

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE GLUTAMINA NO
DESEMPENHO PRODUTIVO, MORFOLOGIA INTESTINAL,
RESPOSTAS HEMÁTICAS, ENZIMÁTICAS E IMUNOLÓGICAS DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO

PEDRO LUIZ PUCCI FIGUEIREDO DE CARVALHO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Maio de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE GLUTAMINA NO
DESEMPENHO PRODUTIVO, MORFOLOGIA INTESTINAL,
RESPOSTAS HEMÁTICAS, ENZIMÁTICAS E IMUNOLÓGICAS DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO

PEDRO LUIZ PUCCI FIGUEIREDO DE CARVALHO

Zootecnista

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Margarida Maria Barros

CO-ORIENTADOR: Prof^o Dr^o Wilson Massamitu

Furuya

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Maio de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de.

Suplementação dietética de glutamina no desempenho produtivo, morfologia intestinal, respostas hemáticas, enzimáticas e imunológicas da tilápia-do-nilo submetida a desafio bacteriano / Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Margarida Maria Barros

Coorientador: Wilson Massamitu Furuya

Capes: 50400002

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Glutamina. 3. Aeromonas.
4. Suplementos dietéticos. 5. Peixes - Nutrição.

Palavras-chave: Aeromonas hydrophila; Desafio bacteriano; Glutamina; Nutrição e saúde de peixes; Oreochromis niloticus.

Dedicatória

Aos meus pais

Robson Luiz Figueiredo de Carvalho

Marisa Pucci de Carvalho

Pelos exemplos de vida e caráter

Amo muito vocês

Ao meu irmão

Bruno Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho

Pelo carinho, amizade e amor que sempre nos uniu

Amo você

A minha noiva

Leticia Rocha Inamassu

Por ser tudo o que eu esperava de uma companheira para a vida toda

Te amo

Agradecimentos

À professora Assíst. Dra. Margarida Maria Barros, pela orientação, exemplos de dedicação, seriedade, compromisso com a pesquisa, valiosos ensinamentos dentro da sala de aula e para a vida, e, principalmente, pela preocupação com a minha formação. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pelo estímulo e amor à pesquisa, confiança, sensibilidade, grande amizade e principalmente pelo exemplo de humildade e caráter, características muito raras numa só pessoa.

Ao professor Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela co-orientação, amizade, comprometimento, além das sugestões e auxílio nas análises aminoacídicas, imprescindíveis para realização desse estudo.

To Professor Delbert M. Gatlin III, thank you for receiving me so kindly at your lab, for all the support, suggestions and of course, for the boots! Thank you for the opportunity to make my US-dream come true.

Ao professor Delbert M. Gatlin III, muito obrigado por me receber tão gentilmente em seu laboratório, por todo apoio, sugestões e é claro, pelas botas! Obrigado pela oportunidade de tornar meu sonho de estágio nos Estados Unidos realidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão das bolsas de estudos (2014/01973-5 e BEPE 2015/23777-6) e recursos financeiros para a realização dos experimentos.

À empresa Ajinomoto do Brasil, pelo fornecimento do ingrediente-teste, sugestões e análises de aminoácidos das dietas, muito obrigado.

À todos meus familiares, em especial, aos meus avós Teresa Figueiredo de Carvalho, Lídia Pucci e Renato Pucci.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, por tornar esse sonho possível.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes - AquaNutri: Ademir Calvo Fernandes Jr. (Dema), Caroline Pelegrina Teixeira (Xérols), Eric Portilho de Araújo, Felipe Tenório Cintra, Flávia Mota Damasceno, Guilherme Sassi (Talarico), Hinglidj Muller, Igor Símoes Tiagua Vicente, João Fernando Albers Koch (Johnny), Juliana Mara Costa, Rafael Fogaça Naliato, Rafael de Almeida (Portuguinha), Rarael Lopes da Silva, Renan Mattos Botelho (Pepe), Renie Venn Chan (China), sempre dispostos a ajudar e dividir conhecimentos.

To my dear friends Fernando Yugo Yamamoto, Mariana Michelatto, Yu Kawakami, Waldemar Rossi, Alejandro Velásquez, Sergio Castillo, Min Ju (Zena), Clement Cruz, Brittany Peachey, Alton Burns, Yufan Zhang (Little T), Brian Ray, Dr. Jiang, João Gatto B. Luna and all the colleagues that made my experience at Texas A&M University amazing.

Aos meus queridos amigos Fernando Yugo Yamamoto, Mariana Michelatto, Yu Kawakami, Waldemar Rossi, Alejandro Velásquez, Sergio Castillo, Min Ju (Zena), Clement Cruz, Brittany Peachey, Alton Burns, Yufan Zhang (Little T), Brian Ray, Dr. Jiang, João Gatto B. Luna e a todos os colegas que fizeram da minha experiência na Texas A&M University incrível.

*Agradecimento especial aos meus amigos Fernando Yugo Yamamoto e Mariana Michellato, pelo auxílio nas análises *in vitro* e em basicamente tudo que precisei durante meu estágio no exterior. Sem vocês eu estaria perdido, muito obrigado por tudo, de verdade.*

À todos os estagiários que passaram pelo Laboratório, ensinei e aprendi com eles.

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia, em especial à Gisele, pelo auxílio e carinho.

À professora Maria Márcia Pereira Sartori, pelo carinho, atenção e auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores da banca de qualificação, Margarida Maria Barros, Luiz Edivaldo Pezzato e Ricardo de Oliveira Orsi e, pelas valiosas críticas e sugestões ao trabalho.

À professora Moníca Rosolem, muito obrigado pelos ensinamentos, carinho e amizade.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp - Botucatu, em especial para Seila C. C. Vieira, Ellen Cassemiro Guilhen, Cláudia Cristina Moreci e Carlos Pazini Junior, pela dedicação e incontáveis auxílios prestados.

Aos moradores, agregados e IRMÃOS das repúblicas H.Romeu, H.Ro.frango e Turma da Sujeira: Johnny, Bahia, Calvinator, Dema, Cauê, Purê, Gilda, Kuririn, Ed, Panela, Betão, Sífodo, Candango, Cocs, Xucrão, Morma, Mimi, Saíyd, Kíwi, Pão, Dhal e Matis, pela amizade, alegria, companheirismo e bons momentos compartilhados.

Aos amigos de Louveira: Pato, Draga, Harry, Max, Nerds, Mini, Xicão, Cabeça, Vinagrão e Saku, sempre presentes apesar da distância, trazendo palavras de incentivo em minha jornada acadêmica e pessoal.

Agradeço à todos que de maneira direta ou indireta colaboraram para a realização desse trabalho, muito obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1.1. <i>Aminoácidos: classificação e funções</i>	2
1.2. <i>Glutamina</i>	4
1.3. <i>Glutamina na nutrição e saúde de peixes</i>	7
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO II.....	17
GLUTAMINE SUPPLEMENTATION OF CULTURE MEDIA FOR NILE TILAPIA IMMUNE CELLS.....	17
1. INTRODUCTION.....	19
2. MATERIAL AND METHODS.....	21
2.1. <i>Fish</i>	21
2.2. <i>Culture media</i>	21
2.4. <i>Respiratory Burst</i>	22
2.5. <i>Phagocytosis assay</i>	22
2.6. <i>Bactericidal assay</i>	23
2.7. <i>Lymphocyte primary culture</i>	24
2.8. <i>Proliferation assay</i>	24
2.9. <i>Statistical analysis</i>	25
3. RESULTS.....	25
3.1. <i>Respiratory Burst</i>	25
3.2. <i>Phagocytosis Assays</i>	25
3.3. <i>Bactericidal Activity</i>	26
3.4. <i>Cell Proliferation Assays</i>	26
4. DISCUSSION.....	26
5. REFERENCES.....	30
6. TABLES.....	35
Table 1. Respiratory burst activity and killing capacity of head kidney (HK)- derived leukocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemental levels of glutamine (Gln).	35

Table 2. Phagocytic capacity of Nile tilapia head kidney (HK)-derived leukocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemental levels of glutamine (Gln).....	35
Table 3. Proliferation capacity upon non-specific stimulation of head kidney (HK)-leukocytes and peripheral PB-Lymphocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemented levels of glutamine (Gln).....	36
CAPÍTULO III.....	37
SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE GLUTAMINA NO DESEMPENHO PRODUTIVO, MORFOLOGIA INTESTINAL, RESPOSTAS HEMÁTICAS, ENZIMÁTICAS E IMUNOLÓGICAS DA TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO	37
1. INTRODUÇÃO	40
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. <i>Instalações (Estudo I)</i>	42
3.2. <i>Dietas Experimentais (Estudos I e II)</i>	43
3.3. <i>Desempenho Produtivo (Estudo I)</i>	43
3.4. <i>Desafio Bacteriano (Estudo II)</i>	44
3.5. <i>Análises químico-bromatológicas (Estudo I)</i>	45
3.6. <i>Morfometria Intestinal (Estudo I)</i>	45
3.7. <i>Análises hematológicas (Estudos I e II)</i>	46
3.8. <i>Enzimas antioxidantes dos tecidos epitelial e hepático (Estudo I)</i>	47
3.9. <i>Análises imunológicas (Estudos I e II)</i>	48
3.10. <i>Análises estatísticas</i>	50
4. RESULTADOS.....	50
4.1. <i>Desempenho produtivo</i>	50
4.2. <i>Morfometria intestinal e composição bromatológica corporal</i>	51
4.3. <i>Atividade antioxidante</i>	51
4.4. <i>Análises hematológicas</i>	52
4.5. <i>Análises imunológicas</i>	52
5. DISCUSSÃO	52
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. TABELAS E FIGURAS	64
Tabela 1. Formulação (%) e composição analisada das dietas experimentais.....	64
Tabela 2. Perfil de aminoácidos totais e glutamina livre das dietas experimentais. 65	

Tabela 3. Peso médio inicial (PI), peso médio final (PF), ganho de peso médio (GP), consumo médio de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (S) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias ¹	66
Tabela 4. Peso relativo do intestino (PRI), comprimento relativo do intestino (CRI), índice hepato-somático (IHS) e índice víscero-somático (IVS) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias ¹	67
Tabela 5. Morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias ¹	68
Tabela 6. Valores de matéria original (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) corporal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias ¹	69
Tabela 7. Atividade antioxidante no intestino e fígado de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias ¹	70
Tabela 9. Volume corpuscular média (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por <i>Aeromonas hydrophila</i> ¹	72
Tabela 10. Proteína plasmática total (PPT), Albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por <i>Aeromonas hydrophila</i> ¹	73
Tabela 11. Atividade sérica de lisozima e produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por monócitos de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por <i>Aeromonas hydrophila</i> ¹	74
Figura 1. Dispersão e equação de regressão polinomial para ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) em função da suplementação de glutamina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo.	75
CAPÍTULO IV.....	76
IMPLICAÇÕES	76

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. Aminoácidos: *classificação e funções*

As proteínas e seus blocos estruturais, os aminoácidos (AA), são compostos orgânicos presentes em todos os organismos vivos. Os AA podem se ligar, por meio de ligação peptídica covalente entre o grupo carboxiterminal de um aminoácido e o grupo aminoterminal do outro (BRODY, 1999). Um número qualquer de AA pode se ligar dessa forma, formando cadeias peptídicas. Uma molécula composta por dois AA é chamada dipeptídeo. Já os polipeptídeos são aqueles que apresentam número de AA de 3 a 20 em sua composição. As cadeias peptídicas que compõe uma proteína são lineares e não possuem ramificações, de forma que cada proteína apresenta em média 300 aminoácidos (BRODY, 1999). Cadeias peptídicas são ligadas por pontes de dissulfeto, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, que resultam na formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias de proteínas (BUXBAUM, 2007).

Cada AA possui uma cadeia lateral distinta, que determina suas propriedades químicas. Dessa forma, o arranjo de AA em diferentes combinações e sequências dá origem a proteínas com propriedades e atividades diferentes. Assim, a partir desses blocos formadores, os organismos podem sintetizar enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos, antibióticos, venenos, e uma infinidade de outras substâncias, cada uma delas apresentando atividades biológicas características (LEHNINGER, 2008).

Vinte AA primários são utilizados por células para a biossíntese de proteínas. Além dos AA primários encontrados nas proteínas, existe grande número de outros AA formados por modificações pós-translacionais. Essas modificações são essenciais para determinar funções e para regular a atividade de proteínas, por exemplo (NRC, 2011). A maioria dos microrganismos e plantas conseguem biossintetizar os 20 AA primários, enquanto os animais devem obter parte destes da dieta.

Em função das necessidades da dieta para o balanço de nitrogênio ou crescimento, AA são tradicionalmente classificados como essenciais (AAE), não essenciais (AANE) e condicionalmente essenciais (ACE), tanto para humanos quanto para animais (WU, 2009). Os AA essenciais (EAA) são definidos como aqueles cujo esqueleto de carbono não pode ser sintetizado ou não são adequadamente sintetizados *de novo* em relação às necessidades, devendo ser fornecidos por meio da dieta para satisfazer exigências.

