

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/03/2022.

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

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS SISTEMAS
METABÓLICO, IMUNOLÓGICO E ANTIOXIDANTE EM
JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus***

**Adriane Federici Bido
Bióloga**

2020

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

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS SISTEMAS
METABÓLICO, IMUNOLÓGICO E ANTIOXIDANTE EM
JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus***

Adriane Federici Bido
Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

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

2020

B585e Bido, Adriane Federici
Efeitos da restrição alimentar nos sistemas metabólico, imunológico e antioxidante em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* / Adriane Federici Bido. -- Jaboticabal, 2020
99 p. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

1. Metabolismo energético. 2. Crescimento. 3. Imunidade. 4. Estresse oxidativo. 5. Antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS SISTEMAS METABÓLICO, IMUNUNOLÓGICO E ANTIOXIDANTE EM JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus*

AUTORA: ADRIANE FEDERICI BIDO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

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

Profa. Dra. GISELE CRISTINA FÁVERO
Departamento de Zootecnia-Escola de Veterinária-UFMG / Belo Horizonte/MG

Prof. Dr. RODRIGO YUKIHIRO GIMBO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade Nilton Lins / Manaus/AM

Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Fisiologia Geral-(IB/USP) / São Paulo/SP

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI
Centro de Aquicultura-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 13 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Adriane Federici Bido – Nascida na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, no dia 19 de setembro de 1990. Em março de 2009, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas, Da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, sendo bolsista do Programa de Educação Tutorial de Ciências Biológicas (PETBio). Concluiu o curso de graduação em maio de 2013 e ingressou no curso de mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais no mês de março de 2014, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel, PR, sob orientação do Prof. Dr. Sergio Makrakis e com bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Concluiu o curso de mestrado em fevereiro de 2016 e ingressou no curso de doutorado em Zootecnia, no mês de agosto de 2016, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, campus de Jaboticabal, SP, sob orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, e com bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). No mês de fevereiro de 2020 defendeu a tese, recebendo o título de Doutorado em Zootecnia.

“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta as mudanças”

Charles Darwin

Dedico com muito amor e gratidão...

Aos meus pais, Luiz Antonio Bido e Lúcia H. Federici Bido

Ao meu irmão, Luiz Bido Neto

Eu amo vocês infinitamente. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu chegasse até aqui...

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha, paciência e confiança no trabalho que juntas realizamos.

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

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade.

À Raissa Ribeiro, amiga, parceira, confidente... a que me acolheu e viveu intensamente cada reclamação cada alegria. Obrigada por ser luz durante todo esse percurso que sabemos que é árduo. Eu amo você.

À Luana Camargo, amiga de longa data...obrigada por me aguentar até aqui e mostrar que amizade existe. Eu amo você.

À Mariana Maluli, pelo auxílio constante da estatística, dos conselhos, da amizade, e pelo presente do meu filho de quatro patas. Tem todo o meu carinho!

À Ana Paula Montedor e Marcel por não medir esforços ao me ajudar e pela amizade construída. Vocês são especiais.

À Allana Feitoza, Aurea Veras, Rudney Weiber, Larissa Frazão, Allan Emilio, Thaís Lucato, Renan Bin, Camila Faria, Juliano Coutinho, Gabriel Conde, Suelen, Eduardo Pahor, pelas risadas, pelos cafés e sorvetes semanais, pelos mapas astrais ne Allana, por aguentar minhas reclamações e choros, por toda ajuda durante este percurso. Obrigada!

Aos técnicos e servidores Damares Percim, Euclides e Ângela pelo carinho, amizade, grandes risadas e auxílios laboratoriais.

Ao laboratório de nutrição do Caunesp, especialmente ao Prof. Dr. Dalton Carneiro por conceder o espaço para realização do meu trabalho. Obrigada!

Ao laboratório do departamento de morfologia e fisiologia animal a qual tive todo o auxílio de alunos e professores. Obrigada Prof Dr. Guilherme, Prof. Dra Luciane, Kênia e Lizandra e aos alunos envolvidos.

Ao laboratório de patologia do Caunesp por toda ajuda e auxílios.

Ao Valdecir e Márcio pela amizade e pelo auxílio na coleta dos peixes.

Ao Prof. Dr. Sergio Zaiden e equipe pela confecção do material histológico e por todo auxílio durante esta pesquisa. Obrigada!

A Prof^a. Dr^a. Renata Guimarães pelo auxílio em análises e fornecimento de materiais.

