anticoagulante para a obtenção de soro e plasma. A uma alíquota de sangue foi adicionado EDTA fluoretado (Glistab – Labtest Ref.: 29/29E) para separação de plasma e quantificação da concentração de glicose com kit comercial (Labtest Ref. 133), por método enzimático que consiste na catálise da oxidação da glicose pela glicose oxidase, a qual gera uma molécula de peróxido de hidrogênio, numa resposta de coloração avermelhada. A leitura foi determinada em leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN), em 492 nm. A concentração foi expressa em mg/dL.

2.3.2.2. Concentração de triglicerídeos no plasma

Outra alíquota do plasma foi utilizada para análise da concentração de triglicerídeos por método enzimático (Kits Labtest®, Ref. 76), no qual a lipoproteína

lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, aminoantipirina e clorofenol, catalisada pela peroxidase. A intensidade da cor vermelha produzida na reação é proporcional à quantidade de triglicerídeos na amostra. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN), em 492 nm. A concentração foi expressa em mg/dL.

2.3.2.3. Concentração de colesterol no soro

O soro foi obtido por centrifugação do sangue a 2885 rpm por 10 min, a 4°C, e armazenado em microtubos. A concentração de colesterol foi determinada por método enzimático (Kits Labtest®, Ref. 87), no qual os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado e na presença de peroxidase o peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol contido na amostra. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN), em 492 nm. A concentração foi expressa em mg/dL.

2.3.2.4. Concentração de glicogênio hepático

A determinação da concentração do glicogênio hepático foi realizada seguindo a metodologia de Perry et al. (1988). As amostras de tecido armazenadas a -80 °C foram descongeladas, homogeneizadas e desproteinizadas em ácido perclórico gelado, à 6%, e, à solução, foi adicionado carbonato de potássio (3M) para neutralização. Após centrifugação, a 2885 rpm, por 15 min, à 10°C, o sobrenadante foi hidrolisado com amiloglicosidase e incubado em temperatura ambiente, por uma hora. Em seguida, adicionou-se ácido perclórico 6%, seguido de neutralização com carbonato de potássio (2,25 M). Após centrifugação a 2885 rpm por 10 min, a 10°C, a leitura foi determinada pelo reagente de cor do kit de glicose, em espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 em 505nm. As concentrações de glicogênio presentes no fígado foram calculadas a partir da curva padrão de glicogênio (extraído de fígado bovino, Ref. G-0885, Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e expressas em porcentagem.

2.3.2.5. Concentração de lipídio hepático e muscular

Amostras de fígado e de músculo branco foram utilizadas para a determinação das concentrações de lipídios total hepático e muscular de acordo com a metodologia de Frings et al. (1972). Nesta análise, os tecidos foram homogeneizados, com uma solução de clorofórmio-metanol-água (2: 1: 0,5). O homogenato foi centrifugado a 180 rpm por 5 min, e três fases foram identificadas pela técnica da dupla pipeta. As amostras de lipídios foram retiradas e armazenadas em outro tubo, repetindo o processo por três vezes, acrescentando 1 mL de clorofórmio a cada repetição. Os tubos foram mantidos em estufa a 60°C, para secagem do solvente. O resíduo de lipídico seco, extraído dos tecidos de fígado e músculo, foi ressuscitado com 1 mL de clorofórmio, retirando 100 µL dessa mistura e, então, solubilizadas com 200 µL de ácido sulfúrico concentrado, a 100°C, por 10 min. Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL do reagente de fosfovanilina (vanilina 0,6%, ácido sulfúrico concentrado e água destilada, na proporção de 7:12/1 (v/v/v) e os tubos foram mantidos em banho a 37°C, por 15 min. As absorbâncias foram lidas em leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN), em 550 nm. A concentração de lipídios totais nos tecidos foi calculada a partir da curva padrão de ésteres metílicos de óleo de fígado de bacalhau (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e expressa em mg/g.

2.3.2.6. Índices morfométricos

A gordura visceral e o fígado foram pesados para o cálculo do índice gorduro-viscero-somático [IGVS (%) = (peso da gordura visceral / peso corporal) x 100] e índice hepato-somático [IHS (%) = (peso do tecido hepático/ peso corporal) x 100].

2.3.3. Indicadores imunológicos

2.3.3.1. Atividade respiratória de leucócitos

O sangue total contendo heparina foi utilizado para a análise da atividade respiratória de leucócitos (ARL) seguindo protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller-Takahashi et al. (2013) para pacu e consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo em ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito,

denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). O método foi determinado em leitora de placas (ThermoPlate Reader MN), em 550 nm e a atividade apresentada em absorbância (DO).

2.3.3.2. Concentração sérica de lisozima

A concentração de lisozima foi determinada segundo protocolo de Demers e Bayne (1997), modificado por Zanuzzo et al. (2015), e se baseia na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*. A redução da densidade óptica da solução foi medida a 450 nm, a cada cinco minutos durante dez minutos (inicial, 5 e 10 min.), em uma leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN). O cálculo da concentração foi $y = 0,0634x + 0,0037$, sendo X as concentrações do padrão da curva e Y a leitura da amostra. A concentração é expressa em ng/ μ L.

2.3.4. Indicadores do sistema antioxidante hepático

2.3.4.1. Concentração de proteína total

A concentração de proteína tecidual da amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), que consiste na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Ref. 27815, St Louis, MO, USA) à proteína, empregando como padrão albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Ref. 4919-5G, St Louis, MO, USA). A leitura foi realizada em 595 nm, em espectrofotômetro (Biotek Epoch 2 Microplate Reader) e a concentração expressa em mg/mL.

2.3.4.2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com McCord e Fridovich (1969), a partir da inibição da taxa de redução do citocromo C (Sigma-Aldrich, Ref. C2037, St Louis, MO, USA) pelo radical superóxido via sistema xantina/xantina oxidase. A leitura foi realizada em 550 nm, em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader, e temperatura ambiente e a atividade da enzima expressa em U/mg proteína (uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que promove inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c).

2.3.4.3. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984), que consiste no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela catalase, gerando água e oxigênio. A absorbância da solução foi lida em 240nm, em espectrofotômetro (Biotek Epoch 2 Microplate Reader), durante 15 segundos por 5 minutos e expressa em $\mu\text{mol de } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

2.3.4.4. Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi determinada segundo Keen et al. (1976). Nesta análise, o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reduz a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona-2,4-nitrobenzeno. A leitura da GST foi feita, em 340 nm, em espectrofotômetro (Biotek Epoch 2 Microplate Reader) e a atividade da enzima expressa em nmol de CNDB/mg de proteína.

2.3.4.5. Concentração da glutathiona reduzida (GSH)

De acordo com Beutler et al. (1963), foi determinada a concentração de glutathiona reduzida (GSH), utilizando o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB 2,5 mM – Reagente de Ellman (Sigma-Aldrich, Ref. D21820-5G, St Louis, MO, USA). A reação da GSH com DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela. A leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader. A atividade da GST é expressa em nmol/mg de proteína.

2.3.4.6. Peroxidação lipídico (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizado de acordo com Camejo et al. (1998). As concentrações de TBARS foram expressas em nmol MDA mg/proteína.

2.4. Análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), e os dados analisados em dois momentos correspondendo a dois ensaios experimentais: o primeiro, realizado durante 30 dias, e o segundo, uma sequência do primeiro, realizado a partir dos dados obtidos ao final dos 30 dias, que se caracterizou como uma nova condição inicial. Os resultados do primeiro ensaio foram analisados

em um esquema fatorial 3x2x2 correspondendo a três estratégias alimentares (alimentação diária, restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias, e restrição por 21 dias e realimentação por 9 dias) x dois tratamentos (alimentados com 3% do peso vivo e alimentados até a saciedade) x dois tempos de coleta (21 dias e 30 dias). Os dados obtidos no segundo ensaio foram analisados em fatorial 3x2x4 correspondendo a três estratégias alimentares x dois tratamentos x quatro tempos de coleta (basal, 1, 6 e 24 h após exposição inoculação). Os dados foram submetidos a testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe). Quando necessário, os dados foram transformados para atender as premissas, e então submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparação das médias foi utilizado o teste Tukey, com significância de 5% pelo software SAS (versão 9.0). Os resultados são apresentados como média e erro padrão.

3. Resultados

3.1. Ensaio experimental 1 – Aplicação de estratégias alimentares de restrição alimentar e realimentação com oferta de alimento controlada e à saciedade aparente

3.1.1. Indicadores de desempenho zootécnico

3.1.1.1. Ganho de peso (Fig. 1 A)

Aos 21 dias, o ganho de peso (GP) diferiu entre as estratégias alimentares em ambos os tratamentos (3% do peso vivo e à saciedade), sendo maior em peixes alimentados diariamente (ad), seguido por peixes em restrição alimentar por 3 dias e realimentados por 2 dias (3r2ra) e nos peixes em restrição por 21 dias (r) ($p < 0,0001$). Entre os peixes ad, o maior GP foi observado naqueles alimentados com 3% p.v (G1). Já, aos 30 dias, o GP foi maior nos peixes ad que nos peixes 3r2ra, os quais não diferiram dos peixes realimentados por 9 dias (r) ($p = 0,0066$ e $p = 0,0026$, respectivamente). A realimentação fez com que o GP dos peixes G5 e G6 se igualasse ao GP observado nos peixes G3 e G4, especialmente nos peixes realimentados com 3% do peso vivo (G5) ($p < 0,0001$).

3.1.1.2. Taxa de crescimento específico (TCE) (Fig. 1 B)

A taxa de crescimento específico (TCE) mostrou perfil semelhante ao observado no GP. Aos 21 dias, a TCE foi maior em peixes ad, seguido pelos peixes 3r2ra e pelos peixes r ($p < 0,0001$). Aos 30 dias, a TCE foi maior em peixes ad alimentados com 3% do p.v. ($p = 0,0422$), ou alimentados à saciedade, que nos peixes 3r2ra e naqueles realimentados por 9 dias (r) ($p = 0,0043$). Após 30 dias, peixes realimentados até a saciedade (G6) apresentaram maior TCE do que aos 21 dias, enquanto os peixes G5 também mostraram aumento, mas não foi significativo ($p = 0,0353$).

3.1.1.3. Conversão alimentar (CA) (Fig. 1 C)

Aos 21 dias, a conversão alimentar (CA) diferiu entre os tratamentos (3% do peso vivo/G1 e até à saciedade/G2) nos peixes ad ($p < 0,0001$) e o perfil foi semelhante nos peixes 3r2ra. Aos 30 dias, a CA foi mais baixa em peixes 3r2ra (G3 e G4) e peixes em restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (r) (G5 e G6) ($p = 0,0075$).