Aminoácidos condicionalmente essenciais são aqueles que podem ser sintetizados em quantidades adequadas pelo organismo em condições normais, mas que devem ser fornecidos por meio da dieta para satisfazer as necessidades ótimas em determinadas condições em que as taxas de utilização são maiores do que as taxas de síntese. No entanto, as necessidades funcionais (reprodução, prevenção de doenças, etc), também devem ser critério de classificação de AAE ou condicionalmente essenciais. Os AANE são aqueles que podem ser sintetizados *de novo* por meio de precursores produzindo quantidades adequadas para satisfazer exigências ideais, não havendo necessidade de suplementação por meio da dieta. Deve ser considerado que os 20 AA primários e seus metabólitos são necessários para a fisiologia normal das células e suas funções (EL IDRISSE, 2008; LUPI et al., 2008; NOVELLI e TASKER, 2008; PHANG et al., 2008).

O metabolismo anormal de um AA prejudica a homeostase, assim como o crescimento e desenvolvimento podendo até causar a morte (ORLANDO et al., 2008; WILLIS et al., 2008; WU et al., 2004). Além de seu papel como “blocos de construção” das proteínas e polipeptídeos, alguns AA são importantes reguladores de vias metabólicas que são necessárias para a manutenção, crescimento, reprodução e imunidade nos organismos, maximizando a eficiência de utilização dos alimentos, aumentando a deposição de proteína, reduzindo a adiposidade e melhorando a higidez (SUENAGA et al., 2008; WU et al., 2007). Eles são chamados de AA funcionais, incluindo a arginina (Arg), cisteína (Cis), glutamina (Gln), leucina (Leu), prolina (Pro) e triptofano (Trp) (WU, 2009). Para organismos aquáticos, a classificação dos aminoácidos pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos aminoácidos para peixes

AA Essenciais	AA Não essenciais	AA Condicionalmente essenciais
Arginina	Alanina	Cisteína
Fenilalanina	Asparagina	Glutamina
Histidina	Aspartato	Hidroxiprolina
Isoleucina	Glutamato	Prolina
Leucina	Glicina	Taurina
Lisina	Serina	
Metionina	Tirosina	
Treonina		
Triptofano		
Valina		

(Adaptado de Li et al., 2009)

1.2. Glutamina

A glutamina (Gln) é abundante no plasma sanguíneo, músculo esquelético, fluidos fetais e no leite (WU e KNABE, 1994; NEWSHOLME e CALDER, 1997; SELF et al., 2004). Nos peixes, é um dos AA livres mais abundantes, tanto no plasma como no tecido muscular, enquanto o glutamato (Glu) e seus produtos descarboxilados (GABA) são neurotransmissores presentes em altas concentrações no cérebro (LI et al., 2009). A Gln é sintetizada pela glutamina sintetase (GS) citosólica em muitos tecidos, sendo degradada pela glutaminase (GA) mitocondrial e utilizada por outros tecidos que não são capazes de sintetizá-la (LABOW et al., 2001; KARINCH et al., 2001); sendo assim, o metabolismo da Gln é modulado pela GS e GA (LABOW et al., 2001.) (Fig. 1).

A Gln e o Glu são classificados como AANE para a maioria dos animais de produção; porém podem se tornar AACE devido à síntese endógena ser incapaz de satisfazer às exigências imediatas dos animais em determinadas circunstâncias, como situações de estresse, por exemplo. Desta forma, a Gln se destaca por ser precursora na síntese de purinas, nucleotídeos de pirimidina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e amino açúcares em todas as células (KREBS et al., 1980; D'MELLO et al., 2003; LI et al., 2009). Também é importante combustível para as células de rápida divisão incluindo linfócitos ativados e células do epitélio intestinal (KREBS et al., 1980; WINDMUELLER e SPAETH, 1980; WU et al., 1995c).

O trato gastrointestinal é um dos principais órgãos de consumo e utilização de glutamina e também o local onde ocorre sua conversão em outros aminoácidos

(WINDMUELLER e SPAETH, 1980). A Gln e o Glu são intercambiáveis como importante substrato para o sistema celular da mucosa (REEDS e BURRIN, 2001).

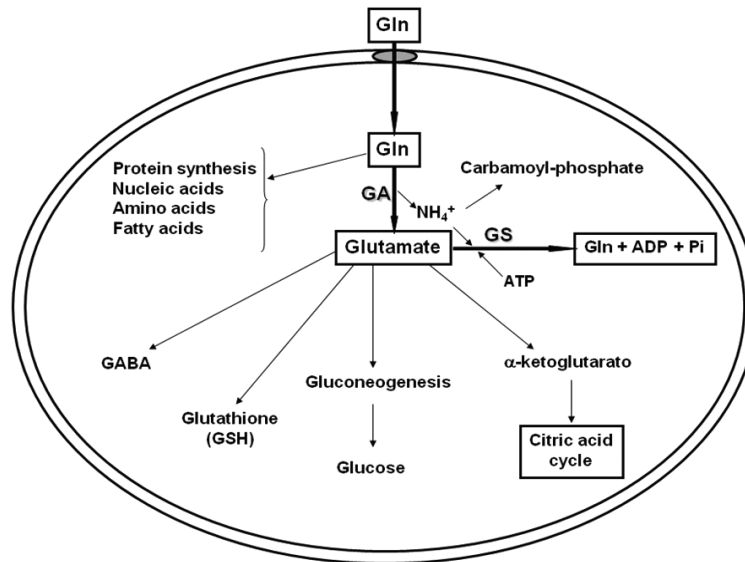


Fig. 1 - Metabolismo de glutamina (Gln). A glutamina é sintetizada pela ação da glutamina sintetase (GS) e degradada pela glutaminase mitocondrial (GA). A glutamina pode ser sintetizada pela maioria dos tecidos em glutamato e amônia. A amônia pode ser utilizada para sintetizar fosfato de carbamoil. O glutamato pode formar α -cetoglutarato, glicose no fígado e nos rins, glutathione na maioria das células e ácido gama-aminobutírico (GABA) nos neurônios.

A Gln tem função principalmente regulatória ao ativar uma série de genes associados com o ciclo de desenvolvimento das células da mucosa intestinal, de modo que a inibição da síntese desse AA prejudica, tanto a proliferação, quanto a diferenciação de culturas de células da mucosa (RHOADS et al., 1997; BLIKSLAGER et al., 1999; REEDS e BURRIN, 2001). Apresenta também importante função como precursora de n-acetilglucosamina e n-acetilgalactosamina, moléculas utilizadas na síntese de mucina, que garante a eficiência das junções de oclusão, estruturas que atuam como barreiras passivas de entrada bacteriana na mucosa intestinal (WU et al., 1995b).

A mucosa intestinal é constituída por inúmeros tipos celulares, cada qual com sua função específica. Dentre essas células, pode-se destacar as secretoras, imunes, neuroendócrinas, além dos inúmeros enterócitos absorptivos. Dessa forma, o intestino recebe estímulos do ambiente, nutricionais e antigênicos, atuando na triagem imunológica e na defesa, gerando também respostas endócrinas ao lúmen (BURRIN et al., 2000).

Durante os processos metabólicos, os organismos aeróbios produzem de forma contínua espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem ação oxidante. O desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, em favor das oxidantes, é chamado de estresse oxidativo (Sies, 1985). O estresse oxidativo pode afetar macromoléculas como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (Finkel e Holbrook, 2000). Dessa forma, mecanismos antioxidantes foram desenvolvidos para remoção ou neutralização do excesso de EROs. Esses mecanismos são constituídos por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), além de antioxidantes não-enzimáticos, tais como glutathiona (GSH), vitaminas E e C (WILHELM, 1996).

Como uma das principais fontes de Glu, a Gln regula a síntese de glutathiona, tripeptídeo crucial para proteger as células contra o estresse oxidativo (WU et al., 2004). Esse efeito pôde ser observado em estudo *in vitro* com células epiteliais isoladas de carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian), onde a suplementação de Gln se mostrou efetiva na proteção contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CHEN et al., 2009). O papel da Gln na síntese da glutathiona sugere que a disponibilidade deste nutriente pode ter efeito significativo sobre a regulação do estado redox celular (ZHU et al., 2011). Além disso, como precursor essencial para a síntese de purinas e nucleotídeos de pirimidina, a Gln é necessária para a proliferação de linfócitos (ARDAWI e NEWSHOLME, 1983; WU et al., 1992). O aumento das concentrações extracelulares de Gln de 0,01 para 0,50 mM (nível fisiológico no plasma) determinou aumento da proliferação de linfócitos de ratos quando estimulados por mitógenos *in vitro* (WU et al., 1992).

A Gln é essencial para a resposta imune nos peixes, pois atua como importante substrato energético para leucócitos e é modulador chave de citocinas atuando na produção de óxido nítrico (BUENTELLO e GATLIN, 1999; LI et al., 2007). Há evidências de que a Gln é necessária para a síntese de óxido nítrico em macrófagos e monócitos por meio da síntese de arginina. De fato, a arginina derivada da Gln, parece ser essencial para a atividade de macrófagos (MURPHY e NEWSHOLME, 1998). Mitógenos, alterações no volume celular, citosinas inflamatórias e o equilíbrio ácido-base são importantes reguladores do metabolismo da Gln em leucócitos (WU e FLYNN, 1995; NEWSHOLME et al., 2003). Por meio da amoniogênese renal, a Gln desempenha papel

importante na regulação do equilíbrio osmótico corporal (LI et al., 2009). Apesar de estimular a síntese de proteína muscular em mamíferos (WU et al. 2007), essa informação ainda não está confirmada para peixes.

1.3. Glutamina na nutrição e saúde de peixes

A suplementação dietética de Gln melhora o ganho de peso e a eficiência alimentar em diferentes espécies de mamíferos e aves. Nesses animais, a Gln não só impede a atrofia da mucosa intestinal, mas também promove o crescimento do intestino, aumenta o altura das vilosidades no duodeno e jejuno, além de exercer outros efeitos favoráveis (YI et al., 2001; KITT et al., 2002; YI et al., 2005; ZOU et al., 2006; BARTELL e BATAL, 2007; MURAKAMI et al., 2007; WANG et al., 2008; SOLTAN, 2009; WU et al., 2011). Efeitos similares como aumento nas taxas de ganho de peso, eficiência alimentar, peso intestinal, estruturas histológicas e/ou atividades de enzimas digestivas, também têm sido relatados em várias espécies de peixes. Yan e Qiu-Zhou (2006) avaliaram a suplementação de Gln no desempenho produtivo e características morfo-funcionais do intestino de juvenis de carpas (*Cyprinus carpio* var. Jian). Os autores observaram que peixes que consumiram a dieta com 1,2% de Gln apresentaram maior taxa de crescimento e maior desenvolvimento do intestino.

Em estudo *in vitro*, Jiang et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação de Gln e vitamina E no crescimento e capacidade antioxidante de enterócitos de carpa e concluíram que a Gln de fato contribuiu para o desenvolvimento das células intestinais porém apresentou efeitos limitados na capacidade antioxidante.

Silva et al. (2010) avaliaram os efeitos da suplementação da combinação de L-glutamina e L-glutamato em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo no desempenho produtivo, composição corporal, morfometria da mucosa intestinal, e amônia e ureia sanguíneas. A conclusão foi que a adição de 1,67% dos aminoácidos melhorou o ganho de peso e promoveu o desenvolvimento da mucosa intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo.

Associando arginina e Gln, Cheng et al. (2011) avaliaram o desempenho, resposta imune e a estrutura intestinal de red drum (*Sciaenopsis ocellatus*) e observaram melhor eficiência alimentar, maior desenvolvimento intestinal e melhor resposta imune em peixes que consumiram a dieta suplementada com esses aminoácidos. Porém, pesquisas ainda são necessárias para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais esses AA

regulam o crescimento e a resposta imunológica em peixes. Em outro estudo, Cheng et al. (2012) avaliaram o desempenho, resposta imune e morfologia intestinal de híbridos de striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) alimentados com dietas suplementadas com arginina e glutamina. Os resultados desse estudo foram semelhantes aos do estudo anterior, de forma que observaram melhora no desempenho produtivo e resposta imune inespecífica, assim como melhor desenvolvimento do intestino.

Em estudo com o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), Pohlenz et al. (2012) avaliaram os efeitos da suplementação de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% de Gln sobre a morfologia intestinal, taxas de migração de enterócitos, perfil de aminoácidos plasmáticos e desempenho produtivo dessa espécie. Os níveis de inclusão de Gln não afetaram o perfil de AA no plasma e o desempenho produtivo dos peixes, por outro lado, peixes que receberam dietas com 2,0 e 3,0% de Gln apresentaram aumento nas taxas de migração de enterócitos e melhora nas características morfológicas do intestino.