Ao meu filho de quatro patas que só me trouxe alegria e momentos únicos. Como é bom poder contar com você Duke, se você falasse seria ainda mais perfeito.

Ao meu avô por sempre me ajudar no que podia e por acreditar em mim. Eu te amo, e queria que fosse eterno.

À minha família que tanto me ajudou e acreditou em mim durante todo meu percurso acadêmico.

À todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram. O meu muito obrigada, e desde já peço desculpas se esqueci de alguém. Afinal, todos que passaram por mim sabem a importância que tiveram.

Despeço-me feliz e grata por ter chego até aqui e estar finalizando mais um ciclo da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
CAPÍTULO 1.....	iv
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução e justificativa.....	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Restrição alimentar/realimentação em peixes	2
2.1.1 Desempenho zootécnico na restrição alimentar	3
2.1.2. Metabolismo energético em peixes	4
2.1.3. Restrição alimentar e estrutura do epitélio intestinal de peixes	6
2.1.4. Restrição alimentar e sistema imunológico em peixes	8
2.1.5. Restrição alimentar e a interação com o sistema antioxidante em peixes	10
2.1.6. Restrição e sistema antioxidante em peixes.....	15
2.2. L-Glutamato	16
2.3. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	18
3. Objetivos gerais	18
4. Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO 2	31
EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS SISTEMAS METABÓLICO, IMUNOLÓGICO E ANTIOXIDANTE EM PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i>.....	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. Introdução.....	34
2. Materiais e métodos	35
2.1. Animais e delineamento experimental	35
2.2. Preparo da ração.....	38
2.3. Amostragem	38
2.4. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais	39
2.5. Indicadores imunológicos	41
2.6. Indicadores do sistema antioxidante hepático e intestinal	41
2.7. Indicadores morfométricos.....	42
2.8. Análise histológica	42

2.9. Desempenho zootécnico.....	43
2.10. Análise estatística	43
3. Resultados	44
3.1. Ensaio 1. Efeito de diferentes estratégias alimentares, aplicadas por 15 dias, nas respostas metabólicas, imunes, antioxidantes e de crescimento.	44
3.1.1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol	44
3.1.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular	46
3.1.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado	47
3.1.4. Indicadores do sistema antioxidante no intestino	49
3.1.5. Índices gordura víscerosomático (IGVS), hepatossomático (IHS) e esplenossomático (IES)	51
3.1.6. Indicadores histológicos do intestino	52
3.1.7. Desempenho zootécnico.....	53
3.2 Ensaio 2. Efeito da suplementação dietária com L-GLUT em respostas fisiológicas em pacus submetidos a diferentes estratégias alimentares aos 15 dias	55
3.2.1. Concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol	55
3.2.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular	57
3.2.3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima (CLS).....	58
3.2.4. Indicadores do sistema antioxidante no fígado	58
3.2.5. Indicadores do sistema antioxidante no intestino	59
3.2.6. Índices gordura víscerosomático (IGVS), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenossomático (IES)	61
3.2.7. Indicadores histológicos do intestino	62
3.2.8. Desempenho zootécnico.....	64
3.3. Ensaio 3. Efeito de diferentes ciclos de restrição alimentar e realimentação e da suplementação dietária com L-GLU em respostas fisiológicas aos 30 e 38 dias.	65
3.3.1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol	65
3.3.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular	67
3.3.3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima	69
3.3.4. Indicadores do sistema antioxidante no fígado	70
3.3.5. Indicadores do sistema antioxidante no intestino	72
3.3.6. Índices gordura víscerosomático (IGVS), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenossomático (IES)	74
3.3.7. Indicadores histológicos do intestino	76

3.3.8. Desempenho zootécnico.....	78
4. Discussão.....	80
5. Conclusões.....	91
6. Referências Bibliográficas.....	92

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Integração do sistema de defesa antioxidante enzimático. Adaptado de Storey, 2004. 14
- Figura 2.** (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL⁻¹); (C) colesterol (mg dL⁻¹) e (D) glicerol (mg dL⁻¹) em pacus submetidos a diferentes estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão..... 45
- Figura 3.** (A) Concentrações de glicogênio (%), (B) lipídio hepático (mg g⁻¹) e (C) lipídio muscular (mg g⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão. 46
- Figura 4.** (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540nm) e (B) concentrações séricas de lisozima (ng µL⁻¹) (B) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão. 47
- Figura 5.** (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase (µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida (µg GSH mg de proteína⁻¹) em fígado de pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão..... 48
- Figura 6.** (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase (µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida (µg GSH mg de proteína⁻¹) em intestino de pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão. 50
- Figura 7.** (A) Índice gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%) e (C) índice esplenossomático (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão..... 51
- Figura 8.** (A) Infiltrado leucocitário (%), (B) altura total dos vilos (µm) e (C) células caliciformes (%) na porção anterior em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão. 52
- Figura 9.** Fotomicrografia mostrando a infiltração leucocitária (A) indicada por setas (HE - 50x), e células caliciformes (B) indicadas por setas (PAS- Alcian Blue 50x). 53