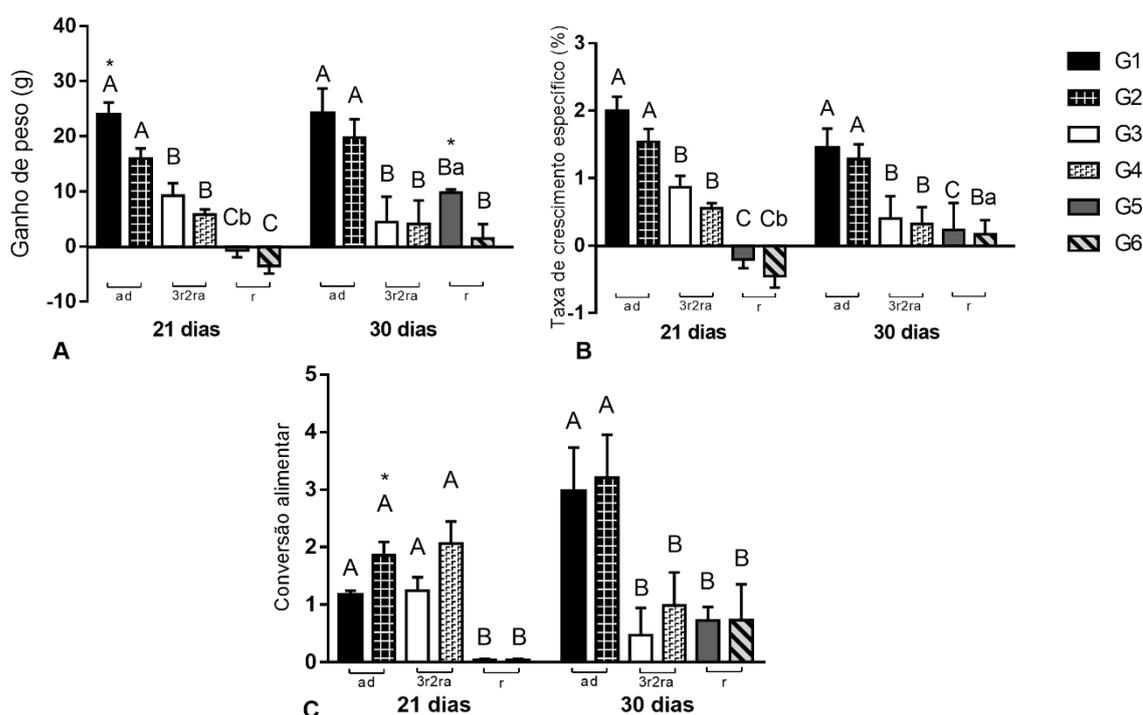


Figura 1. Ganho de peso (A), taxa de crescimento específico (B) e conversão alimentar (C) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre

os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.2. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais

3.1.2.1. Concentração plasmática de glicose (Fig. 2A)

Aos 21 dias, a concentração plasmática de glicose diferiu entre as estratégias alimentares nos peixes que receberam 3% p.v. ($p=0,04$), sendo maior em 3r2ra (G3) que em r (G5), e ambos não diferiram de peixes ad (G1). Nos tratamentos em que os peixes receberam alimento à saciedade aparente, a glicemia foi maior em 3r2ra (G4) do que em r (G6) ($p=0,0322$), e ambos não diferiram de peixes ad (G2). Comparando as amostragens, a concentração plasmática de glicose diminuiu nos peixes ad, G1 ($p=0,0036$) e G2 ($p=0,0049$), aos 30 dias, em relação a 21 dias.

3.1.2.2. Concentração plasmática de triglicerídeos (Fig 2B)

Aos 21 dias, a concentração plasmática de triglicerídeos foi maior nos peixes ad (G1) e 3r2ra (G3) do que nos peixes r (G5) ($p<0,0362$) e maior nos peixes ad (G2) e 3r2ra (G4), em relação aos r (G6) ($p=0,0080$). Comparando as amostragens, aos 30 dias, houve um aumento da concentração de triglicerídeos nos peixes G3 ($p=0,0062$), G4 ($p=0,0347$), G5 ($p<0,0001$) e G6 ($p<0,0001$) em relação a 21 dias.

3.1.2.3. Concentração sérica de colesterol (Fig. 2C)

Aos 21 dias, a concentração sérica de colesterol foi maior nos peixes em restrição alimentar (r) (G5 e G6), tanto em relação aos peixes alimentados com 3% p.v. (G1 e G3) ($p<0,0001$), quanto nos peixes alimentados à saciedade (G2 e G4) ($p<0,0001$). Aos 30 dias, a concentração de colesterol diminuiu nos peixes realimentados (r) (G5 e G6), em relação aos 21 dias ($p=0,0009$ e $p=0,0001$) e aumentou nos peixes G2 ($p=0,0157$). Nestes peixes, que eram alimentados diariamente à saciedade, a concentração de colesterol foi maior que nos que também eram alimentados diariamente, mas com alimento controlado (3% p.v.) ($p=0,0015$). Nos peixes alimentados com 3% p.v., a concentração de colesterol foi maior em 3r2ra (G3) do que nos ad (G1) sem diferença em relação aos peixes r (G5) ($p=0,0040$).

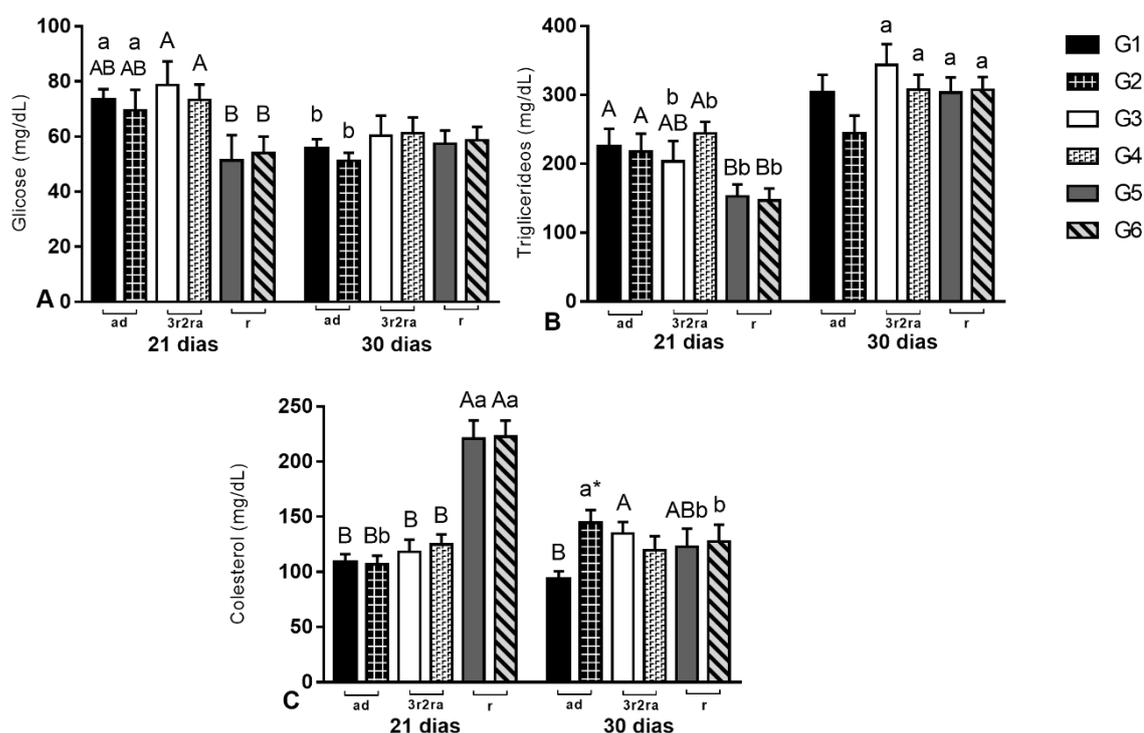


Figura 2. Concentração plasmática de glicose (A), concentrações plasmática de triglicerídeos (B) e concentração sérica de colesterol (C) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.2.4. Concentração de glicogênio no fígado (Fig. 3)

Aos 21 dias, a concentração de glicogênio foi menor nos peixes r (G6) em relação aos ad até a saciedade aparente (G2) ($p=0,705$), mas não em relação aos peixes 3r2ra (G4). Na amostragem seguinte, aos 30 dias, a concentração de glicogênio foi mais baixa nos peixes r (G6) comparado aos peixes 3r2ra (G4), mas não dos peixes ad à saciedade (G2) ($p=0,02$).

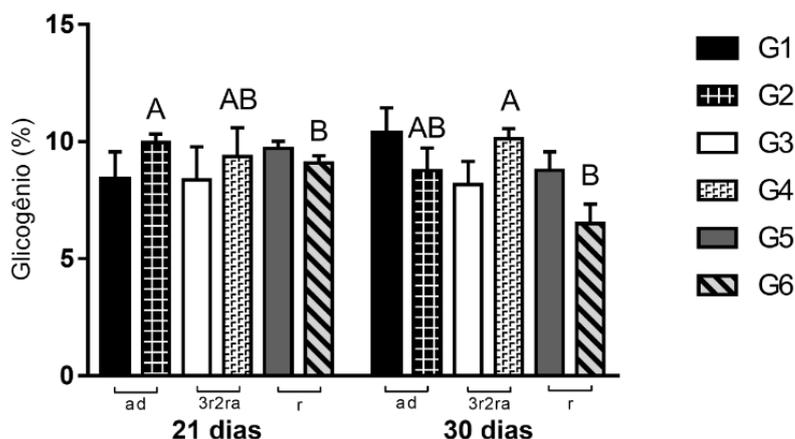


Figura 3. Concentração de glicogênio hepático em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.2.5. Concentração de lipídio hepático e muscular (Fig. 4 A e B)

Aos 21 dias, a concentração de lipídio hepático diferiu entre as estratégias alimentares. Peixes alimentados diariamente (ad) e em ciclos alternados (3r2ra) apresentaram maiores concentrações de lipídeos que os sob restrição alimentar (r) ($p=0,0008$). Os peixes 3r2ra que receberam 3% p.v. (G3) apresentaram as maiores concentrações de lipídeos, seguido por peixes ad (G1) e r (G5) ($p=0,0002$), enquanto os peixes alimentados até a saciedade ad (G2) e 3r2ra (G4) apresentaram maiores concentrações do que em r (G6) ($p=0,0003$).

Após a realimentação, a maior concentração de lipídio hepático foi observada nos peixes r (G5) que receberam 3% p.v. e a menor em 3r2ra (G3) ($p=0,0381$), ad (G1) não apresentou diferença estatística entre ambos. Nos peixes alimentados até a saciedade, as maiores concentrações ocorreram em 3r2ra (G4) comparadas com ad (G2) e r (G6), que não diferiram entre si ($p=0,0176$). Dentro das estratégias alimentares, em 3r2ra (G3 e G4) se diferenciaram, sendo as maiores concentrações em peixes alimentados até a saciedade ($p=0,0028$) e, em r (G5 e G6), as maiores

concentrações foram em peixes que receberam 3% p.v. (G5) comparados aos que receberam alimento à saciedade (G6) ($p=0,0331$).

Comparando as amostragens, as concentrações de lipídio hepático foram maiores após a realimentação, aos 30 dias, em peixes ad (G1) ($p=0,0305$), 3r2ra (G4) ($p<0,0001$), r (G5) ($p<0,0001$) e G6 ($p<0,0001$).

Em relação ao lipídeo muscular, aos 21 dias, as concentrações diferiram entre as estratégias alimentares, sendo maiores em peixes 3r2ra que receberam 3% p.v. (G3) do que em r (G5), sem diferença com ad (G1) ($p=0,0003$), enquanto os peixes alimentados até a saciedade ad (G2) apresentaram concentrações maiores que r (G6) ($p=0,0463$), sem diferença com 3r2ra (G4).