Qiyou et al. (2011) observaram melhora no desempenho produtivo e digestão/absorção intestinal em juvenis de híbridos de esturjão (*Acipenser schrenckii* ♀ x *Huso dauricus* ♂) alimentados com dietas suplementadas com Alanyl-Glutamina e glutamina. Peixes que consumiram dietas com mais de 0,9% de glutamina e de 1,0% de Alanyl-Glutamina apresentaram maior taxa de ganho de peso, maior atividade das enzimas digestivas (protease, amilase, lipase e Na⁺, K⁺ - ATPase) e antioxidantes (GPx e SOD), além de aumento na altura de vilosidades intestinais. Zhu et al. (2011), trabalhando com híbridos de esturjão, observaram melhora significativa na atividade das enzimas GPx e SOD nos tecidos analisados (hepatopâncreas, músculo e soro), além de maiores níveis de glutathione na forma reduzida e menores níveis de malanoaldeídos. Houve ainda efeito positivo nas características imunológicas, como atividade da lisozima e do sistema complemento (C3 e C4) com a suplementação de 1% de alanyl-glutamina e níveis entre 0,9 e 1,2% de glutamina.

Caballero-Solares et al. (2015) avaliaram os efeitos da suplementação de Gln e Glu no desempenho produtivo, composição corporal e expressão de enzimas-chave no metabolismo hepático do gilthead seabream (*Sparus aurata*). Foi observado que a suplementação com glutamato determinou resposta positiva no metabolismo de glicose no fígado, o que poderia facilitar a substituição de proteínas por carboidratos em rações para peixes marinhos. Os resultados mostraram ainda que a glutamina parece ser

preferencialmente oxidada ao invés dos demais aminoácidos provenientes da quebra de proteínas, promovendo a retenção proteica.

Hu et al. (2015) conduziram estudo com juvenis de carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian) para avaliar os efeitos da suplementação de glutamina no desempenho produtivo, produção de citocinas, alvos da rapamicina (TOR), além de parâmetros do sistema antioxidante no baço e rim cefálico. A suplementação dietética de glutamina promoveu melhora nos parâmetros de desempenho produtivo e componentes do sistema de imunidade inespecífica, como atividade de lisozima e concentração de proteínas do sistema complemento C3 e C4. Além disso, promoveu a expressão de genes relacionados à produção de citocinas, atividade das TOR-quinases e das enzimas do sistema antioxidante.

Zhang et al. (2017) concluíram que a suplementação dietética de Gln e Arg não teve efeito positivo sobre o desempenho produtivo de juvenis de “turbot” (*Scophthalmus maximus* L.); porém melhorou significativamente a resposta imune não-específica. Por outro lado, Pereira et al. (2017) relataram que a suplementação dietética de Gln e Arg proporcionou melhora no ganho de peso e eficiência alimentar, bem como resultou em melhor taxa de retenção e deposição de proteínas em juvenis de tilápia-do-nilo. Os autores verificaram efeito sinérgico da suplementação desses aminoácidos no desempenho produtivo, porém efeitos limitados nas respostas imunológicas não-específicas como *burst* respiratório e atividade de lisozima sérica.

Além dos efeitos positivos da Gln no desempenho produtivo e capacidade antioxidante de juvenis de carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian), foi demonstrado por Li et al. (2017) que a suplementação desse aminoácido pode melhorar a integridade dos eritrócitos nos peixes. Os resultados mostraram ainda que os efeitos da Gln sobre os eritrócitos são parcialmente dependentes dos metabólitos produzidos a partir de sua quebra. A alanina, citrulina e prolina geradas a partir desse processo poderiam ter função antioxidante ou atuar na inibição da apoptose de eritrócitos em peixes.

Com base nos resultados apresentados, se torna claro o potencial de utilização da glutamina em dietas para peixes de diversas espécies. Entretanto, poucos estudos abordam a suplementação desse aminoácido em dietas para a tilápia-do-nilo. Essa espécie apresenta grande importância econômica no Brasil e no Mundo, o que fez com que

estudos relacionados a sua nutrição e saúde recebessem mais atenção nos últimos anos. Desse modo, foram realizados os estudos apresentados nos capítulos II e III.

O Capítulo II, intitulado “Glutamine supplementation of culture media for Nile tilapia immune cells” se apresenta de acordo com as normas para publicação do periódico *Fish and Shellfish Immunology* (Fator de impacto: 3.025). O objetivo específico desta pesquisa foi avaliar a capacidade imunomoduladora da glutamina por meio de estudos *in vitro* utilizando células do sistema imunológico da tilápia-do-nilo.

O Capítulo III, intitulado “Suplementação dietética de glutamina no desempenho produtivo, morfologia intestinal, respostas hemáticas, enzimáticas e imunológicas da tilápia-do-nilo submetida a desafio bacteriano” se apresenta de acordo com as normas para publicação do periódico *Aquaculture* (Fator de impacto: 1.893). Esta pesquisa teve por objetivo específico avaliar os efeitos da suplementação dietética de glutamina na nutrição e saúde de juvenis de tilápia-do-nilo submetidos ao desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v.212, p.835-842, 1983.
- BARTELL, S.M.; BATAL, A.B. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. **Poultry Science**, v.86, p.1940–1947, 2007.
- BLIKSLAGER, A.T.; RHOADS, J.M.; BRISTOL, D.G.; ROBERTS, M.C.; ARGENZIO, R.A. Glutamine and transforming growth factor-alpha stimulate extracellular regulated protein kinase and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. **Surgery**, v. 125, p.186-194, 1999.
- BROODY, T. **Nutritional Biochemistry: Classification of biological structure**. 2. ed, San Diego: Academic Press, 1999.
- BUENTELLO, J.A.; GATLIN III, D.M. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish *Ictalurus punctatus*: influence of dietary arginine and culture media. **Aquaculture**, v.179, p. 513–521, 1999.
- BURRIN, D.G.; STOLL, B.; JIANG, R.; CHANG, X.; HARTMANN, B.; HOLST, J.J.; GREELEY, G.H.; REEDS, P.J. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal pigs: how much is enough. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1603-1610, 2000.
- BUXBAUM, E. **Fundamentals of Protein Structure and Function**. New York: Springer, 2007.
- CABALLERO-SOLARES, A; VIEGAS, I.; SALGADO, M. C.; SILES, A. M.; SÁEZ, A.; METÓN, I.; BAANANTE, I. V.; FERNÁNDEZ, F. 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**, v.444, p.78–87, 2015.
- CHEN, J.; ZHOU, X. Q.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, J. Effects of glutamine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture**, v.288, p.285–289, 2009.

- CHENG, Z.; BUENTELLO, A.; GATLIN III, D.M. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, v.319, p.247–252, 2011.
- CHENG, Z.; GATLIN III, D.M.; BUENTELLO, A. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, v.43, p.362–363, 2012.
- D'MELLO, J.P.F. **Amino acids in animal nutrition**. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003.
- EL IDRISSE, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. **Amino Acids**, v.34, p.321–328, 2008.
- HU, K.; ZHANG, J. X.; FENG, L.; JIANG, W. D.; WU, P.; LIU, Y.; JIANG, J.; ZHOU, X.Q. Effect of dietary glutamine on growth performance, non-specific immunity, expression of cytokine genes, phosphorylation of target of rapamycin (TOR), and antioxidative system in spleen and head kidney of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 635-649, 2015.
- JIANG, J.; ZHENG, T.; ZHOU, X.Q.; LIU, Y.; FENG, L. Influence of glutamine and vitamin E on growth and antioxidant capacity of fish enterocytes. **Aquaculture Nutrition**, v.15, p.409–414, 2009.
- KARINCH, A.M.; PAN, M.; LIN, C.M.; STRANGE, R.; SOUBA, W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.2535–2538, 2001.
- KITT, S.J.; MILLER, P.S.; LEWIS, A.; FISCHER, R.L. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs. **Nebraska Swine Reports**. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, p.29–32, 2002.
- KREBS, H.A.; BAVEREL, G.; LUND, P. Effect of bicarbonate on glutamine metabolism. **International Journal of Biochemistry**, v.12, p.69–73, 1980.
- LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOWER, S.F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – Glutaminase and Glutaminase Synthetase. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.2467–2474, 2001.
- LI, P.; YIN, Y.L.; LI, D.F.; KIM, S.W.; WU, G. Amino acids and immune function. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 237–252, 2007.

- LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v.37, p.43–53, 2009.
- LI, H. T.; JIANG, W. D.; LIU, Y.; JIANG, J.; ZHANG, Y. A.; WU, P.; ZENG, Y.; ZHOU, X.; FENG, L. Dietary glutamine improves the function of erythrocytes through its metabolites in juvenile carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture**, in press, 2017.
- LUPI, A.; TENNI, R.; ROSSI, A. Human prolidase and prolidase deficiency. **Amino Acids**, v.35, p.739–752, 2008.
- MURAKAMI, A.E.; SAKAMOTO, M.I.; NATALI, M.R.M.; SOUZA, L.M.G.; FRANCO, J.R.G. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.488–495, 2007.
- MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. **Clinical Science**, v.89, p.397–407, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. National Academic Press, Washington, DC, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5th ed.; W. H. Freeman: New York, 2008.
- NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**, v.13, p.728–730, 1997.
- NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.R.; PITHON-CURI, T.C. CURI, R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cellular Biochemistry and Function**, v.21, p.1–9, 2003.
- NOVELLI, A.; TASKER, R.A.R. Excitatory amino acids in epilepsy: from the clinics to the laboratory. **Amino Acids**, v.32, p.295–297, 2008.
- ORLANDO, G.F.; WOLF, G.; ENGELMANN, M. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. **Amino Acids**, v.35, p.17–27, 2008.

- PEREIRA, R. T.; ROSA, P. V.; GATLIN III, D. M. Glutamine and arginine in diets for Nile tilapia: Effects on growth, innate immune responses, plasma amino acid profiles and whole-body composition. **Aquaculture**, v.473, p.135-144, 2017.
- PHANG, J.M.; DONALD, S.P.; PANDHARE, J.; LIU, Y. The metabolism of proline, as a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. **Amino Acids**, v.35, p.681–690, 2008.
- POHLENZ, C.; BUENTELLO, A.M.B.; GATLIN III, D.M. Free dietary glutamine improves intestinal morphology and increases enterocyte migration rates, but has limited effects on plasma amino acid profile and growth performance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.370–371, p.32–39, 2012.
- QIYOU, X.; QING, Z.; HONG, X.; CHANG, W.; DAJIANG, S. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion/absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* ♀ × *Huso dauricus* ♂). **Journal of Applied Ichthyology**, v.27, p.721–726, 2011.
- REEDS, P.J.; BURRIN, D.G. Glutamine and the bowel. **The Journal of Nutrition**, v.131, p-2505-2508, 2001.
- RHOADS, J.M.; ARGENZIO, R.A.; CHEN, W.; RIPPE, R.A.; WESTWICK, J.K.; COX, A.D.; BERSCHNEIDER, H.M.; BRENNER, D.A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates motogen-activated protein kinase. **American Journal of Physiology**, v. 272, p.943-953, 1997.
- SILVA, L.C.A.R.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D.; VIDAL, L.V.O. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e Lglutamato. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1175-1179, 2010.
- SOLTAN, M.A. Influence of dietary glutamine supplementation on growth performance, small intestinal morphology, immune response and some blood parameters of broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8, p.60–68, 2009.
- SUENAGA, R.; TOMONAGA, S.; YAMANE, H. Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. **Amino Acids**, v.35, p.139–146, 2008.

- WANG, J.; CHEN, L.; LI, P.; LI, X., ZHOU, H.; WANG, F.; LI, D.; YIN, Y.; WU, G. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. **Journal of Nutrition**, v.138, p.1025–1032, 2008.
- WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1735-1742, 1996.
- WILLIS, A.; BEANDER, H.U.; STEEL, G.; VALLE, D. PRODH variants and risk for schizophrenia. **Amino Acids**, v.35, p.673–679, 2008.
- WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. **Journal of Biological Chemistry**. v.255, p.107–112, 1980.
- WU, G.; FIELD, C.J.; MARLISS, E.B. Enhanced glutamine and glucose metabolism in cultured rat splenocytes stimulated by phorbol myristate acetate plus ionomycin. **Metabolism**, v.41, p.982–988, 1992.
- WU, G.; KNABE, D.A. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.415–424, 1994.
- WU, G.; FLYNN, N.E.; YAN, W.; BARSTOW, D.G. Glutamine metabolism in chick enterocytes: absence of pyrroline-5-carboxylase synthase and citrulline synthesis. **Biochemistry Journal**, v.306, p.717–721, 1995a.
- WU, G.; FLYNN, N.E. Regulation of glutamine and glucose metabolism by cell volume in lymphocytes and macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1243, p.343–350, 1995b.
- WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W.; FLYNN, N.E. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal of Physiology**, v.37, p.334-342, 1995c.
- WU, G., MEIER, S.A., KNABE, D.A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v.126, p.2578–2585, 1996.
- WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A. Maternal nutrition and fetal development. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2169–2172, 2004.
- WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; KIM, S.W.; KNABE, D.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E.; YIN, Y.L. Important roles of the arginine family amino acids in swine nutrition and production. **Livestock Science**, v.112, p.8–22, 2007.

- WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v.37, p.1–17, 2009.
- WU, G.; BAZER, F.W.; JOHNSON, G.A.; KNABE, D.A.; BURGHARDT, R.C.; SPENCER, T.E.; LI, X.L.; WANG, J.J. Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2017–2030, 2011.
- YAN, L.; QIU-ZHOU, X. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture**, v.256, p.389-394, 2006.
- YI, G.F.; ALLEE, G.L.; FRANK, J.W.; SPENCER, J.D.; TOUCHETTE, K.J. Impact of glutamine, menhaden fish meal, and spray-dried plasma on the growth and intestinal morphology of broilers. **Poultry Science**, v.80, 2001.
- YI, G.; ALLEE, G.; KNIGHT, C.; DIBNER, J. Impact of glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v.84, p.283–293, 2005.
- ZHANG, K.; MAI, K.; XU, W.; LIUFU, Z.; ZHANG, Y.; PENG, M.; CHEN, J.; AI, Q. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, nonspecific immunity, and disease resistance in relation to arginine catabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v.468, p.246-254, 2017.
- ZHU, Q.; XU, Q.Y.; XU, H.; WANG, C.A.; SUN, D.J. Dietary glutamine supplementation improves tissue antioxidant status and serum non-specific immunity of juvenile Hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* ♀ x *Huso dauricus* ♂). **Journal of Applied Ichthyology**, v.27, p.715–720, 2011.
- ZOU, X.T.; ZHENG, G.H.; FANG, X.J.; JIANG, J.F. Effects of glutamine on growth performance of weanling piglets. **Czech Journal of Animal Science**, v.51, p.444–448, 2006.

CAPÍTULO II

GLUTAMINE SUPPLEMENTATION OF CULTURE MEDIA FOR NILE TILAPIA IMMUNE CELLS

Glutamine supplementation of culture media for Nile tilapia immune cells

ABSTRACT: Under appropriate conditions, glutamine (Gln) is essential for cell proliferation, acting as a respiratory fuel for enterocytes and lymphocytes, with positive effects on the function of stimulated immune cells. Thus, specific components of both innate and adaptive immune systems of Nile tilapia were evaluated after supplementation of culture media with glutamine. Primary cell cultures of head-kidney macrophages were used for respiratory burst and phagocytic activity assessment. The ability of macrophages to kill *Streptococcus iniae* was also evaluated. Additionally, proliferation assays were conducted with peripheral blood lymphocytes (PBL) and head-kidney leukocytes exposed to non-specific mitogens. Macrophage phagocytosis, anion superoxide production and bactericidal capacity were significantly ($P < 0.05$) enhanced by Gln supplementation to culture media. Proliferation of naïve T- and B lymphocytes upon mitogenic exposure was also significantly ($P < 0.05$) enhanced by supplementing Gln to the media. These results suggest that *in vitro*, Gln is essential as substrate and immunomodulator of both innate and adaptive responses in Nile tilapia leukocytes, highlighting its potential application as an immunonutrient.

Keywords: *in vitro* assay, lymphocyte proliferation, macrophages, *Oreochromis niloticus*, phagocytosis.

1. INTRODUCTION

Aquaculture has witnessed a significant growth throughout the past decades. Tilapia culture is following the same path, becoming the second largest farmed finfish group in the world, which in 2015 represented 5.4% of global aquaculture production [1]. The fast industrialization of tilapia production could be attributed to scientific and technological advancements, as well as changes in the farming practices, so that extensive and semi-intensive systems have been substituted by intensive models [2]. As a result, fish are submitted to marginal environmental conditions, high densities and regular handling practices, thus increasing the likelihood of disease and other adverse health effects. Infectious diseases can be considered a major bottleneck to aquaculture's continuous expansion, causing severe economic losses in commercial fish farming worldwide [3].

Addressing aquatic animal health issues has become an urgent requirement for sustaining growth of aquaculture [4]. In this sense, important research efforts have been made to prevent, control and mitigate the deleterious effects of infectious diseases. It is essential to study and understand the fish immune system including certain components of both, the specific and nonspecific immune responses, such as the leukocytes, because they are the first line of defense against invading organisms [5].

The activity of leukocytes plays an important role as part of the innate immune system through phagocytosis and consequently killing of pathogens [6]. The functional capacities of those different cell types and humoral factors involved in fish defense have been investigated using a variety of *in vitro* assays. Such methods have been essential tools to understanding the complexity of the defense mechanisms, allowing for the assessment of potential effects of specific nutrients on the immune competence of fish [7]. However, information regarding how specific amino acids may modulate the functions of the fish immune system are still poorly understood [5].

Amino acids have a central role in the defense mechanisms because they are involved in the synthesis of an array of proteins, such as antibodies and in the control of key immune regulatory pathways. In human and animal nutrition, arginine, cysteine, and glutamine (Gln) have received greater attention, though other amino acids are also involved in sustaining immunocompetence and disease resistance [8]. According to Li et al. [9], the important roles of amino acids in immune responses include: (1) the activation

of T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells and macrophages; (2) cellular redox state, gene expression and lymphocyte proliferation; and (3) the production of antibodies, cytokines and other cytotoxic substances.

The effects of specific amino acids on the immune system of terrestrial species have been widely investigated, with proven immunomodulatory effects of Gln [10,11]. As a major energy substrate for cells of the immune system [12], Gln plays an important role in their function and homeostasis participating in lymphocyte proliferation [13], enhancement of phagocytic cell activity and bacterial killing [14-16], immunoglobulin synthesis [15], cytokine production [9] and T-cell responses [17]. In fish, the role of this amino acid in leukocyte metabolism is limited, and, contrarily to mammals, it seems to be species specific [5].

A few studies have been undertaken aiming to evaluate the effects of dietary Gln, isolated or combined with other amino acids, on the non-specific defense response of different fish species. Cheng et al. [18] reported that Gln supplementation improved neutrophil oxidative radical production (NBT), superoxide anion production, and lysozyme activity in the kidney macrophages of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Similar results were found in hybrid striped bass (*Morone chrysops X Morone saxatilis*) after an 8-week feeding trial [19]. Moreover, dietary Gln supplementation has been shown to increase lysozyme activity and serum levels of complement proteins C3 and C4 in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser schrenckii x Huso dauricus* [20], young mirror carp, *Cyprinus carpio* L. [21] and Jian carp, *Cyprinus carpio* var. Jian [22]. Particularly utilizing *in vitro* assays, Buentello et al. [23] demonstrated the essentiality of Gln as metabolic fuel for active cells of the immune system. Culture media supplementation with Gln resulted in increased nitric oxide (NO) production of activated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) macrophages. As to proliferation of cultured lymphocytes, there are conflicting data. Rosenberg-Wiser and Avtalion [24] reported that lymphocyte proliferation of carp is Gln-dependent. More recent data have shown that the proliferation of channel catfish peripheral blood lymphocytes to non-specific mitogens was positively modulated when Gln was supplemented to the culture media. A comparable pattern also was observed on B and T cell proliferation [5]. However, different results were found by Ganassin et al. [25] with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and by McBride and Keast [26] with snapper (*Pagrus auratus*), showing Gln-independent responses. Thus,

this study aims to better understand the immunomodulatory capacity of Gln via *in vitro* studies with cells of the Nile tilapia immune system.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Fish

Healthy Nile tilapia with an average weight of 539 ± 118 g were held in a 1100-L round fiberglass tank as part of a recirculation system (flow 1.1 L/min) provided with a common mechanical and biological filtering system. Fish were fed a commercial omnivorous fish diet, and sampled as needed. Before drawing blood, fish were anesthetized with tricaine methasulfonate. Blood of six fish was drawn from the caudal vasculature with a heparinized syringe and pooled into a composite sample for immediate use in peripheral blood lymphocyte proliferation assays. Six more fish were euthanized with an overdose of anesthetic and head and trunk kidneys were aseptically excised and placed in cold incomplete culture media (sterile, described below) and pooled into a composite sample for the isolation of macrophages.

2.2. Culture media

The culture media was prepared according to Pohlenz et al. [5]. Incomplete culture medium (ICM) consisted of glutamine-free L-15 Leibovitz media, 50 unit's mL^{-1} of penicillin and 0.05 mg mL^{-1} of streptomycin. Complete culture medium (CCM) consisted of ICM plus 5% of bovine calf serum (BCS). The control medium consisted of plain CCM. Based on previous studies with catfish macrophages [23; 27], CCM was supplemented with Gln at 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 mM.

2.3. Leukocyte primary culture

Leukocytes were isolated from head and trunk-kidney as previously reported [28], with slightly modifications. Briefly, head and trunk-kidney tissues were stored in L-15 2% and homogenized with a glass Potter Elvehjein tissue grinder. The homogenized tissues were filtered through a 100- μm sterile nylon mesh and the resulting cell

suspension was centrifuged and washed with cold sterile PBS. The isolated cells were layered on a Percoll gradient (51% v/v) and centrifuged at 400 x g for 30 min. The cell layer at the interface was collected and washed two times with ice-cold phosphate buffer saline at 200 x g for 10 min. Leukocytes were enumerated using a hemocytometer and viability assessed by Trypan blue staining. Cell suspension was adjusted to 2×10^7 cells mL^{-1} in L-15 0.1% FCS for extracellular and intracellular reactive oxygen species, bactericidal and phagocytosis assays. For the proliferation assay, a 100- μL aliquot of 1×10^7 leukocyte suspension was added per well in a sterile flat bottom 96-well microplate.

2.4. Respiratory Burst

Respiratory burst activity of phagocytic cells was measured by extracellular and intracellular superoxide anion production as described by Secombes [28]. Briefly, 100 μl of cytochrome c solution (1.5 mg/ml, in phenol red-free PBS) containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to 12 wells per treatment. As a control, 100 μl of cytochrome c solution containing PMA and superoxide dismutase (SOD, Sigma, 300 U/ml) was added to four wells per treatment. Samples were then incubated at room temperature for 15 min. Readings were taken from a plate reader spectrophotometer operating at 545 nm. The intracellular production of superoxide anion was estimated by the formation of formazan granules. A 100- μl aliquot of nitro blue tetrazolium (NBT) (0.1% in PBS) was pipetted to 12 replicate wells and incubated at room temperature for 45 min. Cells were washed twice with 100% methanol (MeOH) and fixed with 70% methanol. Formazan crystals were dissolved by adding 120 μl of 2M KOH and 140 μl Dimethyl sulfoxide (DMSO). After the formation of the turquoise-blue-colored solutions, absorbance values were read in a plate reader spectrophotometer operating at 620 nm using KOH/DMSO (120 μl of 2M KOH/140 μl DMSO).

2.5. Phagocytosis assay

Phagocytosis of stained yeast cells (*Sacharomices cerevisiae*) by Nile tilapia leukocytes cultured with different Gln concentrations was evaluated according to Ainsworth and Chen [29], with some modifications. First, 1.5 g of dried yeast was hydrated in 10 ml of PBS and then autoclaved for 15 min to kill and fix the yeast. The

cell suspension was mixed with 0.1% Trypan blue in a 1:1 ratio, and was allowed to stain for 15 min at room temperature. The resulting solution was washed several times in PBS, adjusted to 2×10^8 cells/ml and stored at 4°C until used. Five hundred microliters of the leukocyte suspension was mixed with 50 µl of autoclaved dyed yeast suspension (providing a yeast cells:leukocyte ratio of 4:1) and incubated in a microtube at room temperature for 60 min. A light microscope and a hemocytometer were used to enumerate the leukocytes and the phagocytes with at least one yeast. The total number of engulfed bacteria per macrophage was recorded as well. Phagocytic index (PI = total engulfed yeast/total phagocytes) and phagocytic activity (PA = number of phagocytes with engulfed yeast x 100/total macrophages) were computed for both chambers of the hemocytometer and their average value used in the equations. This procedure was performed with six replicates for each treatment.

An adapted protocol was developed in order to reduce the error caused by the amount of time required to enumerate the phagocytic activity of fish leukocytes. Briefly, a 100-µl leukocyte suspension (1×10^7 cells/ml) was seeded on a sterile flat-bottom 96-well microplate and incubated at 27 °C for 2 hours to allow cell attachment. The culture media was then removed and substituted with Gln-supplemented culture media. After a 24-h incubation period, 10 µl of autoclaved dyed yeast suspension (providing a yeast cells:leukocyte ratio of 10:1) was mixed to the leukocyte suspension and incubated at room-temperature for 60 min to allow the phagocytosis process. The attached cells were carefully washed three times with room temperature PBS and 100 µl of trypsin-EDTA solution (1.5 g/L trypsin and 0.4 g/L EDTA in PBS) was added and incubated overnight at 37 °C to solubilize the leukocytes and engulfed yeast, thus resuspending the dye.

2.6. Bactericidal assay

Briefly, *S. iniae* were isolated from a natural outbreak at the Texas A&M University Aquacultural Research and Teaching Facility and cultured in brain heart infusion broth for 18 h at 27°C. The bacterial broth was centrifuged at 2000 x g for 10 min and then the pellet was washed once in phenol-free Hank's balanced salt solution (pH 7.3) for 10 min and resuspended in 5 mL PBS. Bacteria solution was then adjusted to 0.5 optical density at 540 nm.