Figura 10. (A) Peso final (g), (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar aparente em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 54

Figura 11. (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL^{-1}); (C) colesterol (mg dL^{-1}) e (D) glicerol (mg dL^{-1}) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 56

Figura 12. (A) Glicogênio hepático (%), (B) lipídio hepático (mg g^{-1}) e (C) lipídio muscular (mg g^{-1}) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúscula (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 57

Figura 13. (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540 nm); (B) concentração sérica de lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU por 2 dias/jejum de 1 dia. Ausência de letras indicam falta de diferença ($p > 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 58

Figura 14. (A) Superóxido dismutase ($\text{U SOD mg de proteína}^{-1}$), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) em fígado de pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU, por 2 dias e jejum de 1 dia. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 59

Figura 15. (A) Superóxido dismutase ($\text{U SOD mg de proteína}^{-1}$), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) em intestino de pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU, por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúscula (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 60

Figura 16. (A) Índice de gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%) e (C) índice esplenossomático (%) em pacus submetidos pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU, por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 61

Figura 17. (A) Infiltrado leucocitário (%), (B) altura total das vilosidades (μm) e (C) células caliciformes em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU, por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão..... 63

Figura 18. (A) Peso final, (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C e CS – alimentação contínua e suplementada, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia controle e suplementada. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença entre as estratégias alimentares na mesma dieta ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão..... 64

Figura 19. (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL^{-1}) (C) colesterol (mg dL^{-1}) e (D) glicerol (mg dL^{-1}) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; 30CR/8 e 30S/R1 - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença das dietas na estratégia. Os dados representam médias e erro padrão..... 66

Figura 20. Concentrações de (A) glicogênio hepático (%) e (B) lipídeo hepático (mg g^{-1}), (C) e lipídeo muscular (mg g^{-1}) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença das dietas na estratégia. Os dados representam médias e erro padrão..... 68

Figura 21. (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540 nm); (B) concentração sérica de lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão..... 69

Figura 22. (A) Superóxido dismutase ($\text{U SOD mg de proteína}^{-1}$), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathiona S-transferase ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) e (D) glutathiona reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) no fígado de pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da

realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 71

Figura 23. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) no intestino de pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão. 73

Figura 24. (A) índice de gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%), índice esplenossomático (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença das dietas na estratégia. Os dados representam médias e erro padrão. 75

Figura 25. (A) infiltrado leucocitário (%), (B) altura das vilosidades (cm) e (C) células caliciformes (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença das dietas na estratégia. Os dados representam médias e erro padrão. 77

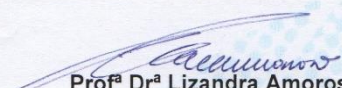
Figura 26. (A) Peso final (g); (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar aparente em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença das dietas na estratégia. Os dados representam médias e erro padrão. 79

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**A restrição alimentar afeta o sistema antioxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus*?**", protocolo nº 014881/17, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Elizabeth Criscuolo Urbinati, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 31 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	01/11/2017 a 01/05/2020
Espécie / Linhagem	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Nº de animais	288
Peso / Idade	80g
Sexo	Ambos
Origem	Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP - FCAV

Jaboticabal, 31 de outubro de 2017.