Aos 30 dias, não houve diferença entre as estratégias alimentares ou tratamentos, mas as concentrações foram mais elevadas que as observadas aos 21 dias (G1, $p=0,0034$; G2, $p=0,0003$; G4, $p=0,0029$); G5, $p=0,0004$ e G6, $p=0,0013$).

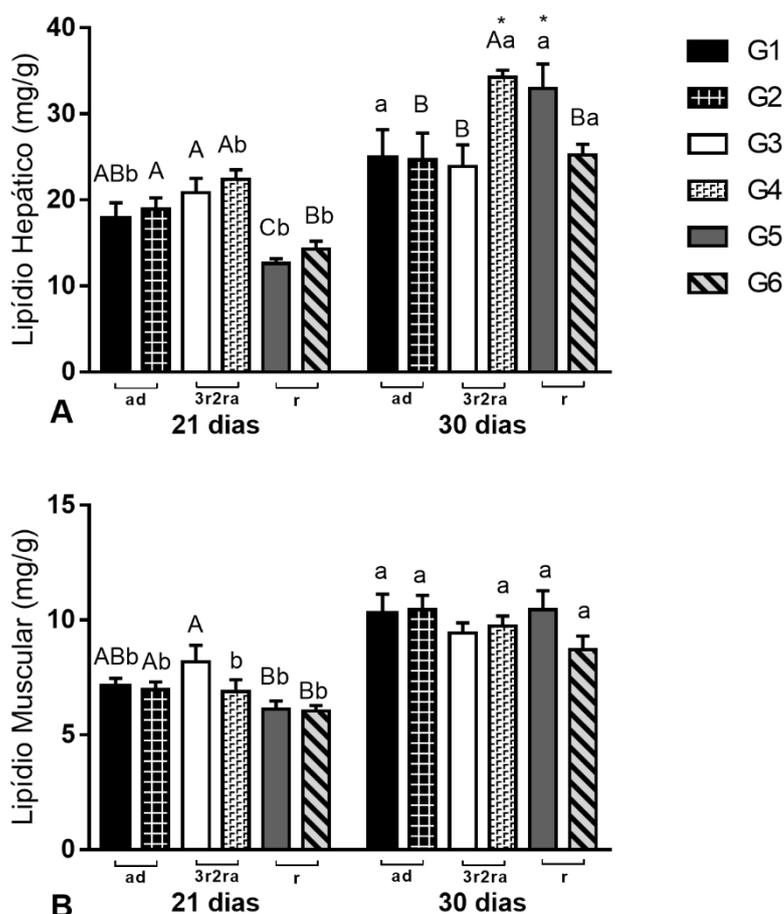


Figura 4. Concentração de lipídio hepático (A) e muscular (B) em pacus submetidos a

alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.2.6. Índices morfométricos (Índice hepatossomático/IHS e Índice de gordura víscero-somática /IGVS) (Fig. 5A e B)

Aos 21 dias, o IHS diminuiu nos peixes r (G5 e G6) em relação aos peixes de outros tratamentos e estratégias (G1, G2, G3, G4) ($p < 0,0001$). Aos 30 dias, o IHS nos peixes r (G5 e G6) aumentou em relação aos valores observados aos 21 dias ($p < 0,0001$). Nos peixes G6, o IHS foi maior do que nos peixes ad até a saciedade aparente (G2), mas não diferiu dos valores dos peixes 3r2ra à saciedade (G4) ($p = 0,0702$).

Aos 21 dias, o IGVS diminuiu nos peixes 3r2ra, com 3% p.v. (G4) e nos peixes r (G5 e G6), com mais intensidade nos peixes G6 ($p < 0,0001$). Aos 30 dias, o IGVS nos peixes ad com 3% p.v. (G1) foi maior que 3r2ra com 3% p.v. (G3) e com os r com o mesmo tratamento (G5) ($p = 0,0038$). O mesmo foi observado nos peixes alimentados até a saciedade aparente ($p = 0,0042$). Nos peixes realimentados por 9 dias, após 21 dias de restrição alimentar, o IGVS só aumentou nos peixes G6 (realimentados à saciedade) ($p = 0,0166$).

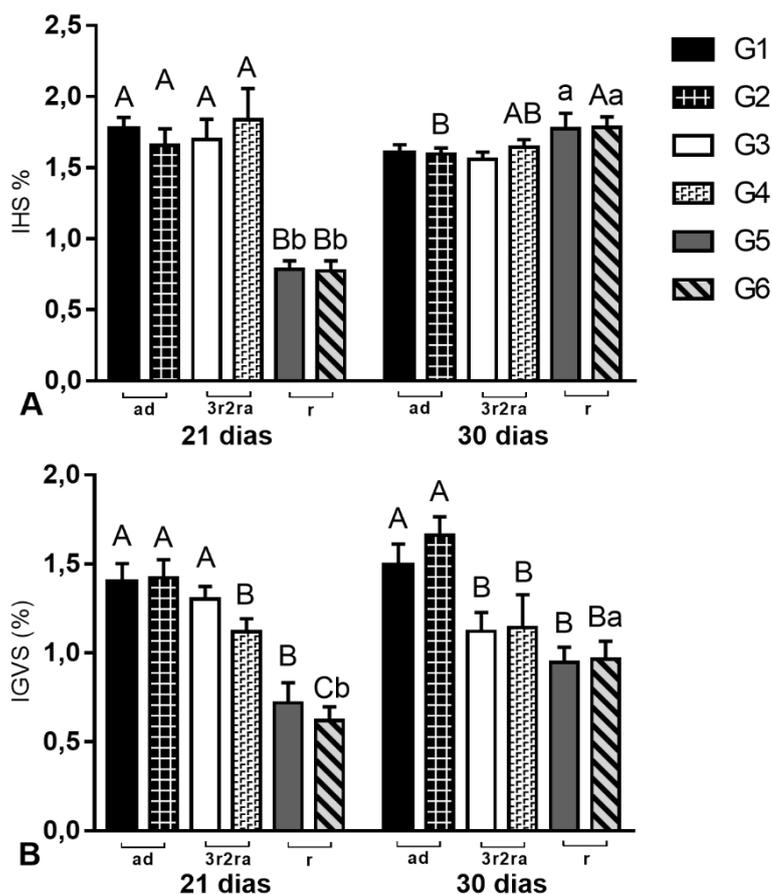


Figura 5. Índice hepatossomático (IHS) (A) e Índice gordura víscero-somática (IGVS) (B) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.3. Indicadores imunológicos

3.1.3.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Fig. 6A)

Aos 21 dias, não houve diferenças entre estratégias alimentares ou entre tratamentos. Aos 30 dias, a ARL foi mais elevada nos peixes 3r2ra (G3) em relação aos ad (G1) ($p=0,074$). Comparando as amostragens, a ARL aumentou nos peixes r (G5) ($p=0,0015$).

3.1.3.2. Concentração sérica de lisozima (Fig. 6B)

As concentrações séricas de lisozima não se alteraram entre estratégias ou tratamentos aos 21 dias, mas diferiram entre tempos de amostragem, com redução aos 30 dias nos peixes r (G5, $p=0,0040$; G6, $p=0,0031$) e nos peixes ad à sociedade (G2, $p=0,042$). Aos 30 dias, peixes alimentados até a saciedade, as duas estratégias alimentares (ad e 3r2a), (G2 e G4) apresentaram concentrações de lisozima semelhantes e mais elevadas que os peixes r à saciedade (G6, $p=0,0137$).

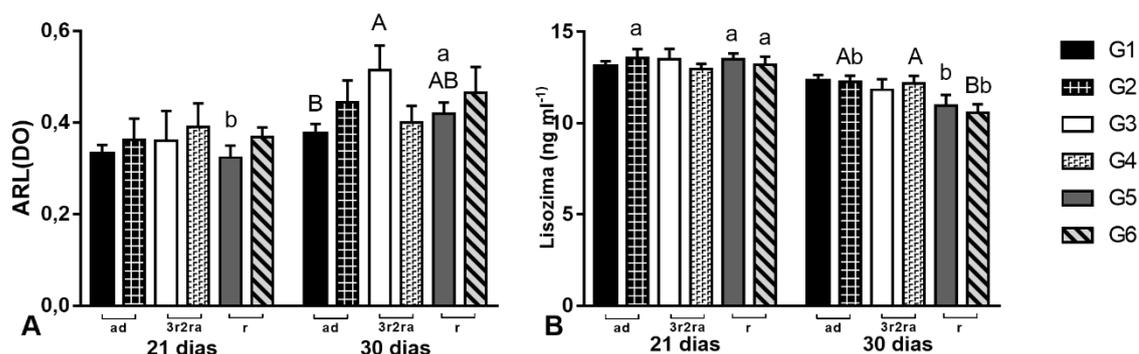


Figura 6. Atividade respiratória dos leucócitos (A) e lisozima (B) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.4. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

3.1.4.1. Superóxido dismutase (SOD) (Fig. 7)

Aos 30 dias, a atividade da superóxido dismutase diferiu entre as estratégias alimentares. Em peixes alimentados com 3% p.v./dia, ad (G1), a atividade da SOD foi maior do que nos r com a mesma taxa de alimentação (G5), enquanto os alimentados em dias alternados (G3) não diferiu dos outros dois grupos ($p=0,0569$).

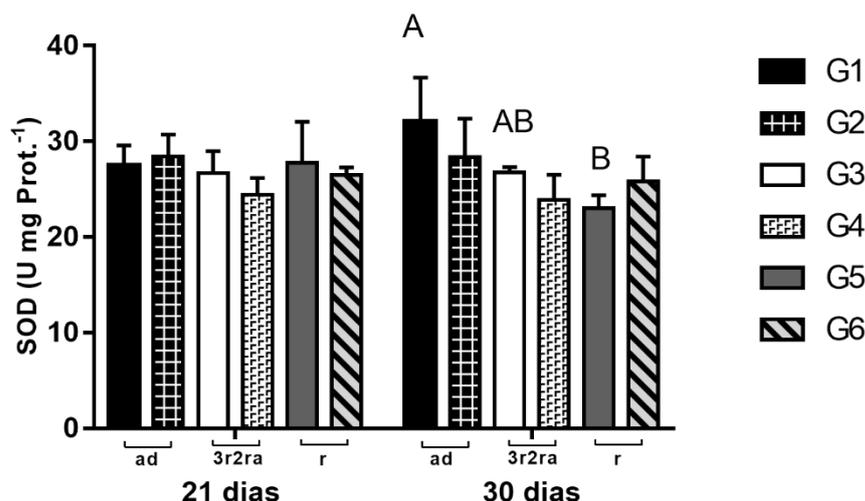


Figura 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.4.2. Catalase (CAT) (Fig. 8)

Aos 21 dias, a atividade da catalase diferiu entre as estratégias alimentares. Peixes alimentados com 3% p.v./dia 3r2ra (G3) apresentaram maiores atividades da enzima do que os ad (G1) e r (G5) ($p=0,0003$). Peixes alimentados até a saciedade aparente 3r2ra (G4) apresentaram maiores atividades que os r (G6), e ambos não diferiram de G2 ($p=0,0132$).