The ability of macrophages to kill *S. iniae* was evaluated at different Gln media concentrations according to Secombes [28] and modified by Shoemaker et al. [30]. The macrophage primary culture was incubated for 2 h, then washed twice with 200 μL of CCM, and supplemented with corresponding treatments into sets of 12 wells. The bacterial suspension was added to the plate (20 μL to each well) and then centrifuged at 150 x g for 5 min. The combined cell cultures (macrophages + bacteria) were incubated at 27 °C for 0 h (control) and 2.5 h. After each incubation period, supernatants were removed and macrophages lysed with 50 μL of 0.2% Tween 20 solution. Fresh BHI was added (100 μL) to each well and the plate was further incubated for 18 h at 27 °C in an orbital incubator. After the incubation period, 20 μL of thiazolyl blue tetrazolium bromide was added per well and the plate incubated for an additional 15 min. The plate was then read at 620 nm. Bacterial concentrations were calculated by comparing the absorbance (ABS) obtained for each well to a standard curve previously constructed. Bactericidal capacity (% killing = bacteria 0 h - bacteria 2.5 h x 100/bacteria 0 h) was computed for each well and presented as mean % killing per treatment.

2.7. Lymphocyte primary culture

Lymphocytes were isolated from peripheral blood (PBL), as previously described by Miller and Clem [31]. Briefly, Nile tilapia blood (~ 10 mL) was diluted in a ratio of 1:2 with PBS, then 5 mL was layered over 4 mL of Lymphoprep™, centrifuged at 350 x g for 25 min, and lymphocytes were recovered from the interface. Cells were washed with PBS at 600 x g for 10 min. The resulting cell pellet was resuspended in 1 mL of CCM, enumerated and checked for viability (> 95%). Lymphocyte concentration was adjusted to 2.5 x 10⁶ cells mL⁻¹ and 100 μL were added to eight replicate wells of a sterile round-bottom 96-well microplate.

2.8. Proliferation assay

The proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL) and head-kidney leukocytes upon stimulation with non-specific mitogens was evaluated using the colorimetric MTT assay described by Mosmann [32], with modifications. Briefly, supplemented media were added to appropriate wells (sets of eight for each treatment) of lymphocyte and leukocyte

primary culture plates as indicated earlier. Lipopolysaccharide solution (10 mg mL^{-1}) was used for the PBL proliferation whilst a Concanavalin-A solution (1 mg mL^{-1}) was added to the HK-derived leukocyte plates. On both assays, sets of eight wells did not receive the mitogens and served as controls. After incubation for 18 h at 27°C , cell proliferation was determined by MTT (3-(4,5-diamethyl-2thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium) based assay: $20 \mu\text{l}$ of 5 mg MTT/mL solution were added to each well and incubated at 27°C for 4 h. The precipitated formazan was dissolved with dimethylformamide and the optical density was measured at 570 nm (SpectraMax 250 plate reader). Lymphocyte and leukocyte proliferation capacity was computed and presented as stimulation index ($\text{SI} = \text{ABS stimulated cells}/\text{ABS non-stimulated [control] cells}$).

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance, followed by Tukey's test to determine possible significant differences among treatments. All analyses were conducted using the Statistical Analysis System (SAS, 9.2v) software. Differences among treatments were considered significant at $P \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Respiratory Burst

The intracellular anion superoxide production increased 2.2-fold upon Gln fortification at 1.5 mM , but further supplementation did not elicit additional improvements (Table 1). Extracellular anion superoxide production by Nile tilapia leukocytes ranged from 1.09 to $1.29 \text{ nmol mL}^{-1}$ and presented statistical differences among the treatment with 2.0 mM Gln supplementation and the control media.

3.2. Phagocytosis Assays

The effect of Gln supplementation on phagocytic cells was evaluated through the determination of the phagocytic index (PI), phagocytic activity (PA) and colorimetric assay (Table 2). All parameters were positively affected by Gln supplementation levels

above 1.0 mM as compared to the control media. Phagocytic activity increased 62% upon Gln supplementation at 1.5 mM, but further supplementation did not elicit additional improvements.

3.3. Bactericidal Activity

The ability of macrophages to kill *S. iniae* was responsive to Gln supplementation on culture media (Table 1). Unlike the other parameters, the bactericidal activity followed a linear increasing pattern achieving the best result with the highest Gln level (2.5 mM).

3.4. Cell Proliferation Assays

The proliferation of Nile tilapia B lymphocytes to lipopolysaccharides was positively modulated when Gln was supplemented to the culture media regardless of the amino acid concentration (Table 3). The same pattern was observed when HK-derived leukocytes were stimulated by Concanavalin-A.

4. DISCUSSION

The immune response is a complex defense mechanism that involves multiple cellular and humoral components of both innate and adaptive immune systems [9,33]. Different from higher vertebrates, the immune system of fish tends to rely more on its innate response for the combat and killing of invading microorganisms [34]. In this scenario, the macrophage could be considered the most important immune cell, as it not only modulates the production of key cytokines, but it also possesses pivotal role in the phagocytosis process [35-38].

In the present study, phagocytic activity was modulated by Gln supplementation to the culture media. This finding is consistent with previous studies with mammals that found positive responses when Gln was added to the media. It is known that Gln may promote macrophage and monocyte phagocytosis by serving as an energy source and increasing cellular adenosine triphosphate [39]. However, it has been demonstrated that a sufficient supply of extracellular glutamine is also required for the maximal production

of IL-6 and IL-8 by human monocytes and of IL-1 and TNF α by murine macrophages [40]. According to Spittler et al. [41], low extracellular glutamine concentration can reduce major histocompatibility complex (MHC) class II expression and the levels of antigen presentation to T-lymphocytes. In addition, phagocytic uptake of complement opsonized *Escherichia coli* and sheep red blood cells, as well as unopsonized zymosan seems to be directly influenced by glutamine availability [14,41,42]. However, results found with channel catfish cells shows that Gln only enhanced phagocytic activity when combined with arginine [5], demonstrating a potential species-related response. Therefore, it is feasible that the increased phagocytic activity observed in the present study was driven by an adequate supply of energy to the cells, as well as an enhanced expression and release of key cytokines, although further research is needed to evaluate the latter notions.

Based on the higher phagocytic activity provided by Gln supplementation, a higher production of oxygen free radicals via respiratory burst and, consequently, a higher percentage of bacterial killing were expected. An increase in the respiratory burst involves a sudden stimulus-induced increase in non-mitochondrial oxidative metabolism that results in the production of the superoxide anion and associated reactive oxygen species [43]. Indeed, the results found in the present study showed a 2.2-fold increase in the absorbance values for intracellular superoxide anion production when the culture media was supplemented with at least 1.5 mM Gln and a dose-dependent increase in the bactericidal activity against *S. iniae*. During the synthesis of reactive species and nitric oxide, the enzymes responsible for their production (NADPH oxidase and nitric oxide synthase, respectively) requires NADPH. This compound is also required for the formation of new proteins. Glutamine can thus generate considerable amounts of NADPH for cellular requirements through catabolic metabolism involving NADP⁺-dependent malate dehydrogenase, resulting in the formation of pyruvate, which either can be converted to lactate or to acetyl-CoA and thus carbon dioxide [44]. Thus, glutamine may be partially oxidized in the pathway of glutaminolysis or may be fully oxidized, but the outcome of metabolism in either case is NADPH production. In addition, glutamine carbon may be used for new amino acid synthesis, being required for NO production in macrophages and monocytes via arginine synthesis. Considering that arginine derived from Gln seems to be essential for macrophage activity and pathogen killing [45], its

supplementation to the medium probably contributed to higher NO production and, consequently, higher percentage of bactericidal activity. Further studies addressing the production of NO by stimulated Nile tilapia leukocytes under different levels of Gln in the culture media could help to elucidate this hypothesis.

The adaptive immune defense mechanism of fish is based on humoral and cell-mediated responses similar to higher vertebrate systems, including analogous T- and B-lymphocyte populations capable of eliciting specific immune responses against a diversity of antigens. This system can develop immunological memory, which is correlated to the initial activation and expansion of naïve lymphocytes after antigen presentation, cytokine stimulation and molecular co-stimulation at the membrane level [33,46]. In the present study, lymphocyte proliferation capacity upon non-specific mitogenic stimulation was modulated by Gln supplementation to the culture media. Our results are in agreement with previous *in vitro* proliferative assays using mouse [47], rat [38,48,49] and human lymphocytes [42,50]. As an essential precursor for the synthesis of purine and pyrimidine nucleotides, Gln is required for proliferation of lymphocytes [15,17,48,51]. In addition to the Gln requirement for DNA synthesis, the synthesis of both protein and RNA by stimulated rat lymphocytes is dependent upon the Gln concentration in the culture medium [52]. It is also worth noting that the release of Interleukin-2 (IL-2) by activated T-lymphocytes plays a central role in the control of T-cell proliferation [53]. According to Calder and Newsholme [54], the presence of IL-2 in the culture medium of stimulated rat lymphocytes seems to be glutamine-dependent. This result suggests that glutamine may stimulate lymphocyte proliferation by promoting IL-2 production. Although the essentiality of Gln for mammalian lymphocyte cultures have already been established, conflicting results were found among fish species. Nile tilapia lymphocytes responded to Gln supplementation in a similar manner as those from channel catfish, *Ictalurus punctatus* [5] and common carp, *Cyprinus carpio* [24], but different from snapper, *Pagrus auratus* [26], or rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [25], which do not require Gln for lymphocyte proliferation.

In conclusion, our results further emphasize the influence of glutamine on Nile tilapia immune cells function. Glutamine supplementation modulated the response of both branches of the immune system enhancing the phagocytic activity, bacterial killing capacity and proliferation of mitogen-induced lymphocytes *in vitro*. These positive

effects are promising for fish immunonutrition and renders glutamine as a potential ingredient for functional aquafeeds. Thus, further research is still necessary to evaluate the effects of glutamine supplementation *in vivo*, especially under intensive farm conditions, where the immunosuppression caused by stress is known as an economic loss agent.

5. REFERENCES

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food and Agriculture Organization of the United Nations FishStatJ: A Tool for Fishery Statistics Analysis, Version 1.0.1. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>, 2016 (accessed 04.09.2017).
- [2] El-Sayed, A.F.M., Tilapia Culture, second ed., CABI Publishing, CABI International, Willingford, Oxfordshire, 2006.
- [3] Gatlin III, D.M., Nutrition and fish health, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, Academic Press, San Diego, CA, 2002, pp. 671–702.
- [4] Subasinghe, R., Fish health and quarantine, in: A review of the state of the world aquaculture, vol. 886, FAO, Fisheries circular, Rome, 2003, pp. 45-49.
- [5] Pohlenz, C., Buentello, A., Mwangi, W., Gatlin III, D.M. 2012. Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. *Fish and Shellfish Immunology* 32: 762-768.
- [6] Secombes, C.J., The nonspecific immune system: cellular defenses, in: Iwama, G., Nakanishi, T., The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, 1996, pp. 63–101.
- [7] Villena, A.J. 2003. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 111-140.
- [8] Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science Technology* 173: 111-133.
- [9] Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W., Wu, G. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition* 98: 237-252.
- [10] Lobley, G.E., Hoskin, S.O., McNeil, C.J. 2001. Glutamine in animal science and production. *Journal of Nutrition* 131: 2525–2531.
- [11] Adams, A., Thompson, K.D. 2006. Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends in Biotechnology* 24: 201–205.
- [12] Wu, G.; Wu, Z.L.; Dai, Z.L. 2013. Dietary requirements of “nutritionally nonessential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44: 1107–1113.