Prof.^a Dr.^a Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

RESUMO A presente tese aborda os efeitos do jejum e realimentação no metabolismo energético, na imunidade inata e no sistema antioxidante do pacu. O interesse no tema se deve ao fato de que a produção de peixes vem ganhando importância em todo o mundo, com intensificação dos sistemas de produção que exigem o aprimoramento das técnicas de criação. Entre essas técnicas, as estratégias de alimentação têm sido úteis para aumentar a eficiência no desempenho dos animais, menores custos de produção e menor impacto no ambiente. Entre as estratégias, a restrição alimentar por diferentes períodos, deve ser melhor estudada, por seus resultados promissores para a produção. Por se tratar de manejos que envolvem redução na ingestão de alimento e conseqüente alteração no status metabólico do animal, é importante se conhecer melhor a relação entre essas alterações e seu impacto no sistema imune e sistema antioxidante, ambos sistemas que envolvem mobilização e produção de energia. Com o objetivo de explorar essa abordagem, nós avaliamos o efeito de diferentes estratégias alimentares, envolvendo restrição alimentar longa (30 dias e 8 dias de realimentação) e curta (1 dia de restrição a cada 2 dias de alimentação) nas respostas imunes inatas e sistema antioxidante de juvenis de pacu, além de testar o efeito do L-glutamato, como possível antioxidante, durante os períodos de realimentação. Para isso avaliamos aspectos de mobilização e utilização de reservas energéticas pelo perfil de glicose sanguínea, glicogênio hepático, lipídio hepático, muscular e visceral, triglicerídeos, colesterol e glicerol sanguíneos; a estrutura do epitélio intestinal (células caliciformes, altura das vilosidades e infiltração de leucócitos); quantificação do perfil da lisozima sérica e atividade respiratória dos leucócitos; atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase hepáticas e intestinais. Além dos indicadores bioquímicos, avaliamos aspectos zootécnicos como crescimento e aproveitamento do alimento. Os resultados, apresentados no capítulo 2 desta tese, nos permitem concluir que ciclos curto e longo de restrição alimentar apresentam mudanças em respostas metabólicas, imunológicas, enzimas do sistema antioxidante, histológico e crescimento, e após realimentação houve reversão dessas alterações.

Palavras-chave: dano oxidativo, metabolismo, restrição alimentar, sistema antioxidante, imunidade.

ABSTRACT The present thesis addresses the effects of fasting and food refeeding on the dynamics of energy metabolism and the innate immunity and antioxidant system of pacu. The interest in the theme is due to the fact that the production of fish has been gaining importance in the world, with the intensification of production systems that require the improvement of breeding techniques. Among these techniques, feeding protocols have been useful to promote efficiency in animal performance, lower production costs and less impact on the environment. Among the protocols, food restriction for different periods, should be better studied, due to its promising results for production. As these are managements that involve a reduction in food intake and a consequent change in the animal's metabolic status, it is important to better understand the relationship between these changes and their impact on the immune system and antioxidant system, both systems that involve mobilization and energy production. In order to explore this approach, we evaluated the effect of different dietary protocols, involving long (15 days and 30 days / one week feed) and short (one day of restriction every two days feeding) food restriction on innate immune responses and antioxidant system of pacu juveniles, in addition to testing the effect of L-glutamate, as a possible antioxidant, during refeeding periods. For this, we evaluated aspects of mobilization and use of energy reserves by the blood glucose profile, hepatic glycogen, hepatic, muscular and visceral lipids, triglycerides, cholesterol and blood glycerol; the structure of the intestinal epithelium (goblet cells, villus height and leukocyte infiltration); quantification of the serum lysozyme profile and respiratory activity leukocyte; activity of the liver and intestinal superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase enzymes. In addition to biochemical indicators, we evaluate zotechnical aspects such as growth and use of food. The results, presented in chapter 2, show that the short and long cycles of food restriction modify the metabolic, immunological responses, enzymes of the antioxidant, histological and growth system, and after the feedback after the reversal of these changes.

Keywords: oxidative damage, intermediate metabolism, food deprivation, antioxidant, innate immune system

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução e justificativa

A aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce no Brasil e no mundo, responsável pela produção de importante fonte de proteínas para o consumo humano. Avanços tecnológicos recentes têm contribuído para superar gargalos da cadeia de produção de cultivo de peixes no Brasil, elevando a produção, estimada para 3,7 milhões de toneladas em 2025 (FAO, 2016). A produção de peixes de cultivo no Brasil, em 2018, totalizou 722.560 toneladas com crescimento de 4,5% em relação ao ano anterior (Anuário Peixe BR, 2019).

A disponibilidade de recursos hídricos, clima favorável, e a crescente demanda por pescado no mercado interno têm contribuído para alavancar a atividade no Brasil (Crepaldi et al., 2007). Contudo, essa elevada produção de peixe aumenta os problemas relacionados à criação intensiva (Urbinati e Carneiro, 2004).