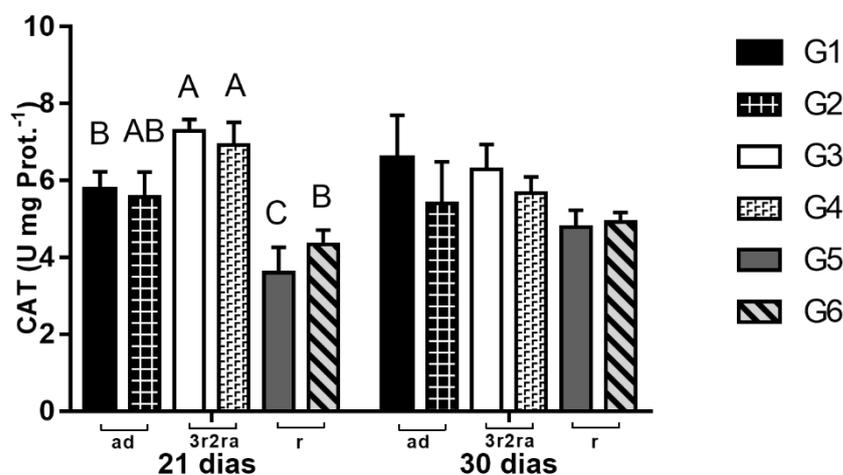


Figura 8. Atividade da catalase (CAT) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.4.3. Glutathione-S-transferase (GST) (Fig. 9)

Aos 21 dias, a atividade da GST diferiu entre as estratégias alimentares. Foi maior em peixes alimentados com 3% p.v./dia, ad e 3r2ra (G1 e G3) do que nos r (G5) ($p=0,0461$). Aos 30 dias, a atividade enzimática também diferiu entre as estratégias, sendo maior em peixes alimentados com 3% p.v./dia 3r2ra (G3) do que nos peixes ad (G1), enquanto os r (G5) não diferiu dos dois grupos ($p=0,0581$). Peixes alimentados até a saciedade aparente, 3r2ra (G4) apresentaram maior atividade do que os ad (G2) ($p=0,0107$) e os r (G6) ($p=0,0299$). Ao longo do tempo, a atividade da GST foi maior nos r à saciedade (G6) aos 21 dias do que aos 30 dias ($p=0,0194$).

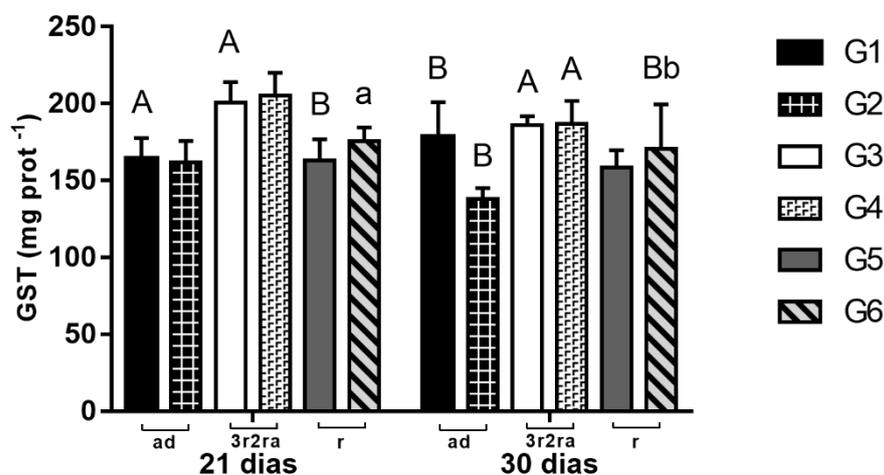


Figura 9. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.4.4. Glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 10)

Aos 21 dias, peixes alimentados com 3% p.v./dia diferiram apenas entre as estratégias alimentares 3r2ra e r, sendo maior nos alimentados em dias alternados (G3) do que nos realimentados (G5) ($p=0,0478$). Peixes alimentados até a saciedade aparente ad (G2) e 3r2ra (G4) apresentaram maior concentração da glutathiona reduzida que em r (G6) ($p=0,0037$). Aos 30 dias, peixes alimentados com 3% p.v./dia diferiram apenas entre as estratégias alimentares ad e r, sendo maior nos alimentados diariamente (G1) do que nos realimentados (G5) ($0,0008$). Ao longo do tempo, houve aumento na concentração da GSH em peixes realimentados, tanto para G5 ($p=0,0028$) e G6 ($p=0,0007$). A maior concentração foi observada em G2 aos 21 dias ($0,0205$).

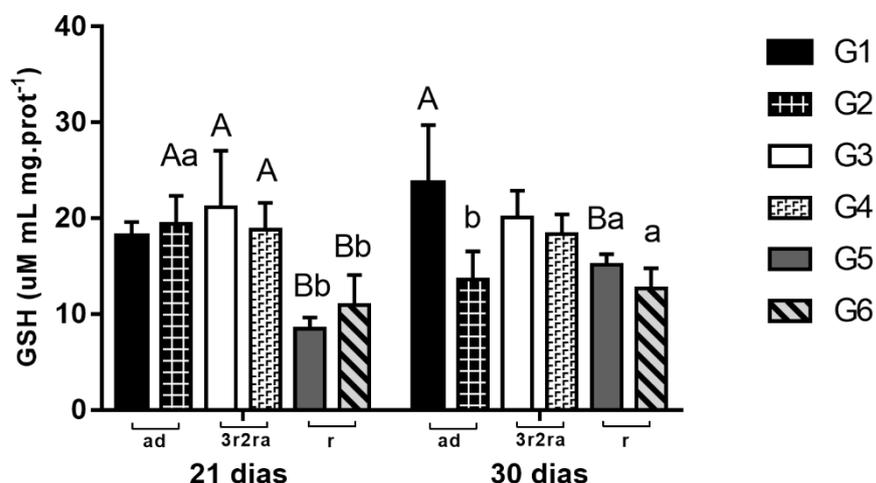


Figura 10. Atividade da glutatona reduzida (GSH) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.1.4.5. Peroxidação lipídica (LPO) (Fig. 11)

Aos 21 dias, a peroxidação lipídica no fígado diferiu entre as estratégias alimentares em peixes alimentados até a saciedade aparente, sendo maior em 3r2ra (G4) e r (G6) do que em ad (G2) ($p=0,006$). Aos 30 dias, peixes alimentados com 3% p.v./dia apresentaram maiores taxas de peroxidação lipídica nos peixes 3r2ra (G3) do que nos ad (G1) e r (G5) ($p=0,0476$). Peixes da estratégia alimentar 3r2ra e r diferiram entre os tratamentos, sendo maior em G3 do que em G4 ($p=0,0354$) e em G6 do que em G5 ($p=0,0289$). Comparando as amostragens, a LPO foi maior aos 21 dias em peixes G4 ($p=0,0321$) e G6 ($p=0,0302$), e aos 30 dias em G3 ($p=0,0001$).

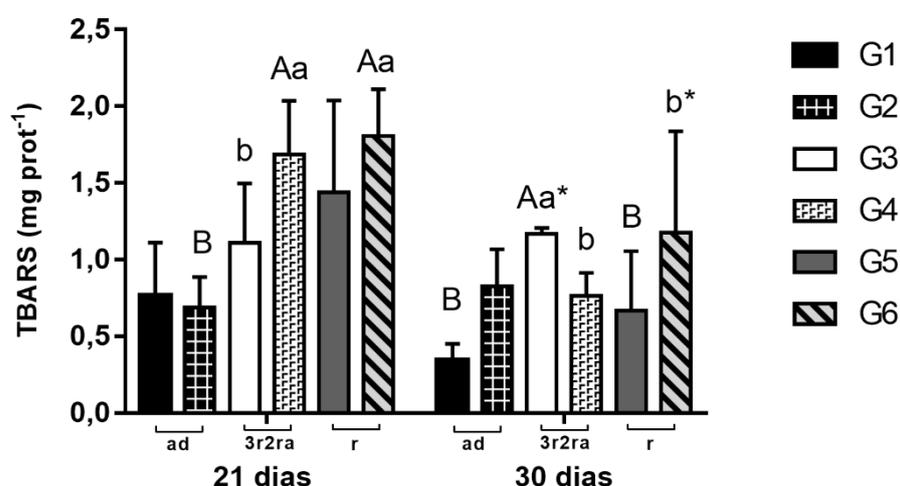


Figura 11. Peroxidação lipídica (LPO) aos 21 e 30 dias em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2. Ensaio experimental 2 – Desafio imunológico com inoculação de LPS após aplicação de estratégias alimentares de restrição alimentar e realimentação com oferta de alimento controlada e à saciedade aparente

3.2.1. Indicadores imunológicos

3.2.1.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Fig. 12A)

Ao término dos 30 dias, a inoculação do LPS modificou a ARL nos peixes previamente expostos às diferentes estratégias alimentares e tratamentos. 3h após a inoculação, houve redução da ARL nos peixes ad (G2) ($p=0,0357$), 3r2ra (G3) ($p=0,0435$) e r (G5) ($p<0,0001$) em relação à condição basal, com aumento após 6 h, com exceção do grupo G3, que oscilou sem significância, mas confirmou a redução às 24 h. A redução foi independente das estratégias ou tratamentos.

3.2.1.2. Concentração sérica de lisozima (Fig. 12B)

A concentração de lisozima diferiu em relação aos tempos de amostragem nos grupos G2 ($p=0,0821$), G4 ($p=0,0521$), G5 ($p=0,0112$) e G6 ($p=0,0007$).

Na amostragem basal, os peixes G1 e G3 que recebiam alimento controlado (3% p.v.) não diferiram daqueles previamente sob restrição alimentar, que foram realimentados, mas os peixes G2 e G4, alimentados à saciedade aparente, apresentaram concentrações mais elevadas que os peixes em realimentados ($p=0,0137$). Ao longo das amostragens, exceto pelos peixes G1 e G3, peixes de todas as estratégias/tratamentos apresentaram concentrações de lisozima mais elevadas 24 h depois da inoculação de LPS.