- [13] Newsholme, P., Curi, R., Pithon, Curi, T.C., Murphy, C.J., Garcia, C., Pires de Melo, M. 1999. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10: 316-324.
- [14] Wallace, C., Keast, D. 1992. Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 41: 1016-1020.
- [15] Newsholme, P. 2001. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *Journal of Nutrition* 131: 2515-2221.
- [16] Muhling, J., Fuchs, M., Fleck, C., Sablotzki, A., Krull, M., Dehne, M.G. 2002. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions *in vitro*. *Amino Acids* 22: 39-53.
- [17] Roth, E. 2007. Immune and cell modulation by amino acids. *Clinical Nutrition* 26: 535-544.
- [18] Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin III, D.M. 2011. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 319: 247-252.
- [19] Cheng, Z.; Gatlin III, D.M.; Buentello, A. 2012. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 43: 362–363.
- [20] Zhu, Q., Xu, Q.Y., Xu, H., Wang, C.A., Sun, D.J. 2011. Dietary glutamine supplementation improves tissue antioxidant status and serum non-specific immunity of juvenile Hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* X *Huso dauricus*). *Journal of Applied Ichthyology* 27: 715-720.
- [21] Hong, X., Qing, Z., Chang-an, W., Zhi-gang, Z., Ling, L., Lian-sheng, W., Qi-you, X. 2014. Effect of Dietary Alanyl-glutamine Supplementation on Growth Performance, Development of Intestinal Tract, Antioxidant Status and Plasma Non-specific Immunity of Young Mirror Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 21: 37-46.
- [22] Hu, K., Zhang, J. X., Feng, L., Jiang, W. D., Wu, P., Liu, Y., Zhou, X. Q. 2015. Effect of dietary glutamine on growth performance, non-specific immunity,

- expression of cytokine genes, phosphorylation of target of rapamycin (TOR), and anti-oxidative system in spleen and head kidney of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 635-649.
- [23] Buentello, J.A., Gatlin III, D.M. 1999. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture* 179: 513-521.
- [24] Rosenberg-Wiser, S., Avtalion, R.R. 1982. The cells involved in the immune response of fish. III. Culture requirements of PHA-stimulated carp (*Cyprinus carpio*) lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 6: 693-702.
- [25] Ganassin, R.C., Barlow, J., Bols, N.C. 1998. Influence of glutamine on phytohemagglutinin stimulated mitogenesis of leucocytes from the rainbow trout head kidney. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 561-564.
- [26] McBride, S., Keast, D. 1997. Mitogenesis of snapper lymphocytes and their requirement for glutamine. *Developmental and Comparative Immunology* 21: 91
- [27] Buentello, J.A., Reyes-Becerril, M., Romero-Geraldo, M.J., Ascencio-Valle, F.J. 2007. Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 19: 195-203.
- [28] Secombes, C.J., Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. in: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. *Techniques in fish Immunology*. Fair Haven: SOS Publications, 1990, pp. 137-154.
- [29] Ainsworth, A.J., Chen, D.X. 1990. Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology* 14: 201-209.
- [30] Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Plumb, J.A. 1997. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58: 181-190.

- [31] Miller, N.W., Clem, L.W. 1988. A culture system for mitogen-induced proliferation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) peripheral blood lymphocytes. *Methods in Cell Science* 11: 69-73.
- [32] Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- [33] Secombes, C. 2008. Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology* 25: 409–416.
- [34] Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20: 137–151.
- [35] Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 725–743.
- [36] Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Lim, C., Immunity and disease resistance in fish, in: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), *Nutrition and Fish Health*. Food Products Press, Binghamton, New York, 2001, pp. 149–162.
- [37] Spittler, A., Holzer, S., Oehler, R., Boltz-Nitulescu, G., Roth, E. 1997. A glutamine deficiency impairs the function of cultured human monocytes. *Clinical Nutrition* 16: 97–99.
- [38] Yaqoob, P., Calder, P. C. 1997. Glutamine requirement of proliferating T-lymphocytes. *Nutrition* 13: 646–651.
- [39] Furukawa, S., Saito, H., Inoue, T., Matsuda, T., Fakatsu, K., Han, I., Ikeda, S., Hidemura, A. 2000. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients *in vitro*. *Nutrition* 16: 323–329.
- [40] Field, C.J., Johnson, I.R., Schley, P.D. 2002. Nutrients and their role in host resistance to infection. *Journal of Leukocyte Biology* 71: 16–32.
- [41] Spittler, A., Winkler, S., Gotzinger, P., Oehler, R., Willhiem, M., Tempfer, C., Weigel, G., Fugger, R., Boltz-Nitulescu, G. & Roth, E. 1995. Influence of glutamine on the phenotype
- [42] Parry-Ballings, M., Evans, J., Calder, P.C., Newsholme, E. A. 1990. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 336: 522-525.

- [43] Rosen, G.M., Pou, S., Ramos, C.L., Cohen, M.S., Britigan, B.E. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *The FASEB Journal* 9: 200–209.
- [44] Newsholme, P., Costa Rosa, L.F.B.P., Newsholme, E.A., and Curi, R. 1996. The importance of macrophage fuel metabolism to its function. *Cell Biochemistry and Function* 14: 1–10.
- [45] Murphy, C. J., Newsholme, P. 1998. The importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clinical Science* 95: 397–407.
- [46] Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56: 486–503.
- [47] Griffiths, M. Keast, D. 1990. The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens. *Immunology and Cell Biology* 68: 405-408.
- [48] Ardawi, M. S. M., Newsholme, E. A. 1983. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochemistry Journal* 212: 835-842.
- [49] Szondy, Z. Newsholme, E. A. 1989. The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of [³H] thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochemistry Journal* 261: 979-983.
- [50] Chang, W.K., Yang, K.D., Shaio, M.F. 1999. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clinical & Experimental Immunology* 117: 482-488.
- [51] Wu, G., Field, C.J., Marliss, E.B. 1992. Enhanced glutamine and glucose metabolism in cultured rat splenocytes stimulated by phorbol myristate acetate plus ionomycin. *Metabolism* 41: 982–988.
- [52] Calder, P. C. 1994. Glutamine and the immune system. *Clinical Nutrition* 13: 2-8.
- [53] Smith, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240: 1169-1176.
- [54] Calder, P. C., Newsholme, E. A. 1992. Glutamine promotes interleukin-2 production by concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Proceedings of the Nutrition Society* 51: 105.

6. TABLES

Table 1. Respiratory burst activity and killing capacity of head kidney (HK)-derived leukocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemental levels of glutamine (Gln).

Cell culture media	Superoxide Anion Production		Bactericidal Assay
	Extracellular (nmol)	Intracellular (Abs)	Mean % Killing
CCM	1.09 ^b	343 ^d	11.49 ^b
+Gln 0.5 mM	1.24 ^{ab}	520 ^c	13.72 ^{ab}
+Gln 1 mM	1.25 ^{ab}	630 ^b	14.53 ^{ab}
+Gln 1.5 mM	1.16 ^{ab}	754 ^a	16.05 ^{ab}
+Gln 2 mM	1.29 ^a	706 ^{ab}	16.16 ^{ab}
+Gln 2.5 mM	1.25 ^{ab}	716 ^{ab}	18.80 ^a
P-value	0.006	0.001	0.013
P.S.D.	0.13	86.47	4.99

Values represents means of 12 replicate wells. Different superscript letters within a column indicate significant ($P < 0.05$) differences as evaluated by Tukey's test. P.S.D., pooled standard deviation.

Table 2. Phagocytic capacity of Nile tilapia head kidney (HK)-derived leukocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemental levels of glutamine (Gln).

Cell culture media	Phagocytosis Assay		
	Phagocytosis Index	Phagocytosis Activity	Colorimetric Assay
CCM	2.82 ^b	11.91 ^c	82.50 ^c
+Gln 0.5 mM	3.18 ^{ab}	13.83 ^{bc}	90.58 ^{bc}
+Gln 1 mM	3.47 ^a	19.28 ^{ab}	100.58 ^{ab}
+Gln 1.5 mM	3.52 ^a	19.94 ^a	112.33 ^a
+Gln 2 mM	3.50 ^a	21.05 ^a	106.33 ^{ab}
+Gln 2.5 mM	3.49 ^a	21.68 ^a	109.00 ^{ab}
P-value	0.01	0.001	0.001
P.S.D.	0.36	3.25	14.91

Values represents means of six replicate wells for phagocytosis index and activity and 12 replicate wells for the Colorimetric Assay. Different superscript letters within a column indicate significant ($P < 0.05$) differences as evaluated by Tukey's test. P.S.D., pooled standard deviation.

Table 3. Proliferation capacity upon non-specific stimulation of head kidney (HK)-leukocytes and peripheral PB-Lymphocytes incubated with complete culture media (CCM) or supplemented levels of glutamine (Gln).

Cell culture media	Proliferation Assay - Stimulation Index	
	HK-Leukocytes	PB-Lymphocytes
CCM	1.03 ^b	1.86 ^b
+Gln 0.5 mM	1.10 ^a	2.04 ^a
+Gln 1 mM	1.09 ^a	2.13 ^a
+Gln 1.5 mM	1.08 ^a	2.11 ^a
+Gln 2 mM	1.09 ^a	2.13 ^a
+Gln 2.5 mM	1.09 ^a	2.09 ^a
P-value	0.001	0.001
P.S.D.	0.02	0.12

Values represent means of eight replicate wells. Different superscript letters within a column indicate significant ($P < 0.05$) differences as evaluated by Tukey's test. P.S.D., pooled standard deviation.

CAPÍTULO III

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE GLUTAMINA NO
DESEMPENHO PRODUTIVO, MORFOLOGIA INTESTINAL,
RESPOSTAS HEMÁTICAS, ENZIMÁTICAS E IMUNOLÓGICAS DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO

Suplementação dietética de glutamina no desempenho produtivo, morfologia intestinal, respostas hemáticas, enzimáticas e imunológicas da tilápia-do-nylo submetida a desafio bacteriano

Resumo: Dois experimentos foram realizados para avaliar a suplementação de glutamina (Gln) em dietas para tilápia-do-nylo. Estudo I objetivou determinar o nível ótimo de suplementação dietética de Gln por meio das respostas de desempenho produtivo, composição corporal, morfometria intestinal e capacidade antioxidante. Foram distribuídos 440 juvenis de tilápia-do-nylo ($4,4 \pm 0,1\text{g}$) em 40 aquários de 250 L, em sistema de recirculação. Dietas práticas foram formuladas contendo níveis de suplementação de Gln de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 % em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Os peixes foram arraçoados quatro vezes ao dia, por 90 dias. A suplementação desse aminoácido em concentrações entre 1 e 2% influenciou positivamente o peso e comprimento relativos do intestino, altura de vilosidades, relação vilo:cripta e parâmetros de desempenho produtivo. Houve aumento na concentração de glutathione reduzida (GSH) no intestino de animais que receberam a suplementação de Gln. O Estudo II avaliou a contribuição da suplementação de Gln nas respostas hematológicas, imunológicas e bioquímicas, antes e após o desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*. Após o ensaio de desempenho, 60 peixes ($244,5 \pm 10,2\text{ g}$) foram inoculados intraperitonealmente com agente patógeno e transferidos para a sala experimental de desafio. Ao final de 15 dias foram analisados os parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquímicos. Os parâmetros hematológicos e índices hematimétricos não foram afetados pelos tratamentos. A suplementação dietética de 1,5% de Gln resultou em aumento significativo na concentração sérica de lisozima. Os demais parâmetros imunológicos não foram afetados pelos tratamentos, somente pelo desafio bacteriano comparando-se os períodos. De forma geral, a suplementação dietética de Gln promoveu o desenvolvimento e funcionamento intestinal, além de apresentar efeitos positivos na atividade de lisozima sérica, sistema antioxidante e de desempenho produtivo. O nível estimado de suplementação de Gln em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo foi de 1,40%.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, aminoácidos condicionalmente essenciais, nutrição e saúde de peixes, *Oreochromis niloticus*

Dietary glutamine supplementation on growth performance, intestinal morphology, hematic, enzymatic and immunological responses of Nile tilapia juveniles subjected to bacterial challenge

Abstract: Two experiments were conducted to evaluate the effect of glutamine (Gln) supplementation in Nile tilapia diets. Study I: aimed to determine the optimal level of Gln supplementation through productive performance responses, body composition, intestinal morphology and antioxidant capacity. Four hundred Nile tilapia juveniles (4.4 ± 0.1 g) were distributed in 40 aquaria (250 L each), in a recirculating water system. The experimental design utilized was completely randomized with five treatments (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % Gln) and eight replicates. The fish were hand fed four times a day for 90 days. Glutamine supplementation improved relative weight and length of intestine, as well as villus length and villus:crypt ratio, which could be related to the lower feed conversion ratio found on fish fed Gln-supplemented diets. Final body weight, weight gain and specific growth rate were also positively affected by Gln supplementation. Fish fed Gln diets showed increased glutathione (GSH) concentrations in the intestine. Study II: the contribution of Gln supplementation in hematological, immunological and biochemical responses was assessed under bacterial challenge by *Aeromonas hydrophila*. After the feeding trial, 60 fish (244.5 ± 10.2 g) were inoculated intraperitoneally with the pathogen and transferred to the experimental challenge room. After 15 days, hematological, immunological and biochemical parameters were analyzed. The bacterial challenge affected the hematological and immunological parameters. However, Gln supplementation presented limited effect on these parameters, except for lysozyme concentration, which significantly increased on fish fed 1.5% Gln diets. In sum, dietary Gln supplementation promoted intestinal development and function, improved immune response and antioxidant system, as well as the growth performance. The dietary Gln supplementation level was estimated to be 1.40%.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, conditionally essential amino acid, fish nutrition and health, *Oreochromis niloticus*

1. INTRODUÇÃO

Como característica atual da aquicultura os sistemas extensivos e semi-intensivos vêm sendo substituídos pelos sistemas intensivos. À medida que a produção aquícola se intensifica, a maximização da eficiência produtiva e a eficácia no controle de patógenos tornam-se essenciais para o sucesso da atividade. Os manejos estressores e condições adversas a que os animais são constantemente submetidos favorecem o aparecimento e dispersão de doenças (Costello, 2009; Zagnutt et al., 2013). Portanto, o estudo dos mecanismos de defesa dos peixes cultivados e o conhecimento de como nutrir e modular os diferentes componentes do sistema imunológico são cruciais para a prevenção e controle das doenças (Pohlenz et al., 2014).