A produção intensiva pode trazer prejuízos aos peixes devido às práticas de manejo adotadas. Por isso, estabelecer estratégias adequadas de manejo alimentar, com o uso de ciclos de jejum e realimentação, pode trazer algumas vantagens, entre elas, estimular o crescimento compensatório, reduzir custos de produção e efeitos negativos no meio ambiente, além de melhorar a eficácia da produção (Xiao et al., 2013; Urbinati et al., 2014).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) é um modelo biológico de interesse econômico e alvo de vários estudos (Urbinati et al., 2013), de comportamento alimentar onívoro, fato que lhe confere alta tolerância a carboidratos na dieta (Takahashi et al., 2018). Além disso, estudos têm mostrado que o pacu é um peixe que responde bem ao manejo alimentar que inclui restrição e realimentação (Souza et al., 2000; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2010; Gimbo et al., 2015; Favero et al., 2018).

Durante a restrição alimentar, o organismo do peixe aciona mecanismos de conservação e mobilização de energia para preservar as funções vitais (Souza et al., 2000; Favero et al., 2018; Li et al., 2018). A alteração na dinâmica metabólica pode afetar dois importantes sistemas biológicos bastante dependentes da homeostase energética que são o sistema imune e o sistema antioxidante. A defesa imunológica é um processo energeticamente caro. A produção e maturação de células imunes,

bem como a síntese e ativação de componentes humorais, tais como proteínas do sistema imune inato e adquirido são processos que utilizam muita energia (Derting e Compton, 2003; Magnottir, 2006; Gimbo et al., 2015). Por outro lado, o balanço redox celular é preservado por um sistema antioxidante que mantém o estado reduzido da entrada constante de energia metabólica, atuando na redução do estresse oxidativo celular (Genestra, 2007).

Neste estudo, investigamos a associação entre o sistema imune inato e o sistema antioxidante/estresse oxidativo e a dinâmica metabólica durante a restrição alimentar e a realimentação, bem como o uso de um agente antioxidante, o ácido glutâmico (L-GLU), que pode minimizar possíveis efeitos deletérios do estresse oxidativo, como forma de se estabelecer manejos preventivos.

5. Conclusões

De modo geral, nossos resultados sugerem que houve mobilização de energia durante as estratégias testadas e os sistemas imune e antioxidante se ajustaram às mudanças metabólicas, além de não haver prejuízo para o crescimento dos peixes. As mudanças parecem ser adaptações a fim de economizar energia ao longo de 30 dias, ao mesmo tempo que outros mecanismos de defesa imunológica foram acionados.

- Durante ciclos curto e longo de restrição alimentar, os peixes perderam peso corporal e mobilizaram triglicerídeos circulantes e os estoques de glicogênio hepático, que recuperaram após realimentação. A realimentação permitiu processo compensatório de crescimento, melhor conversão alimentar e o intenso uso de energia nesta fase foi apoiada pela lipólise muscular.

- O indicador do sistema imune inato, atividade respiratória dos leucócitos, foi reduzida após 15 dias de restrição total de alimento acompanhando a redução da disponibilidade de energia (glicemia e glicogênio hepático), mas a proteção na mucosa intestinal aumentou, aos 15 e 30 dias, pela migração de células de defesa no tecido.

- As respostas das enzimas do sistema antioxidantes responderam diferentemente à intensidade e tempo de restrição alimentar e tecido. A atividade da SOD diminuiu aos 15 dias, na condição de restrição moderada, em ambos os tecidos, enquanto a CAT aumentou no fígado aos 15 dias e diminuiu aos 30 dias. A realimentação reverteu as alterações.

- A dieta suplementada com L-GLU melhorou a CA nos peixes que passaram por restrição alimentar moderada, após 30 dias e piorou quando estes passaram a receber alimento diariamente.

- A dieta suplementada com L-GLU diminuiu o infiltrado leucocitário e o número de células caliciformes após 15 dias de restrição moderada, sugerindo menor necessidade de mobilização de defesa imunológica.

6. Referências Bibliográficas

Adakli A, Taşbozan O (2015). The Effects of Different Cycles of Starvation and Refeeding on Growth and Body Composition on European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 15:419-427.

Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries* 4, 147-190.

Anderson DP, Siwicki AK (1995) **Basic haematology and serology for fish health programs**. In Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health Section. Manila: Asian Fisheries Society. p. 185-202.

Antonopoulou E, Kentepozidou E, Feidantsis K, Rofidou C, Despoti D, Chatzifotis S (2013) Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry Physiology Part A** 165:79–88.

Baeverfjord G, Krogdahl A (1996) Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. **Journal of Fish Diseases** 19:375–387.

Bar N (2014). Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 71:1-12.

Barcellos LJG, Marquezine A, Trapp M, Quevedo RM, Ferreira, D (2010) The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture** 300:23-236.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.