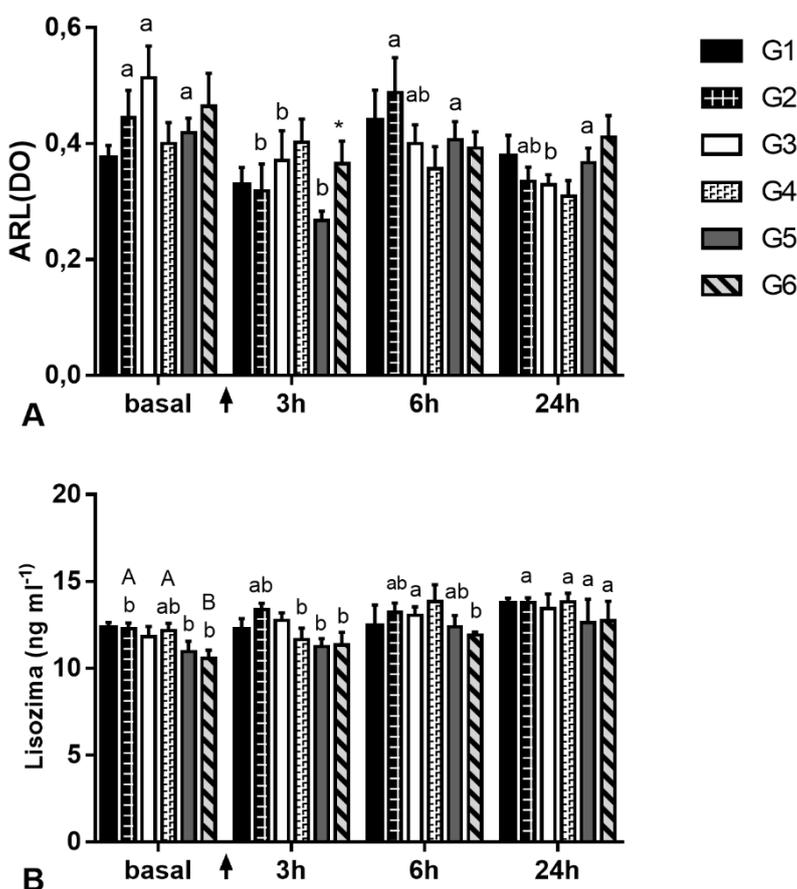


Figura 12. Atividade respiratória dos leucócitos (A) e lisozima (B) em pacu submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade

aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2.2. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

3.2.2.1. Superóxido dismutase (SOD) (Fig. 13)

Na amostragem basal, a atividade da SOD dos peixes alimentados com 3% p.v./dia diferiu entre as estratégias, sendo maior em G1 (ad), do que G5 (r), enquanto a atividade de G3 (3r2ra) não diferiu dos outros grupos (G1 e G5) ($p=0,0569$). Na amostragem seguinte, 3 h após a inoculação com LPS, as estratégias alimentares diferiram considerando os tratamentos. A atividade da SOD dos peixes alimentados com 3% p.v./dia, tanto alimentados diariamente quanto em dias alternados (G1 (ad) e G3 (3r2ra)) foi maior que nos peixes realimentados a 3% (G5 (r)) ($p=0,0092$) quanto nos realimentados até a saciedade (G6 (r)) ($p=0,0003$). Após 6 horas da inoculação, a atividade foi maior entre os peixes alimentados todos os dias, sendo maior naqueles alimentados até a saciedade (G2) ($p=0,0141$).

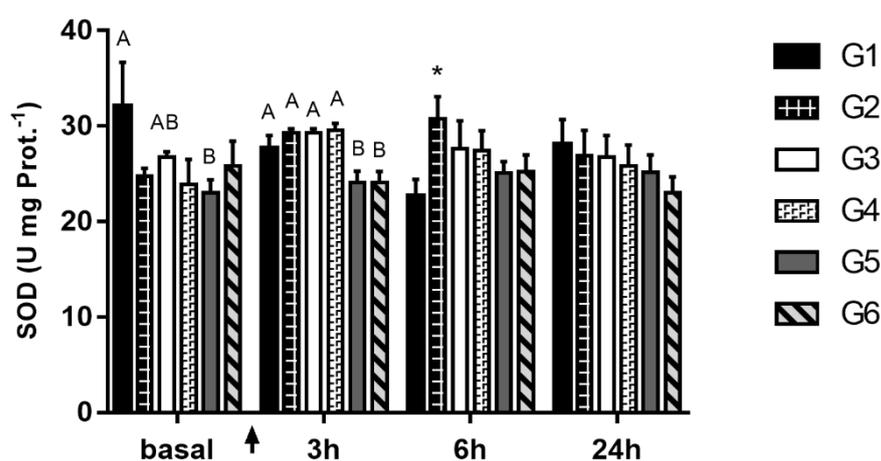


Figura 13. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam

diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2.2.2. Catalase (CAT) (Fig. 14)

A atividade da catalase diferiu em relação aos tempos de amostragens nos grupos G1 ($p=0,0739$) e G4 ($p=0,0062$). Após 3 horas da inoculação, a atividade da CAT foi maior nos alimentados até a saciedade, em dias alternados (G4), do que nos que foram alimentados diariamente à saciedade (G2) e realimentados à saciedade (G6) ($p=0,0007$). Peixes da estratégia alimentar 3r2ra diferiu entre os tratamentos, sendo maior em G4 ($p=0,0049$). Às 6 horas, houve diferença na atividade da enzima entre as estratégias alimentares em ambos os tratamentos. Os peixes alimentados com 3% p.v./dia em dias alternados (G3) apresentaram maior atividade enzimática do que os de G1 e G5 ($p=0,0249$), enquanto peixes alimentados diariamente até a saciedade (G2) a atividade foi maior que em G6 ($p=0,0096$). Nesta amostragem, peixes da estratégia alimentar 3r2ra diferiu entre os tratamentos, sendo maior em G3 ($p=0,0179$). Após 24 horas, peixes alimentados até a saciedade em dias alternados (G4) apresentou maior atividade da CAT do que os alimentados à saciedade (G2) e realimentados à saciedade (G6) ($p=0,0040$). Peixes da estratégia alimentar restrição diferiram entre os tratamentos, sendo maior em G5 ($p=0,0354$).

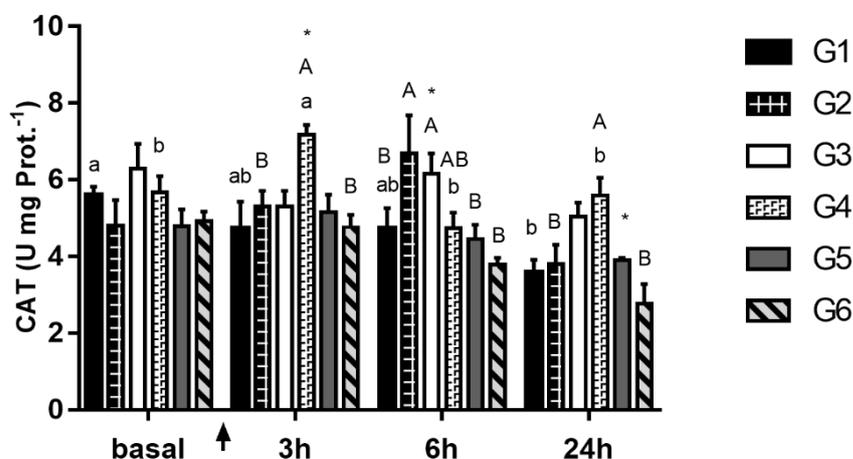


Figura 14. Atividade da catalase (CAT) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2)

(tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2.2.3. Glutathione-S-transferase (GST) (Fig. 15)

Na amostragem basal, peixes alimentados com 3% p.v./dia diferiram entre as estratégias, sendo a atividade da GST maior naqueles alimentados com 3% em dias alternados (G3) do que os alimentados diariamente (G1) e os realimentados com 3% (G5) ($p=0,0001$). Às 3 horas, a maior atividade ocorreu em peixes alimentados até a saciedade em dias alternados (G4) do que os realimentados com a mesma quantidade de alimento (G6) ($p=0,0416$). Após 6 horas da inoculação, peixes alimentados até a saciedade (G2) apresentaram maior atividade da GST do que os realimentados com a mesma quantidade de alimento (G6) ($p=0,0780$). Na última amostragem, peixes alimentados à saciedade (G4), em dias alternados, apresentaram a maior atividade da GST que os alimentados diariamente (G2) e realimentados (G6) ($p=0,0302$). Apenas nos peixes do grupo G2 a atividade da GST diferiu ao longo das amostragens, sendo maior às 3 e 6 horas ($p=0,0034$).

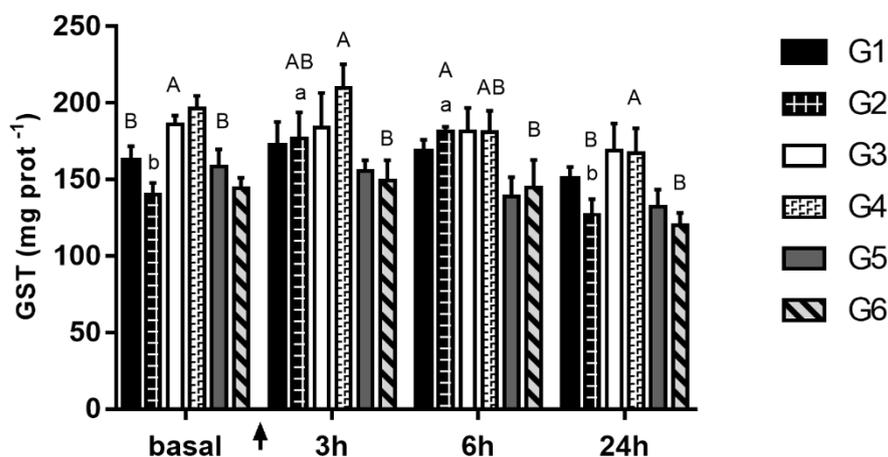


Figura 15. Atividade da glutiona-S-transferase (GST) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2.2.4. Glutona reduzida (GSH) (Fig. 16)

A atividade da glutona reduzida diferiu entre peixes dos grupos G1 ($p=0,0325$) e G3 ($p=0,0036$) alimentados com 3% diariamente e em dias alternados. Após 6 horas da inoculação, as concentrações de GSH foram maiores em G3 do que em G1 e G5 ($p=0,0003$). Ainda nesta amostragem, peixes da estratégia alimentar de ciclos curtos de restrição e alimentação (G3 e G4) diferiram entre os tratamentos, sendo maior em G3 ($p=0,0054$).

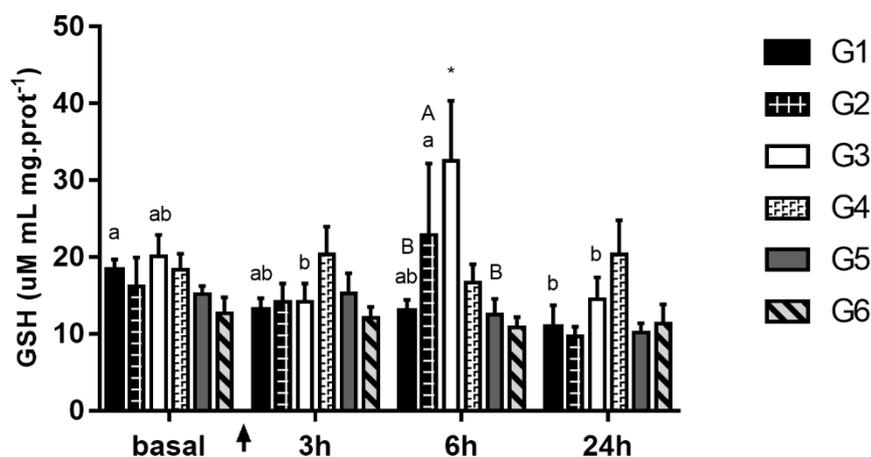


Figura 16. Atividade da glutatona reduzida (GSH) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

3.2.2.5. Peroxidação lipídica (LPO) (Fig. 17)

A peroxidação lipídica no fígado diferiu em relação aos tempos de amostragens nos grupos G1 ($p=0,0776$), G2 ($p=0,0034$), G3 ($p=0,0526$), G4 ($p=0,0245$) e G5 ($p=0,0073$). Na amostragem basal, peixes alimentados com 3% p.v./dia em dias alternados (G3) apresentaram as maiores concentrações de TBARS em relação aos alimentados diariamente (G1) e realimentados (G5) ($p=0,0476$). Após 3 horas de inoculação, os peixes realimentados com 3% (G6) apresentaram maior concentração de TBARS que os realimentados a saciedade (G5) ($p=0,0087$). Às 6 horas, essa diferença se inverteu e foi maior em G5 do que em G6 ($p=0,0118$), mas os peixes alimentados em dias alternados também diferiram entre os tratamentos, sendo maior em G3 do que em G4 ($p<0,0001$). Peixes alimentados com 3% p.v./dia diferiram entre as estratégias alimentares, sendo a concentração de TBARS maior nos alimentados em dias alternados (G3) do que nos alimentados diariamente (G1) e nos realimentados (G5) não diferiu ($p=0,0391$). Os peixes alimentados diariamente até a

saciedade (G2) apresentaram maior concentração do que G4 e G6 ($p=0,0001$). Às 24 horas, peixes alimentados com 3% p.v./dia, diariamente e em dias alternados (G1 e G3) apresentaram mais TBARS que os realimentados (G5) ($p=0,0279$). Comparando os grupos na estratégia, a concentração de TBARS foi maior em G6 do que G5 ($p=0,0004$).