Nas últimas décadas, as pesquisas voltadas à nutrição de peixes concentraram-se, principalmente, no estabelecimento das exigências nutricionais mínimas para o crescimento ou com objetivo de evitar sinais de deficiências nutricionais (NRC, 2011). No entanto, o papel da nutrição na gestão da saúde por meio da modulação da resposta imune e resistência às doenças tornou-se área de investigação prioritária, tendo como objetivo a diminuição da dependência de antimicrobianos e redução nas perdas econômicas associadas às doenças (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012). Deste modo, estratégias nutricionais vêm sendo utilizadas para garantir taxas de crescimento ótimas associadas à manutenção da saúde dos organismos cultivados (Sealey e Gatlin, 2001).

Dentre os compostos capazes de estimular e/ou modular o sistema imune de peixes, vitaminas, minerais, aminoácidos e polissacarídeos têm recebido atenção da comunidade científica. Alguns aminoácidos e seus metabólitos possuem destacadas funções fisiológicas (Li et al., 2009), associadas a resistência ao estresse ambiental, manutenção das funções metabólicas, regulação da ingestão alimentar, utilização de nutrientes e crescimento somático (Cheng et al., 2012). Como unidades constitutivas das proteínas, os aminoácidos são necessários na síntese de moléculas importantes do sistema imune como anticorpos, enzimas e proteínas do sistema complemento (Li et al., 2007). Participam, ainda, da modulação das principais vias de regulação imunitária, ativação de linfócitos T, B e macrófagos, produção de citocinas e substâncias citotóxicas (Kiron, 2012).

As exigências nutricionais de aminoácidos dependem da espécie animal, fase de desenvolvimento, estado fisiológico, microbiota no lúmen intestinal, fatores ambientais, e estado patológico (Dai et al., 2011, 2012a,b; Wu et al., 2013). Assim, alguns dos aminoácidos não essenciais vêm sendo classificados como condicionalmente essenciais, devido à taxa de utilização ser maior do que a de síntese, sob certas condições (Wu, 2009). Dentre os aminoácidos considerados condicionalmente essenciais, a glutamina (Gln) vem se destacando por apresentar funções metabólicas importantes. Esse aminoácido é substrato energético para a maioria das células, em particular para células de rápida divisão como enterócitos e linfócitos. Participa do transporte de nitrogênio corporal apresentando função fundamental no equilíbrio ácido-base dos animais (Wu, 2013). A Gln é precursora de nucleotídeos, purinas e pirimidinas tornando-a essencial na proliferação celular. Como uma das principais fontes de glutamato regula a síntese de glutathione, molécula importante na proteção das células contra o estresse oxidativo (Wu, 2013). Atua, ainda, como fonte energética para leucócitos modulando a produção de citocinas e óxido nítrico (Buentello e Gatlin, 1999; Li et al., 2007).

Melhora no ganho de peso, eficiência alimentar, peso intestinal, estruturas histológicas e atividades de enzimas digestivas têm sido descritas para juvenis de carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian) (Yan e Qiu-Zhou, 2006), esturjão híbrido (*Acipenser schrenckii* × *Huso dauricus*) (Qiyu et al., 2011) e “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) (Cheng et al., 2011) arraçados com dietas suplementadas com Gln. Por meio de análises *in vitro*, Jiang et al. (2009) relataram que esse aminoácido é essencial para a proliferação de enterócitos, além de sua ação contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em carpas (Chen et al., 2009). Resultados positivos da suplementação de Gln na produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio por monócitos/macrófagos e neutrófilos, além de maior produção de fatores líticos plasmáticos, como a lisozima foram descritos por Cheng et al. (2011), Zhu et al. (2011), Cheng et al. (2012) e Hong et al. (2014).

Os resultados benéficos obtidos em estudos com diferentes espécies de peixes justificam a avaliação dos efeitos da suplementação de Gln no desempenho produtivo, respostas hematológicas, imunológicas e bioquímicas da tilápia-do-nilo submetida ao desafio bacteriano. Portanto, esta pesquisa objetivou avaliar a ação da Gln sobre o

desempenho produtivo e saúde de juvenis de tilápia-do-nilo frente ao desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o nível ótimo de suplementação da glutamina em dietas de juvenis de tilápia-do-nilo, por meio do desempenho produtivo, morfometria intestinal, composição corporal e capacidade antioxidante;
- Avaliar a suplementação da glutamina como aminoácido condicionalmente essencial na saúde da tilápia-do-nilo, por meio de respostas hematológicas e imunológicas frente ao desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram desenvolvidos dois estudos: o estudo I teve por objetivo determinar o nível ótimo de suplementação de glutamina em dietas para tilápia-do-nilo, por meio das respostas de desempenho produtivo e das características morfométricas do intestino. No estudo II foi avaliada a contribuição dessa suplementação nas respostas hematológicas, imunológicas e bioquímicas, sob desafio bacteriano. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu.

3.1. Instalações (Estudo I)

Foram utilizados 40 aquários de fibra de vidro em formato circular, com 250 litros de capacidade cada, em sistema de recirculação dotado de filtro físico-biológico, aeração constante e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura na faixa de conforto dos animais.

3.2. Dietas Experimentais (Estudos I e II)

A dieta basal foi formulada para conter 29% de proteína digestível proveniente do farelo de soja como fonte proteica principal e farinha de peixe como fonte secundária e palatilizante. Foram incluídos milho e óleo de soja como fontes de carboidratos e lipídeos, respectivamente, proporcionando energia digestível de 3400 kcal kg⁻¹. Quatro dietas experimentais foram obtidas a partir da dieta basal adicionando-se L-glutamina e ajustando os níveis de L-alanina para manter as dietas isoproteicas:

0,0 Gln (controle): dieta ausente da suplementação de glutamina

0,5 Gln: dieta suplementada com 0,5% de glutamina

1,0 Gln: dieta suplementada com 1,0% de glutamina

1,5 Gln: dieta suplementada com 1,5% de glutamina

2,0 Gln: dieta suplementada com 2,0% de glutamina

As dietas foram balanceadas de acordo com os valores de proteína e aminoácidos digestíveis das matérias primas determinados por Furuya (2010) e NRC (2011). A formulação e composição químico-bromatológica analisada das dietas encontram-se na Tabela 1. A concentração de glutamina livre e o perfil de aminoácidos totais das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2. Para preparo das dietas, os ingredientes foram moídos (peneira *Tyler-32*) para que apresentassem diâmetro médio de 0,5 mm. A mistura foi homogeneizada e submetida ao processo de peletização em equipamento peletizador adaptado, produzindo grânulos com 5,0 mm de diâmetro. Após resfriamento, os grânulos foram secos em estufa com circulação de ar (55°C por 24 horas) e, posteriormente, armazenados (-20,0°C). Os animais foram arraçoados quatro vezes ao dia, até saciedade aparente, nos horários de 8h00min, 12h00min, 14h00min e 18h00min.

3.3. Desempenho Produtivo (Estudo I)

Os peixes foram adquiridos junto a piscicultura comercial (Piscicultura Fernandes, Palmital – SP) e submetidos ao processo de quarentena (40 dias) seguido por período de aclimação (7 dias) ao sistema e dietas experimentais. Foram distribuídos 440 alevinos de tilápia-do-nilo, com peso médio inicial de 4,4 ± 0,1g em 40 aquários de 250 L. O

delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. A temperatura da água foi aferida diariamente e, semanalmente, o pH, o teor de oxigênio dissolvido (sonda YSI 556[®]) e a amônia total (Kit Labcon[®]). Os aquários foram sifonados, semanalmente, para manutenção da qualidade da água. Durante o período experimental de 90 dias, foram avaliados os índices de desempenho produtivo:

- Ganho de peso (GP) = (peso final – peso inicial) / número de peixes (g);
- Consumo de ração (CR) = (ração fornecida / número de peixes) (g);
- Conversão alimentar (CA) = (consumo de ração / ganho em peso) (g g⁻¹);
- Taxa de crescimento específico (TCE) = [(log peso final – log peso inicial) / período experimental em dias] x 100;
- Taxa de sobrevivência (S) = [(n° de peixes vivos / n° total de peixes) *100] (%).

Além dos parâmetros de desempenho produtivo, ao final do ensaio de desempenho produtivo foi analisada a composição corporal e a morfometria intestinal desses animais. Adicionalmente, foram analisadas as características hematológicas, imunológicas e bioquímicas, valores considerados antes do desafio bacteriano.

3.4. Desafio Bacteriano (Estudo II)

Ao final do período experimental de 90 dias, os animais foram submetidos ao desafio bacteriano. Primeiramente foi realizado o ensaio de dose letal bacteriana. A cepa de *Aeromonas hydrophila* obtida a partir de animais acometidos com septicemia hemorrágica virulenta foi mantida em meio de estoque e congelada a -80°C até o seu uso. A bactéria foi semeada em meio de cultura Brain-heart infusion (BHI), incubada em estufa a 28°C por 24 horas. Após a diluição, foi ajustada por meio da escala 0,5 McFarland (1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹) para obtenção das concentrações de 10², 10⁴, 10⁶ e 10⁸ UFC mL⁻¹. Grupos de 25 peixes cada foram infectados com as diferentes concentrações da bactéria, para a determinação da dose letal para 50% dos animais (DL50), sendo avaliada a mortalidade por 15 dias. A DL50 foi obtida por meio da análise de PROBIT[®].

Após o estabelecimento da DL50, 60 peixes (12 por tratamento) com peso médio de 244,5 ± 10,2 g foram inoculados intraperitonealmente com a concentração determinada do patógeno (10⁶ UFC mL⁻¹) contida em 1,0 mL de solução salina (0,85%, m/v). Os peixes foram então transferidos para a sala experimental de desafio contendo 30 aquários de 40 litros cada, dotados de filtro, aquecedores e aeração individual, na densidade de

dois peixes por aquário, perfazendo seis repetições por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Os animais permaneceram nesta estrutura por 15 dias e foram alimentados com as dietas experimentais. Ao final deste período, foram analisados os parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquímicos desses animais, valores considerados após desafio bacteriano.

3.5. Análises químico-bromatológicas (Estudo I)

Foram coletados 30 peixes do mesmo lote inicial para determinação da composição químico-bromatológica corporal. As amostras para a composição corporal dos peixes (peixe inteiro) foram moídas em moedor de carne, até obter-se polpa homogênea, a qual foi seca em estufa de ventilação forçada a 55° C por 48 horas e moídas em moinho tipo bola. Ao final do período experimental, oito peixes por tratamento foram anestesiados (benzocaína, 0,1 g L⁻¹), congelados e, posteriormente, moídos, secos e armazenados a -20°C até serem analisados. O conteúdo de proteína bruta (PB), matéria seca (MS), matéria original (MO), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) e energia bruta (EB) das dietas e carcaças foram determinados de acordo com os protocolos da AOAC (1995).

3.6. Morfometria Intestinal (Estudo I)

Para a morfometria da mucosa intestinal foram coletadas porções de aproximadamente 1 cm de comprimento de cada segmento do intestino (proximal, médio e distal) (Lin, 1998), de oito peixes por tratamento. As amostras foram colocadas em placa de isopor, abertas longitudinalmente, lavadas com solução salina, fixadas individualmente em solução de “Bouin” por 24 horas, desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina, para obtenção de cortes histológicos semi-seriados. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura, corados pelo método de hematoxilina-eosina. Em microscopia de luz, utilizando sistema analisador de imagem Leica Qwin v.3.0, foram tomadas as medidas de altura das vilosidades e profundidade das criptas para o cálculo da relação altura de vilosidade : profundidade de cripta. As medidas morfométricas da mucosa intestinal foram realizadas em 25 vilos em cada segmento intestinal por animal, perfazendo um total de 600 medidas por dieta.

Intestinos íntegros de animais em jejum foram coletados de oito peixes por tratamento para a determinação das variáveis de peso relativo do intestino e comprimento relativo do intestino:

- Peso relativo do intestino (PRI) = (peso intestino x 100) / peso do peixe
- Comprimento relativo do intestino (CRI) = comprimento do intestino / comprimento total do peixe

3.7. Análises hematológicas (Estudos I e II)

Para as análises hematológicas os peixes foram anestesiados (benzocaína, 0,1 g L⁻¹) e, a coleta de sangue realizada por punção do vaso caudal, com seringa de 1,0 mL com anticoagulante EDTA a 3,0% (m/v). As análises foram realizadas de acordo com Hrubec e Smith (2010). A contagem de eritrócitos (Erit) foi realizada pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01% (m/v) em pipeta automática, na proporção 1:200 (sangue:corante). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial Hemoglobina Labtest Diagnóstica® para determinação colorimétrica. A porcentagem de hematócrito (Htc) foi obtida utilizando-se o método do microhematócrito. Foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio ($VCM = (Htc \times 10) / Erit$) e concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = (Hb \times 100) / Htc$).

A proteína plasmática total (PPT) foi quantificada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg. Para a análise de albumina (ALB) foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante. Estas amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro. A concentração de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial Albumina Labtest Diagnóstica® para determinação colorimétrica. De posse dos resultados de albumina e proteína plasmática total, foram estimadas a concentração de globulina (GLOB) no soro e a relação entre albumina e globulina (A:G).