Bayir A, Sirkecioglu AN, Bayir M, Haliloglu HI, Kocaman EM, Aras NM (2011) Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: oxidative stress and antioxidant defenses. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 159:191–196.

Beutler E, Duran O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. p. 861-882.

Beutler E (1975) **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton.

Biller-Takahashi JD, Takahashi, LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology** 73:425-429.

Blachier F, Boutry C, Bos C, Tomé D (2009) Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. **American Journal of Clinical Nutrition** 90:814–821.

Caballero M, Izquierdo M, Kjorsvik E, Montero D, Socorro J, Fernández A, Rosenlund G (2003) Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. **Aquaculture** 225:325-340.

Caballero-Solares A, Viegas I, Salgado MC, Siles AM, Sáez A, Metón I, Baanante IV, Fernández F (2015) Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture** 444:79–87.

Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Mancari F, Genovese L, Maricchiolo G (2011) 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*) **Marine Environmental Research** 72:46-52.

Caruso M, Sheridan MA (2011) New insights into the signaling system and function of insulin in fish. **General and Comparative Endocrinology** 173:227–247.

Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Genovese I, Mancari F, Maricchiolo G (2012) Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. **Marine Environmental Research** 81:18-25.

Castillo ASC (2016) **Efeito do β -glucano dietético na dinâmica metabólica, na resposta imunológica inata e no desempenho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após ciclos curtos de jejum e realimentação.** 93f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – CAUNESP, Unesp- Jaboticabal.

Costas B, Aragão C, Ruiz-Jarabo L, Vargas-Charcoff L, Arjona FJ, Dinis MT, Mancera JM, Conceição LEC (2011) Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. **Fish Physiology and Biochemistry** 37:495-504.

Dar SA, Srivasta PP, Varghesea T, Gupta S, Gireesh-Babub P, Krishna G (2018) Effects of starvation and refeeding on expression of ghrelin and leptin gene with variations in metabolic parameters in Labeo rohita fingerlings. **Aquaculture** 484:219-227.

Dash S, Das SK, Samal J, Thatoi HN (2018) Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. **Iranian Journal of Veterinary Research** 19:72-81.

Davis KB e Gaylord TG (2011) Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 158:30-36.

Demers NE, Bayne CJ (1997) The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental and Comparative Immunology** 21:363-373.

Dimitroglou A, Merrifield DI, Spring P, Sweetman J, Moate R, Davies SJ (2010) Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture** 300:182-188.

Di Sebastiano KM, Bell KE, Barnes T, Weeraratne A, Premji T, Mourtzakis M (2013) Glutamate supplementation is associated with improved glucose metabolism following carbohydrate ingestion in healthy males. **British Journal of Nutrition** 110:2165–2172.

Domenechini C, Radaelli G, Bosi G, Arrighi S, Di Giancamillo A, Pazzaglia M, Mascarello F (2002) Morphological and histochemical differences in the structure of the alimentary canal in feeding and runt (feed deprived) white sturgeons (*Acipenser transmontanus*). **Journal of Applied Ichthyology** 18:341–346.

Faria CFP (2017) **Estresse e modulação do Sistema antioxidativo pelo glutamate dietético em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 75f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Caunesp, Unesp – Jaboticabal.

Favero GC, Gimbo RY, Montoya LNF, Zanuzzo FS, Urbinati EC (2018) Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Research** 49:359-366.

Fishelson L (2006) Cytomorphological Alterations of the Thymus, Spleen, Head-Kidney, and Liver in Cardinal Fish (Apogonidae, Teleostei) as Bioindicators of Stress. **Journal of Morphology** 267:57–69.

Furné M, Sanz A, García-Gallego M, Hidalgo MC, Domezain A, Domezain J, Morales AE (2009) Metabolic organization of the sturgeon acipenser naccarii: a comparative study with rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** 289:161-166.

Furné M, Morales AE, Trenzado CE, García-A-Gallego M, Carmen HM, Domezain A et al (2012) The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology B** 182:63-76.

Ferguson RMW, Merrifield DL, Harper GM, Rawling MD, Mustafa S, Picchiatti S, Balcázar JL, Davies SJ (2010) The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Microbiology** 109:851–862.

Figueiredo-Silva AC, Corraze G, Kaushik S, Peleteiro JB, Valente LMP (2010) Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. **Amino Acids** 39:1401–1416.

Frings CS, Fendly TW, Dunn RT e Quenn CA (1972) Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. **Clinical Chemistry** 18:673-674.