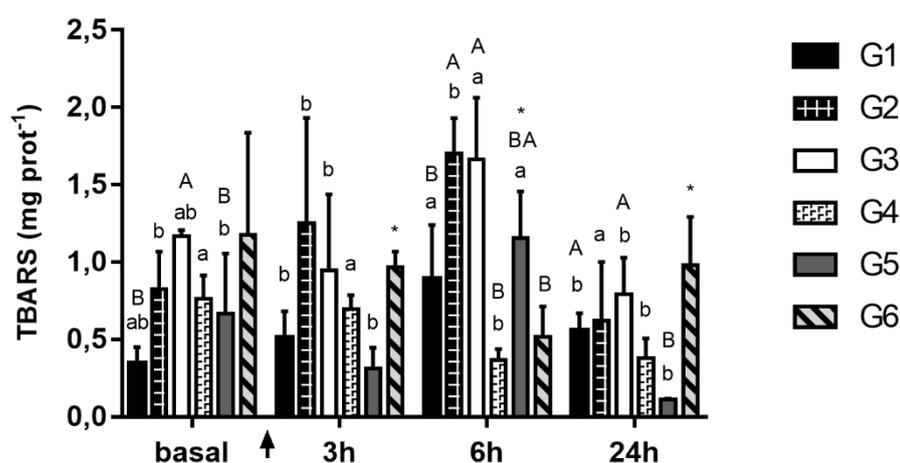


Figura 17. Peroxidação lipídica (LPO) em pacus submetidos a alimentação diária (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G1) ou até a saciedade aparente (G2) (tratamentos); em restrição por 3 dias e realimentação por 2 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G3) ou até a saciedade aparente (G4) (tratamentos) e restrição por 21 dias e realimentados por 9 dias (estratégia alimentar), com 3% p.v./dia (G5) ou até a saciedade aparente (G6) (tratamentos) e inoculados com LPS (seta). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nas diferentes estratégias alimentares (G1, G3 e G5; e entre G2, G4 e G6 no mesmo tempo de amostragem - 21 e 30 dias); letras minúsculas indicam diferenças entre tempos de amostragem em cada tratamento na mesma estratégia e o asterisco indica diferenças entre tratamentos da mesma estratégia (G1 com G2); (G3 com G4); (G5 com G6), no mesmo tempo de amostragem.

4. Discussão

Este estudo investigou os mecanismos bioquímicos de mobilização energética que ocorrem durante o jejum, e os mecanismos compensatórios após a realimentação (de forma controlada ou até à saciedade aparente) e sua correlação com os mecanismos de defesa imunológica inata e do sistema antioxidante em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Tanto em ambientes naturais quanto em ambientes de cultivo, os peixes passam por períodos de privação alimentar, devido a estação reprodutiva, condições ambientais adversas (McCue et al., 2010), antes do transporte e abate ou em casos de má qualidade da água (Davis e Gaylord et al., 2011). Para garantir a sobrevivência, possuem estratégias de compensação em condições em que há baixo aporte de energia (Messina et al., 2023). Em nosso estudo, observamos que a alimentação diária por 21 e 30 dias promoveu maior ganho de peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE) nos peixes alimentados diariamente (ad) em relação àqueles alimentados em ciclos de 3 dias de restrição e 2 dias de realimentação (3r2ra), enquanto os grupos G1 (aos 21 e 30 dias) e G4 (aos 21 dias), os quais recebiam alimento até à saciedade aparente apresentaram maior crescimento que os grupos alimentados com 3% p.v./dia. Aos 21 dias, a restrição alimentar (r) promoveu perda de peso nos peixes.

Observamos que a realimentação promoveu crescimento compensatório parcial, independente da taxa de alimentação. Estudos mostram que a realimentação promove o ganho de peso e crescimento compensatório em diversas espécies de peixes como *Brycon amazonicus* (Urbinati; Sarmiento; Takahashi, 2014), *Oncorhynchus mykiss* (Fauconneau e Paboeuf, 2000), *Oreochromis niloticus* (Palma et al., 2010) e *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2017). Em carpa capim, após 2 semanas de jejum, a realimentação promoveu aumento no ganho de peso, apresentando um crescimento compensatório (Xu et al. 2019). O perfil de crescimento (GP) se manteve nos peixes alimentados diariamente pelos 9 dias adicionais, mas nos peixes alimentados ciclicamente a diferença desapareceu. A carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) apresentou ganho de fibras musculares durante a realimentação em peixes alimentados em ciclos curtos, semelhante aos peixes que se alimentaram continuamente (Xu et al., 2019). Em nosso estudo, o perfil da TCE mudou à medida que o experimento continuou por 9 dias, pois ela diminuiu nos peixes alimentados diariamente à saciedade e nos alimentados em ciclos, sugerindo que a vantagem promovida pela alimentação à saciedade estava reduzida. Takahashi et al. (2011) relataram em pacus que a conversão alimentar foi menor em peixes alimentados em ciclos curtos de restrição e realimentação, devido a menor razão de eficiência proteica e a redução da hiperfagia a partir do segundo dia de realimentação, enquanto que no estudo de Urbinati et al. (2014) com matrinxã, os peixes submetidos

a ciclos de restrição de 2 dias seguidos de 3 ou 4 dias de realimentação, durante 60 dias, alcançaram crescimento compensatório total em ambas as condições de privação, aumentando o consumo de ração e a eficiência alimentar. No presente estudo, o crescimento compensatório parcial foi, provavelmente, devido ao curto período de realimentação (9 dias), mas o processo compensatório estava ocorrendo. No início do processo compensatório, o organismo aloca a energia disponível para estabilizar os processos vitais de sobrevivência.

Em relação ao perfil metabólico, os peixes em privação alimentar precisam manter suas funções fisiológicas ao modular as suas reservas para sobrevivência (Navarro e Gutierrez, 1995). Nosso estudo mostrou que, metabolicamente, a taxa de alimentação (3% ou saciedade aparente) não promoveu respostas diferentes no perfil da glicemia. Foi observada apenas uma redução nos peixes em restrição alimentar comparada aos peixes alimentados diariamente. Em *Mylopharyngodon piceus*, Dai et al. (2022) relataram que as vias metabólicas de glicose (glicólise e gliconeogênese) são cruciais para a homeostase durante o jejum e realimentação. Takahashi et al. (2011) observaram altos níveis plasmáticos de glicose e a redução de níveis séricos de triglicérides em peixes submetidos a restrições alimentares. Em nosso estudo, observamos que o glicogênio em estoque no fígado foi preservado, pois não observamos alterações expressivas. Tambaquis em restrição por 13 dias e realimentados por 1 dia mostram um consumo intenso do glicogênio e recuperação parcial após a realimentação (Santos et al., 2021). Em nosso caso, as concentrações de triglicérides circulantes diminuíram após 21 dias sem alimento, particularmente em relação aos peixes alimentados ciclicamente na taxa de 3%. Após 9 dias de realimentação, as concentrações aumentaram aos valores observados nos peixes sem restrição alimentar, indicando a recuperação metabólica.

A restrição alimentar também promoveu aumento das concentrações de colesterol que voltaram a valores controle com a realimentação e, após 9 dias de realimentação, houve aumento deste metabólito nos peixes alimentados diariamente até à saciedade. Este mesmo perfil foi descrito previamente por Favero et. (2018), em pacus submetidos a restrição alimentar, e em tecidos de *Anabas testudineus* (Godavarthy et al., 2012). Diferentemente, outros estudos relataram redução do colesterol plasmático em *Oncorhynchus mykiss* (Heming e Paleczny, 1987), *Salmo trutta* (L.) (Regost et al., 2001) e *Acipenser naccarii* em jejum (Furné et al., 2012). O

colesterol é um lípido envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo o metabolismo energético (Mommensen et al., 1999). O aumento observado em nosso estudo pode estar associado à demanda energética dos peixes durante a restrição alimentar.

O efeito da mobilização energética na restrição alimentar foi observado no índice hepatossomático (IHS) e no índice gorduro viscerossomática (IGVS), que diminuíram após a restrição alimentar e não diferiram nas outras estratégias alimentares. O IHS atingiu valores controle após a realimentação, mas o IGVS aumentou nos peixes realimentados à saciedade, sem diferença nos peixes que receberam 3% p.v. Durante 21 dias, os peixes alimentados em ciclos e que receberam alimento à saciedade, quando realimentados, tinham IGVS menor que o índice dos outros peixes que eram alimentados diariamente e em dias alternados, mas recebendo alimento a 3% p.v. Após 30 dias, os peixes que receberam alimento em dias alternados apresentaram IGVS menor que nos peixes alimentados diariamente. Estes resultados indicam que os processos bioquímicos compensatórios priorizaram o atendimento de demandas de manutenção de processos vitais e os 9 dias de realimentação não foram suficientes para restaurar o estoque de gordura visceral observado nos peixes alimentados continuamente.

O efeito da restrição também foi observado no lipídio hepático e muscular, que tiveram suas concentrações reduzidas e que foram recuperadas após a realimentação. Favero et al. (2020) mostraram em seu estudo que o jejum prolongado de juvenis de pacu os tornou mais magros e não prejudicou seu crescimento, além de controlar a estocagem lipídica. Outros estudos têm mostrado respostas semelhantes aos nossos. Cassidy et al. (2018) observaram uma diminuição do IHS durante a restrição em *Salvelinus alpinus*, e recuperação durante a realimentação, com resposta compensatória de crescimento. Tilápias em jejum apresentaram menor IHS em comparação aos grupos de peixes alimentados (Sakyi et al., 2020) e pacus submetidos a 30 dias de restrição seguidos de 30 dias de realimentação obtiveram resultados semelhantes (Favero et al., 2020).

Os peixes geralmente apresentam várias respostas fisiológicas, comportamentais e bioquímicas adaptativas à restrição alimentar, sob situações de restrição alimentar intensa. Assim, o bem-estar geral e a capacidade de tolerar situações de estresse e enfrentar desafios imunológicos devem ser investigados. A

análise da resposta do sistema imune inata neste estudo mostrou que a ARL dos peixes sob restrição foi ativada após realimentação, e o mesmo ocorreu nos peixes alimentados em dias alternados, a 3% p.v., em relação aos alimentados diariamente com a mesma taxa, o que indica que tanto a restrição prolongada quanto a restrição moderada, feita em dias alternados, ativou uma resposta de defesa dos leucócitos. Já, frente ao desafio da inoculação com LPS, a ARL, de modo geral, nos diferentes grupos experimentais, estava reduzida, mas não observamos um perfil claro de resposta deste indicador.

No caso da lisozima, as concentrações diminuíram nos realimentados, e os valores foram menores que os observados nos alimentados em dias alternados ou continuamente à saciedade. O resultado sugere que o processo de recuperação, na realimentação, priorizava processos metabólicos de manutenção, sendo o período pequeno para restabelecer a síntese de proteínas do sistema imune inato. Diferente de nossos resultados que encontraram prejuízo depois da realimentação, em estudo prévio com *Barbonymus schwanenfeldii* (Eslamoo et al., 2017), a atividade plasmática da lisozima aumentou em peixes em jejum por 1 semana e diminuiu no grupo de jejum de 2 semanas. Da mesma forma, estudos encontraram uma diminuição na atividade plasmática da lisozima da *Anguilla anguilla* e do *Pagellus bogarave*, após 31 dias de jejum, mas nenhum efeito foi observado no *Dicentrarchus labrax* após 42 e 58 dias de jejum (Caruso et al., 2010, 2011, 2012). Em relação ao desafio da inoculação, a concentração da lisozima que estava reduzida no momento da injeção, nos diferentes grupos, só apresentou valores mais elevados em 24h, mostrando uma ativação mais tardia, já relatada no pacu (Gimbo et al., 2015). Pacus sob restrição de 30 dias após exposição bacteriana foram capazes de se proteger contra a infecção, mesmo este sendo um processo de grande modulação de energia (Gimbo et al., 2015).

A função do sistema antioxidante, que está altamente envolvido nos processos de produção de energia, permanece pouco explorada nas estratégias de restrição alimentar em peixes e os dados variam. Os efeitos da restrição alimentar podem estar relacionados à produção de EROs, que são conhecidos por causar estresse oxidativo (Robinson et al., 1997).

A enzima SOD provou ter efeitos significativos sobre as espécies reativas de oxigênio. A SOD reage contra as EROS e catalisa a reação convertendo O_2^- em O_2 e H_2O_2 posteriormente convertido em água com CAT ou GPX (Halliwell e Gutteridge,

1989). Também se sabe que a GST pode prevenir a toxicidade de H₂O₂ e peróxidos orgânicos por meio de GSH (Tocher, 2003; Fontagné et al., 2006; Boglino et al., 2014; Halliwell e Gutteridge, 2015). O H₂O₂ também é clivado em água e oxigênio molecular pela CAT (Nimse et al., 2015; Stephensen et al., 2002). A GST pode também desempenhar um papel importante em caso de estresse oxidativo pela inibição da toxicidade de peróxidos lipídicos e redução da formação de ROS com atividade GPX (Rudneva et al., 2010).

Em nosso estudo, a atividade da SOD não teve oscilações expressivas, apenas foi maior nos peixes alimentados ciclicamente (3r2ra) em relação aos peixes que passaram por restrição alimentar de 21 dias, mas a inoculação do LPS ativou a enzima (3 h), com prejuízo nos peixes realimentados, sugerindo dificuldade destes animais em restabelecer a capacidade de resposta.

Em relação à CAT, aos 21 dias houve redução da sua atividade em peixes sob restrição de 21 dias (r) e ativação nos peixes em regime cíclico de alimentação (3r2ra) sugerindo uma condição de alerta. Após a inoculação, a CAT mostrou maior ativação nos grupos alimentados e principalmente no alimentado ciclicamente, enquanto o prejuízo observado nos peixes que passaram por restrição permaneceu.

Quanto à GST, as oscilações nas atividades não permitiram a construção de um perfil claro, mas é possível observar, de modo geral, maiores atividades nos animais alimentados e menor nos que passaram por restrição. Esse padrão se manteve após o LPS.

A restrição alimentar reduziu as concentrações de GSH e mesmo tendo aumentado depois da realimentação ainda estavam em níveis menores que as concentrações de peixes alimentados. A inoculação ativou a resposta da GSH, mas não alterou a resposta dos realimentados.

E, ainda, considerando as respostas da peroxidação lipídica (LPO), podemos afirmar que houve estresse oxidativo nos peixes alimentados em ciclos de restrição e nos que passaram por restrição, enquanto a realimentação reduziu a concentração de peróxidos e uma melhora moderada foi observada nos peixes alimentados ciclicamente. A inoculação apenas acentuou esse padrão de respostas. A LPO reflete diretamente a taxa e a extensão dos danos causados pelos radicais livres nos lipídios (Faria et al., 2021). Dessa forma, observamos uma relação entre a privação alimentar

e o sistema antioxidante. Isso nos leva a associar à intensa mobilização de lipídeos durante a restrição alimentar e a consequente formação de peróxidos lipídicos, que pela toxicidade leva a quadro de estresse oxidativo (Rudneva et al., 2010). Isso justifica as alterações observadas nos indicadores do sistema antioxidante, que foram ativados para combater as EROS e tentar minimizar o estresse oxidativo. Florescu et al. (2021) observaram um ajuste metabólico para minimizar o gasto de energia durante jejum e uma resposta adaptativa para lidar com o estresse oxidativo que pode ser induzido por regimes de fome/realimentação. Restrição alimentar em *Dentex dentex* durante 5 semanas levou a um quadro pro-oxidante e a estresse oxidativo (Morales et al., 2004) a despeito da ativação do sistema antioxidante de defesa, e os autores justificaram por uma inibição da atividade da enzima G6PDH como responsável pela falha da defesa antioxidante, lembrando que a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a primeira enzima do processo oxidativo da via das pentoses fosfato. Há evidências de que a G6PDH tem papel crucial na modulação das defesas antioxidantes (Leopold e Loscalzo, 2000). São responsáveis pela geração do aporte de NADPH, necessário para a detoxificação dos agentes oxidantes produzidos pelo estresse oxidativo metabólico nos eritrócitos. O número reduzido de informações sobre os mecanismos que correlacionam restrição alimentar e estresse oxidativo em peixes ainda são controversos e reforçam a necessidade de maior investimento de pesquisa nesta área.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo indicam que a restrição alimentar modulou as reservas energéticas durante os 21 dias de restrição alimentar, e após 9 dias de realimentação promoveu o crescimento compensatório e a recuperação das reservas energéticas. O sistema imune (ARL e lisozima) não foi afetado pela restrição alimentar, mas a realimentação ativou a ARL e reduziu a concentração sérica de lisozima. Em peixes privados de alimento, o sistema antioxidante demonstrou prejuízos na capacidade de resposta. Embora houvesse ativação de enzimas antioxidantes, a alta mobilização de energia durante o jejum provocou estresse oxidativo.

6. Referências

- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMED, N., THOMPSON, S., GLASER, M. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability. **Environmental Management**, v. 63, n. 2, p. 159-172, 2019.
- ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R. J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and fisheries**, v. 4, n. 2, p. 147-190, 2003.
- ALMAJWA, A., ALAM, I., ZEB, F., FATIMA, S. Energy Metabolism and Allocation in Selfish Immune System and Brain: A Beneficial Role of Insulin Resistance in Aging. **Food and Nutrition Sciences**, v.10, p.64-80 2019.
- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, D. et al. Behavioral responses to the environment. Effects of Compensatory Growth on Fish Behavior. **Encyclopedia of fish physiology**, 2011.
- ANDERSON, D.P., SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.: ARTHUR, J.R., SUBASINGHE, R.P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.
- ARGÜELLO-GUEVARA, W. et al. Effects of intermittent feeding on water quality, skin parasites, feed consumption, and growth performance of juvenile longfin yellowtail
- BEUTLER E, DURAN O, KELLY B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 284, p. 861-882, 1963.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.2, p.425-429, 2013.
- BIRD. L. Getting enough energy for immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.19, p.269, 2019.
- BJØRNEVIK, M. et al. Effects of starvation, subsequent feeding and photoperiod on flesh quality in farmed cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 285-292, 2017.
- Bogolino, A., et al. The effect of dietary oxidized lipid levels on growth performance, antioxidant enzyme activities, intestinal lipid deposition and skeletogenesis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquac. Nutr.**, v. 20, p. 692–711, 2014.

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., et al. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. **Fish Physiol Biochem**, v. 36, p. 71–83, 2010.

Caruso G., et al. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). **Mar Environ**, 2011.

Caruso G., et al. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): response of some haematological, biochemical and non specific immuneparameters. **Mar Environ Res**, v. 81, p. 18–25, 2012.

CASSIDY, A. A. et al. Effects of fasting and refeeding on protein and glucose metabolism in *Arctic charr*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 226, p. 66-74, 2018.

CHAVES, R. C. et al. Impacts of fish farming on elemental stoichiometry, fluorescence components, and stable isotopes of dissolved organic matter in a tropical reservoir. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115704, 2021.

CHAVES, R. C. et al. Impacts of fish farming on elemental stoichiometry, fluorescence components, and stable isotopes of dissolved organic matter in a tropical reservoir. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115704, 2021.

CIPRIANO, R.C., SMITH, M.L., VERMEERSCH, K.A., DOVE, A.D.M., STYCZYNSKI, M.P. Differential metabolite levels in response to spawning-induced inappetence in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v.13, p.52–59, 2015.

CIPRIANO, R.C., SMITH, M.L., VERMEERSCH, K.A., DOVE, A.D.M., STYCZYNSKI, M.P. Differential metabolite levels in response to spawning-induced inappetence in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v.13, p.52–59, 2015.

compensatory growth of whitefish *Coregonus lavaretus* L. **Aquaculture**, v.288, p.92–97, 2009.

DAI, Y. et al. Glycolysis and gluconeogenesis are involved of glucose metabolism adaptation during fasting and re-feeding in black carp (*Mylopharyngodon piceus*).

Aquaculture and Fisheries, 2022.

DAI, Y. et al. Glycolysis and gluconeogenesis are involved of glucose metabolism adaptation during fasting and re-feeding in black carp (*Mylopharyngodon piceus*).

Aquaculture and Fisheries, 2022.

DAVID, L. H. C., PINHO, S. M., GARCIA, F. Improving the sustainability of tilapia cage farming in Brazil: An emergy approach. **Journal of Cleaner Production**, 201, 1012-1018, 2018.

DAVID, L. H. et al. Emergy synthesis for aquaculture: A review on its constraints and potentials. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 2, p. 1119-1138, 2021.

Davis K. B., Gaylord T. G. **Bioquímica e Fisiologia Comparadas, Parte A**. ed. 158, p. 30-36, 2011.

DEMERS, Nora E.; BAYNE, Christopher J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n. 4, p. 363-373, 1997.