Galjaard H, Duuren M, Van e Giesen J (1970) A quantitative histochemical study of intestinal mucosa after X-irradiation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 18:291.

Gaylord TG, Gatlin DM (2001) Growth performance, body composition and plasma thyroid hormone status of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to short-term feed deprivation and refeeding. **Fish Physiology Biochemistry** 24:73–79.

Gaucher L, Vidal N, D'Anatro A, Naya DE (2012) Digestive flexibility during fasting in the characid fish *Hyphessobrycon luetkenii*. **Journal of Morphology** 273:49-56.

Georgopoulou U e Vernier JM (1986) Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. **Developmental and Comparative Immunology** 10:529–537.

Gomez D, Sunyer JO, Salinas L (2013) The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish and Shellfish Immunology** 35:1729-1739.

Guarner, F (2006) Enteric flora in health and disease. **Digestion** 73:5-12.

Gimbo RY, Fávero GC, Franco Montoya LN, Urbinati, EC (2015) Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish and Shellfish Immunology** 43:295-300.

Guderley H, Lapointe D, Bedard M, Dutil JD (2003). Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 135:347-356.

Gune IEF, Burcea A, Popa GO, Dudu A, Georgescu SE, Balaş M, Dinescu S, Voicu S, Grecu I, Dediu L, Dinischiotu A, Costache M (2019) Effects of starvation and refeeding on growth performance and stress defense mechanisms of stellate sturgeon *Acipenser stellatus* juveniles from aquaculture. **Acta Biochimica Polonica** 66:47–59.

Gundersen HJG (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **Journal of Microscopy** 111:219-223.

Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, De la Rosa EJ, De Pablo F (2006) Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. **Diabetologia** 49:1142–1150.

Hidalgo MC, Morales AE, Arizcun M, Abellán E, Cardenete G (2017) Regional asymmetry of metabolic and antioxidant profile in the sciaenid fish shi drum (*Umbrina cirrosa*) white muscle. Response to starvation and refeeding. **Redox Biology** 11:682-687.

Hung SSO, Liu W, Li H, Storebakken T, Cui Y (1997) Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. **Aquaculture** 151:357-363.

Jafari N, Falahatkar B, Sajjadi MM (2018) Growth performance and plasma metabolites in juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) subjected to various feeding strategies at different sizes. **Fish Physiology and Biochemistry** 44:1363–1374.

Jiang J, Shi D, Zhou X-Q, Yin L, Feng L, Liu Y, Jiang WD, Zhao Y (2015) Effects of glutamate on growth, antioxidant capacity, and antioxidant-related signaling molecule expression. in primary cultures of fish enterocytes. **Fish Physiology and Biochemistry** 41:1143-53.

Karataş T (2018) Effect of Short-Term Starvation on Serum Metabolites, Antioxidant Enzymes and Endogenous Reserves of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Pakistan Journal of Zoology** 50:1723-1729.

Kim JH, Jeong MH, Jun JC, Kim T (2014) Changes in Hematological, Biochemical and Non-specific Immune Parameters of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Following Starvation **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 27:1360-1367.

Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology** 134:337–347.

Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G (2007) **Amino acids and immune function. British Journal of Nutrition** 98:237-252.

Li H, Xu W, Jin J, Yang Y, Zhu X, Han D, Liu H, Xie, S (2018) Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III) **Aquaculture** 496:166–175.

Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? **Oikos** 88:87-98.

López-López E, Sedeño-Díaz, JE, Soto C, Favari L (2011) Responses of antioxidantenzymes, lipid peroxidation and Na⁺/K⁺-ATPase in liver of the fish *Goodea atrip-innis* exposed to Lake Yuriria water. **Fish Physiology and Biochemistry** 37:511-522.

Mello H, Moraes JRE, Niza IG, Moraes FR, Ozório ROA, Shimada MT, Engracia Filho JR, Claudiano GS (2013) Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33:724-730.

Mccord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal of Biology and Chemistry** 244:6049-6055.

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

Morales AE, Pérez-Jiménez A, Carmen Hidalgo M, Abellán E, Cardenete G (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 139:153–161.

Navarro I, Gutierrez J. (1995). Fasting and starvation. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes** 4:394–434.

Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC and Curi R (2003) Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function** 21:1-9.

Oehme M, Grammes F, Takle H, Zambonino-Infante JL, Refstie S, Thomassen MS, Rørvik KA, Terjesen BF (2010) Dietary supplementation of glutamate and arginine to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) increases growth during the first autumn in sea. **Aquaculture** 310:156–163.

Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, Lopez-Barea J, Peinado J. (2003) Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). **Chemico-Biological Interactions** 145:191-199.