EL-GOHARY, F.A., EL-GOHARY, F.A., ZAHRAN, EL-GAWAD, E.A.A., EL-GOHARY, A.D., ABDELHAMID, F.M., EL-MLEEHE, A., ELMAHALLAWY, E.K., ELSAYED, M.M. Investigation of the prevalence, virulence genes, and antibiogram of motile Aeromonads isolated from *Nile tilapia* fish farms in Egypt and assessment of their water quality. **Animals**, v.10, p.1432, 2020.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO.

FARIA, C. F. P. et al. Modulation of the innate immune response, antioxidant system and oxidative stress during acute and chronic stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiology And Biochemistry**, v. 47, p. 895-905, 2021.

FAUCONNEAU, B., PABOEUF, G. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell and tissue research**, v. 301, p. 459-463, 2000.

FAVERO, G. C. et al. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Research**, v. 49, 2017.

- FAVERO, G.C., GIMBO, R.Y., FRANCO MONTOYA, L., ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Research**, v.49, p.359-366, 2018.
- FAVERO, G.C., GIMBO, R.Y., FRANCO MONTOYA, L.N., CARNEIRO, D.J., URBINATI, E.C. A fasting period during grow-out make juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) leaner but does not impair growth. **Aquaculture**, v.524, p.735242, 2020.
- FERRIANI, V.P.L., BARBOSA, J.E., CARVALHO, I.F. Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy age related changes. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v.79, p.322-327, 1990.
- FLORESCU, I. E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to starvation and refeeding in the intestine of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juveniles from aquaculture. **Animals**, v. 11, p. 76, 2021.
- Fontagné, S., et al. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. **Aquaculture**, v. 257, p. 400–411, 2006.
- FRINGS, C.S. et al. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 7, p. 673–674, 1972.
- FRISARD, M., RAVUSSIN, E. Energy metabolism and oxidative stress. **Endocrine**, v.29, p.27-32, 2006.
- Furné, M., et al. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, p. 63–76, 2012.
- GALLARDO-COLLÍ, A. et al. Compensatory growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, L. subjected to cyclic periods of feed restriction and feeding in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v.51, p.1813-1823, 2020.
- GANESHAN, K. et al. Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance, **Cell**, v.177, p.399–413, 2019.
- GASPAROVIC A.C. et al. Assays for the Measurement of Lipid Peroxidation. **Methods In Molecular Biology**, p. 283-296, 2012.
- GAYLORD, T.G., GATLIN III, D.M. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.194, p.337-348, 2001.

GENTRY, R., FROELICH, H.E., GRIMM, D., KAREIVA, P., PARKE, M., RUST, M., GAINES, S.D., HALPERN, B.S. Mapping the global potential for marine aquaculture. **Nature Ecology & Evolution**, v.1, p.1317-1324, 2017.

GIMBO, R. Y. et al. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 43, p. 295-300, 2015.

Godavarthy, P. K., Bikshapathy, E. Starvation induced cholesterologenesis in hepatic and extra hepatic tissues of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 489–494, 2012.

GURNEY, W.S.C. et al. Resource allocation, hyperphagia, and compensatory growth in juveniles. **Ecology**, v.34, p.2777–2787, 2003.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Redox chemistry: The essentials. **Free Radic. Biol. Med.**, 2015.

Halliwell, B. Gutteridge, J. M. C. **Free Radical Biology and Medicine** 2nd edn., Oxford Science Publications, 1989.

HAYWARD, R.S., NOLTIE, D.B., WANG, N. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.126, p.316-322, 1997.

Heming, T. A., Paleczny, E. J. Compositional changes in skin mucus and blood serum during starvation of trout. **Aquaculture**, v. 66, p. 265–273.(1987).

HOPKINS, J., TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **British Journal of Haematology**, v.25, p.563-575, 1973.

ISABELLA, J. A Short History of Aquaculture Innovation. **Haikai Magazine**. 2020.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v.15, p.755-766, 1995.

JACOB, R.A., BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 6, p. 985S-990S, 1996.

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

KÄNKÄNEN, M., PIRHONEN, J. The effect of intermittent feeding on feed intake and KEEN J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism of the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biology Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.

- Khalil E., et al. Effect of starvation on some immunological and biochemical parameters in tinfoil barb (*Barbonymus schwanenfeldii*). **Journal of applied animal research**, v. 45, p. 173–178, 2017
- KLEIN, J. Immunology. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. 311-334, 1990.
- KUCUKSEZGIN, F. et al. The impact of fish farming on the water column and marine sediments in three coastal regions from eastern Aegean coast. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p.29564-29580, 2021.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. H2477 – H2485, 2000.
- LI, Hongyan *et al.* Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). **Aquaculture**, v.496, p.166-175, 2018.
- LIAO, Z., LIN, D., JIA, J., CAI, R., YU, Y., LI, W. Innate Immune Response to Fasting and Refeeding in the Zebrafish Kidney. **Biomolecules**, v.11, p.825, 2021.
- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v.244, p. 6049-6055, 1969.
- MCCUE, M. D. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 156, p. 1-18, 2010.
- MELLO, M.M.M., FARIA, C.F.P., ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C. β -glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.93, p.1076–1083, 2019.
- Messina, M. et al. Effect of feed restriction and refeeding on body condition, digestive functionality and intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-21, 2023.
- METCALFE, N.B., FRASER, N.H.C., BURNS, M.D. Food availability and the nocturnal vs. diurnal foraging trade-off in juvenile salmon. **Journal of Animal Ecology**, v.68, p.371–381, 1999.

Mommsen, T., Vijayan, M., Moon, T. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211–268, 1999.

Morales A. E., et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 139, p. 153-161, 2004.

NAVARRO, I., GUTIERREZ, J. Fasting and starvation. In: **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier, 1995. p. 393-434.

NIMSE, S. B; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC advances**, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

O'CONNOR, K.I., TAYLOR, A.C., METCALF, M.B. The stability of standard metabolic rate during a period of food deprivation in juvenile Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.41–51, 2000.

OH, S-Y. et al. Effects of Feed Restriction to Enhance the Profitable Farming of Blackhead Seabream *Acanthopagrus schlegelii schlegelii* in Sea Cages. **Ocean Science Journal**, v.48, p.263–268, 2013.

PALMA, E. H. et al. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. **Ciência Rural**, v. 40, p. 391-396, 2010.

PAZ, A. L; PASTRANA, Y. M; BRANDÃO, L. V. Food deprivation does not affect growth performance of juvenile tambacu. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 207-210, set. 2018.

PERRY S.F. et al. Metabolic consequences of hypercapnia in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: β -adrenergic effects. **General and Comparative Endocrinology**, v. 69, p. 439-447, 1988.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. Experimental and Mathematical Analyses. **Journal of Immunology**, v.121, p.363- 370, 1978.

PY, C., ELIZONDO-GONZÁLEZ, R., PEÑA-RODRÍGUEZ, A. Compensatory growth: Fitness cost in farmed fish and crustaceans. **Reviews in Aquaculture**, v.14, p.i-ii, 1089-1740, 2022.

RAKIB, M. R. J. et al. Assessment of trace element toxicity in surface water of a fish breeding river in Bangladesh: a novel approach for ecological and health risk evaluation. **Toxin Reviews**, v. 41, n. 2, p. 420-436, 2022.

Regost, C., et al. 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.

ROBERTS, C.K., SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v.84, p.705-712, 2009.

ROBINSON, M. K. et al. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. **Journal Of Surgical Research**, v. 69, p. 325-330, 1997.

RODRIGUES, M. L. et al. Metabolism and growth performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles submitted to different feeding frequencies. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e28710413979-e28710413979, 2021.

Rudneva, I. I., et al. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** v. 151, p. 229–239, 2010.

SAKYI, M. E. et al. Short term starvation and re-feeding in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758): Growth measurements, and immune responses. **Aquaculture Reports**, v. 16, p. 100261, 2020.

SALGADO-ISMODES, A., TAIPALE, S., PIRHONEN, J. Effects of progressive decrease of feeding frequency and re-feeding on production parameters, stomach capacity and muscle nutritional value in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.519, p.734919, 2020.

SANTOS, R. F. et al. Respostas agudas da realimentação em tambaquis submetidos ao jejum prolongado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 22, 2021.

SECOR, S.M., CAREY, H.V. Integrative physiology of fasting. **Compr Physiol**, v. 6, p. 773–825, 2016.

SKALSKI, G.T., PICHA, M.E., GILLIAM, J.F., BORSKI, R.J. Variable intake, compensatory growth, and increased growth efficiency in fish: models and mechanism. **Ecology**, v.86, p.1452–1462, 2005.

SOUZA, V.L., et al. 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, p.19-28, 2003.

SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.15, p.371-379, 2000.

Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 133, p. 435–442, 2002.

SU, Y. et al. Effects of starvation and refeeding on growth, biochemical composition, enzyme activities and intestine structure of lined seahorses, *Hippocampus erectus*. **Aquaculture**, v. 548, p. 737733, 2022.

TAKAHASHI, L. S. et al. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 259-266, 2011.

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.

TAKAHASHI, L.S., BILLER-TAKAHASHI, J.D., URBINATI, E.C. Physiological response to *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) infection by pacu *Piaractus mesopotamicus* subjected to short cycles of food restriction and refeeding. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.45, p.567-576, 2014.

Tocher, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Rev. Fish. Sci**, v. 11, p. 107–184, 2003.

TROTET, A. et al. Aquaculture in coastal urbanized areas: A comparative review of the challenges posed by Harmful Algal Blooms. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 16, p. 2888-2929, 2022.

TUNÇELLI, G., PIRHONEN, J. Effects of weekend starvation and the duration of daily feeding on production parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 543, p. 737028, 2021.

TUNÇELLI, G., PIRHONEN, J. Effects of weekend starvation and the duration of daily feeding on production parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.543, p.737028, 2021.

TURANO, M.J., BORSKI, R.J., DANIELS, H.V. Effects of cyclic feeding on compensatory growth of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) foodfish and water quality in production ponds. *Aquaculture Research*, v.39, p.1514–1523, 2008.

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.

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

WANG, Y., CUI, Y., YANG, Y., CAI, F. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*, reared in sea water. ***Aquaculture***, 189, 101–108, 2000.

WANJA, D. W. et al. Fish husbandry practices and water quality in central Kenya: potential risk factors for fish mortality and infectious diseases. ***Veterinary Medicine International***, v. 2020, 2020.

XIAO, J. et al. Compensatory growth of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* with cyclical feed deprivation and refeeding. ***Aquaculture Research***, v.44, p.1045-1057, 2013.

XU, H., GAO, Q., YUAN, B. Analysis and identification of pollution sources of comprehensive river water quality: Evidence from two river basins in China. ***Ecological Indicators***, v. 135, p. 108561, 2022.

XU, Y. et al. Fish growth in response to different feeding regimes and the related molecular mechanism on the changes in skeletal muscle growth in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). ***Aquaculture***, v. 512, p. 734295, 2019.

ZANUZZO, F. S. et al. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). ***Aquaculture***, v. 435, p. 1-9, 2015.

ZHAO, Z. et al. Stress responses of the intestinal digestion, antioxidant status, microbiota and non-specific immunity in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) under starvation. ***Fish & Shellfish Immunology***, v. 120, p. 411-420, 2022.