Peres H, Santos S, Oliva-Teles A (2014) Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish Physiology and Biochemistry** 40:1339-1347.

Pérez-Jiménez A, Guedes MJ, Morales AE, Oliva-Teles A (2007) Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture** 265:325-335.

Pérez-Jiménez A, Cardenete G, Hidalgo MC, García-Alcázar A, Abellán E, Morales AE (2012) Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. **Fish Physiology and Biochemistry** 38:1145-1157.

Perez J, Gutiérrez J, Carrillo M, Zanuy S, Fernandez J (1989) Effects of a single dose of bonito insulin on sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **General and Comparative Endocrinology** 74:245.

Perry SF, Walsh PJ, Mommsen TP, Moon TW (1988) Metabolic consequences of hypercapnia in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: β -adrenergic effects. **General and Comparative Endocrinology** 69:439-447.

Picchietti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, Carnevali O, Cresci A, Abelli L (2007) Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish and Shellfish Immunology** 22:57–67.

Ranzani-Paiva MJT e Tavares-Dias M (2002) Eritrograma, relação viscerossomática, hepatossomática e esplenossomática em tainhas *Mugil platanus* (Osteichthyes: Mugilidae) parasitadas. **Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba** 19:807-818.

Reigh RC, Williams MB, Jacob BJ (2006) Influence of repetitive periods of fasting and satiation feeding on growth and production characteristics of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture** 254:506–516.

Rios FS, Carvalho C, Pinheiro G, Donatti L, Fernandes M, Rantin F (2011) Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). **Environmental Biology of Fishes** 91:87-94.

Rossi A, Cazenavea J, Bacchettaa C, Campanaa M, Parma MJ (2015) Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) during starvation. **Ecological Indicators** 56:161–170.

Secor SM, Carey HV (2016) Integrative physiology of fasting. **Comprehensive Physiology** 6:773-825.

Schieber M, Chandel RS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology** 24:453-462.

Sheridan MA (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B** 90:679–690.

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

Silva WS, Hisanob H, Mattioli CC, Torresa IFA, Paes-Lemea FD, Luza RK (2019) Effects of cyclical short-term fasting and refeeding on juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. **Aquaculture** 505:12-17.

Souza VL, Oliveira EG, Urbinati EC (2000) Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics** 15:371–379.

Souza VL, Urbinati EC, Martins MIEG, Silva PC (2003) Avaliação do custo da alimentação e do crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32:19-28.

Takahashi LS, Biller JD, Criscuolo-Urbinati E, Urbinati EC (2010) Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 95:259-266.

Tamadoni R, Bahabadi MN, Morshedi V, Bagheri D, Mozanzadeh MT (2020) Effect of short-term fasting and re-feeding on growth, digestive enzyme activities and antioxidant defence in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782). **Aquaculture Research** 00:1-9.

Torres MCI, Soares NFF, Maia JF (2004) Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciências e Tecnologia. Alimentos** 24:243-248.

Urbinati EC, Zanuzzo FS, Biller-Takahashi JD (2014) **Estresse e sistema imune em peixes**. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, p.87-105.

Varju M, Müller T, Bokor Z, Zarski D, Mézes M, Balogh K (2018) The effects of excessive starvation on antioxidant defence and lipid peroxidation in intensively reared, commercial-size pikeperch (*Sander lucioperca* L.) **Egyptian Journal of Aquatic Research** 44:349-352.

Zanuzzo FS, Urbinati EC, Rise ML, Hall JR, Nash AK (2015) Gamperl *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture** 425:1-9.

Zhao Y, Hu Y, Zhou ZQ, Zeng XY, Feng F, Liu Y, Jiang WD, Li SH, Li DB, Wu XQ, Wu CM, Jiang J (2015) Effects of dietary glutamate supplementation on growth performance, digestive enzyme activities and antioxidant capacity in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture Nutrition** 21:935–941.

Zeng LQ, Li FJ, Li XM, Cao ZD, Fu SJ, Zhang YG (2012) The effect of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 162:200-211.

Wilson JM, Castro LFC (2011) Morphology diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: Crossel M, Farrell AP, Braner CJ (Ed.). **Fish Physiology: the multifunctional gut of fish**. London: Elsevier p. 2-56.

Yang S, He K, Yan T, Wu H, Zhou J, Zhao L, Wang Y, Gong Q (2019) Effect of starvation and refeeding on oxidative stress and antioxidant defenses in Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*). **Fish Physiology and Biochemistry** 45:987-995.