3.8. Enzimas antioxidantes dos tecidos epitelial e hepático (Estudo I)

Amostras de intestino e fígado coletadas ao final do período experimental de 90 dias (Estudo I) foram armazenadas a -80°C . Para realização das análises, as amostras foram homogeneizadas em 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4 contendo 1 mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 900 g por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi diluído no mesmo tampão de homogeneização na proporção 1:1 (v/v) e utilizado para os ensaios enzimáticos.

3.8.1. Superóxido Dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada utilizando kit analítico, como descrito por Delmas-Beauvieux et al. (1995). Esse método emprega xantina e xantina oxidase para a reação do radical superóxido, o qual reage com o cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio para formar o corante vermelho de formazan, medido em espectrofotômetro, no comprimento de onda ajustado para 505 nm. A inibição da produção deste cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra. Os valores da atividade da SOD foram expressos como unidade de SOD ml^{-1} . Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de formação do cromógeno de formazan.

3.8.2. Glutaciona peroxidase (GPx – EC 1.11.1.9)

A reação da GPx foi realizada em meio contendo 600 μL de solução composta por 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,7, 1 mM de EDTA, 0,4 mM de azida (para inibir a catalase), 2mM de glutaciona, 0,1 mM de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e 0,62 U de glutaciona redutase. A atividade GPx dependente de selênio (Se-GPx) foi medida tendo o hidroperóxido de tert-butila como substrato a 340 nm, de acordo com Wendel (1981). A contribuição da oxidação espontânea de NADPH foi subtraída da contagem da reação total. Os valores da atividade da glutaciona peroxidase foram expressos como unidade (moles de NADPH oxidados/min) g^{-1} de proteína.

3.8.3. *Glutationa (GSH – CAS n° 70-18-8)*

A determinação da glutaciona (GSH) foi realizada por meio do método enzimático de Tietze, com adaptações (Akerboom e Sies, 1981). O ensaio foi realizado em tampão fosfato de potássio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo 0,2 mM de NADPH e 0,1 mM de Ácido Ditionitrobenzoico (DTNB). Foi utilizado como iniciador da reação utiliza-se glutaciona redutase 0,25 U/ml. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura do consumo basal de NADPH do ensaio na ausência de amostra. As quantificações dos níveis de GSH-t foram baseadas a partir de uma curva padrão realizada no momento da leitura. Os dados foram expressos em nmol g⁻¹ tecido (fígado ou intestino).

3.8.4. *Malondialdeído (MDA – CAS n° 542-78-9)*

A determinação dos níveis de malondialdeído foi realizada pela verificação da presença do produto formado entre o malondialdeído e o ácido 3-tiobarbícúrico, via HPLC-UV/Vis em 532nm (Almeida et al., 2003). As amostras foram analisadas diretamente no HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) e a fase móvel se constituiu de uma solução de fosfato de potássio monobásico (50 mM, pH 7,0) com 40% de metanol. A quantificação foi feita com base na curva padrão, que se constituiu de padrões conhecidos de MDA obtidos pela hidrólise do tetrametoxipropano. Os dados foram expressos em nmol g⁻¹ de tecido (fígado ou intestino).

3.9. *Análises imunológicas (Estudos I e II)*

Foi coletado sangue de seis peixes por tratamento (Estudos I e II). As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do vaso caudal, utilizando-se seringas plásticas e agulhas descartáveis, com ou sem anticoagulante, de acordo com o destino das amostras. O sangue coletado em seringas contendo anticoagulante foi destinado às análises dos intermediários reativos do oxigênio (H₂O₂) e nitrogênio (NO), enquanto as amostras sem anticoagulante foram destinadas às análises de concentração de lisozima sérica.

3.9.1. Concentração de lisozima

A concentração de lisozima foi determinada utilizando-se o soro dos peixes por meio de ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990). Essa análise é baseada na lise celular de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e é mensurada por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria. Antes de determinar a concentração de lisozima das amostras de soro dos peixes, foi realizada curva padrão de calibração pela quantificação das diferenças das densidades ópticas iniciais e finais (ΔDO) de diferentes concentrações de lisozima padrão (Sigma L 6876). As leituras foram realizadas por meio de espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm e utilizou-se solução de tampão fosfato para calibração. A partir da curva determinada foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO . Em cubeta de 1,0 mL foi pipetado 150 μL de soro ao qual se adicionou 150 μL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) sendo, posteriormente, incubada a 26 °C por dois minutos. Após esse período foram adicionados mais 300 μL da suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹) totalizando volume final de 600 μL . A redução da densidade óptica (ΔDO) em 450 nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26 °C. Os resultados foram expressos em $\mu g mL^{-1}$ de soro.

3.9.2. Intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio

A atividade do *burst* respiratório foi avaliada pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO), segundo metodologia de Secombes (1990), com modificações. Para tal foi coletado sangue de seis peixes por tratamento (Estudos I e II), conforme procedimento descrito para as análises hematológicas de peixes infectados ou não pela bactéria.

A produção de H₂O₂ por monócitos sanguíneos foi determinada por meio da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (Pick e Keisari 1980). Após a incubação das culturas celulares por 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de óxido nítrico e a camada celular utilizada para a determinação de H₂O₂. Para a determinação da produção de H₂O₂ foi acrescido à camada celular solução vermelho fenol e as culturas foram incubadas em estufa a 18,0°C, por 60 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 10,0 μL de NaOH 1 mol L⁻¹. A absorbância foi determinada

em microleitor de ELISA automático, com filtro de 620 nm, sendo o branco constituído de vermelho fenol e NaOH. A produção de NO por monócitos sanguíneos foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (Green et al., 1981) combinando 100,0 µL do sobrenadante da amostra teste com 100,0 µL do reagente Griess (Need 0,1% (m/v) e sulfanilamida 1,0% (m/v) em H₃PO₄ 5,0%, v/v). As leituras foram feitas em microleitor de ELISA a 540nm.

3.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e em caso de diferenças significativas submetidos ao teste de comparação de médias (Tukey) e à análise de regressão polinomial. O teste *t*-pareado foi utilizado para comparação dos dados antes e após o desafio bacteriano. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho produtivo

A suplementação de Gln teve influência positiva no peso final e ganho de peso médio, de forma que o tratamento com nível de 1,5% Gln determinou melhor resultado comparado com o tratamento controle, porém não diferiu dos tratamentos 0,5, 1,0 e 2,0% Gln ($P > 0,05$), que, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas se comparados ao controle (Tabela 3). O consumo de ração não foi afetado pela suplementação da Gln ($P > 0,05$). O nível de 1,0% de suplementação proporcionou melhor conversão alimentar comparado ao tratamento controle, mas não diferiu dos demais tratamentos ($P > 0,05$). A TCE também foi afetada positivamente pela suplementação desse aminoácido, de forma que o resultado obtido com o nível de 1,5% Gln foi melhor em relação ao tratamento controle, porém não apresentou diferença ($P > 0,05$) se comparado aos demais níveis de suplementação. As taxas de sobrevivência foram elevadas para os peixes alimentados com todas as dietas (variando de 94 a 100%), não sendo encontradas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$). Por meio de análise de regressão polinomial estimaram-se os valores de 1,40 e 1,08% de suplementação de Gln

para obtenção dos melhores resultados em ganho de peso médio e conversão alimentar, respectivamente (Figura 1).

4.2. Morfometria intestinal e composição bromatológica corporal

O peso relativo do intestino foi influenciado pela suplementação de Gln, de forma que os valores dos animais do tratamento com o maior nível de inclusão foram estatisticamente superiores se comparados aqueles do tratamento controle, porém não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) se comparados aos animais dos tratamentos com níveis de suplementação de 0,5 até 1,5% (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos para o comprimento relativo do intestino, de forma que a suplementação com 2,0% de Gln proporcionou maior valor ($P < 0,05$) se comparado ao grupo controle e 0,5%, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos com 1,0 e 1,5% de suplementação. Os índices hepato-somático e víscero-somático não foram influenciados ($P > 0,05$) pela suplementação de Gln.

No segmento proximal, foram encontradas diferenças significativas para altura das vilosidades, de forma que o tratamento 1,5% Gln determinou o melhor resultado comparado com os tratamentos 0 e 0,5% Gln, porém não diferiu dos tratamentos 1,0 e 2,0% Gln (Tabela 5). A relação vilosidade:cripta também foi afetada pela suplementação de Gln nesse segmento intestinal, proporcionando melhores resultados para os animais alimentados com as dietas suplementadas à partir de 1,0% Gln ($P < 0,05$). No segmento medial do intestino, foi encontrada diferença significativa apenas para a relação vilosidade:cripta, de forma que os níveis de suplementação de 1,5 e 2,0% de Gln proporcionaram os melhores resultados se comparados ao tratamento 0,5% Gln, porém não diferiram dos tratamentos controle e 1,0% Gln. Na porção distal do intestino, não foram encontradas diferenças significativas. Não foram encontradas diferenças significativas para MO, MM, PB, EE e EB das carcaças (Tabela 6).

4.3. Atividade antioxidante

A concentração de GSH no intestino dos peixes que receberam dietas contendo 1,5% de suplementação de Gln foi maior comparado com aqueles contendo níveis inferiores de suplementação (Tabela 7). Entretanto, esses valores não diferiram ($P > 0,05$)

dos encontrados para a dieta 2,0% Gln. Não foram encontradas diferenças significativas para os demais parâmetros, tanto no intestino quanto no fígado.

4.4. Análises hematológicas

A suplementação de Gln e o desafio bacteriano não influenciaram os parâmetros avaliados ($P > 0,05$) (Tabelas 8 e 9). Os resultados referentes às proteínas plasmáticas (Tabela 10), apesar de não apresentarem diferenças entre tratamentos ($P > 0,05$), foram influenciados pelo desafio bacteriano nas variáveis PPT e Albumina. A PPT dos animais arraçados com dietas contendo 2,0% de suplementação de Gln mostrou-se estatisticamente mais elevada na avaliação pós-desafio. A albumina, por sua vez, apresentou diferenças estatísticas para os tratamentos controle e 1,0% de suplementação de Gln na avaliação pós-desafio.

4.5. Análises imunológicas

O desafio bacteriano determinou aumento significativo na produção de H_2O_2 , entretanto não houve diferenças para a produção de NO, tanto entre tratamentos quanto nos momentos antes e após desafio bacteriano ($P > 0,05$) (Tabela 11). A atividade sérica de lisozima foi influenciada pela suplementação de Gln ($P < 0,05$). Antes do desafio bacteriano, o melhor resultado foi determinado para o tratamento 1,5% Gln, que não diferiu dos tratamentos 1,0 e 2,0% Gln ($P > 0,05$). Após o desafio bacteriano, o melhor resultado foi determinado para o tratamento 1,5% Gln, que não diferiu do tratamento 2,0% Gln ($P > 0,05$). A concentração sérica de lisozima apresentou diferenças significativas entre períodos somente para os animais do grupo controle.

5. DISCUSSÃO

O desempenho produtivo de juvenis de tilápia-do-nylo foi positivamente afetado pela suplementação de glutamina. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em estudos com carpas (Hong et al., 2014; Hu et al., 2015, Li et al., 2017), esturjão híbrido (Qiyu et al., 2011; Wang et al., 2011) e robalo híbrido (Cheng et al., 2012). O aumento

no ganho de peso pode estar relacionado ao fato de que a Gln promove a síntese de aminoácidos não-essenciais (AANE) para a deposição de proteína muscular e reduz a degradação dessas proteínas, pois Millward et al. (1989) demonstraram que as concentrações musculares de Gln correlacionam-se diretamente com a taxa de síntese proteica do músculo e são inversamente correlacionadas com a taxa de degradação dessas proteínas. Relatos semelhantes em células isoladas de ratos demonstraram que elevadas concentrações intramusculares de glutamina estimulam a síntese proteica (MacLennan et al., 1987; Higashiguchi et al., 1993).

A análise de regressão polinomial baseada no ganho de peso mostrou que o nível ótimo de suplementação de Gln para juvenis de tilápia-do-nilo é de 1,4%, semelhante ao valor determinado para a carpa comum (1,2%; Yan e Zhou, 2006), porém acima do valor de 0,63% determinado para pós-larvas de “half-smooth tongue sole” (Liu et al., 2015). Esses resultados distintos podem ser atribuídos à composição da fração proteica das dietas nos diferentes experimentos. No presente estudo, a ração basal foi formulada utilizando o farelo de soja como principal fonte proteica, enquanto que nos demais foi utilizada a farinha de peixe. Assim como a maioria dos ingredientes de origem animal, a farinha de peixe possui altas concentrações de Gln (Li et al., 2011) podendo ter diminuído a necessidade de suplementação desse aminoácido devido ao seu conteúdo nas dietas basais.

O efeito trófico da Gln foi evidenciado pelo efeito quadrático observado na conversão alimentar com o melhor valor estimado com 1,08% de Gln, corroborando os resultados encontrados para outras espécies de peixes (Yan e Zhou, 2006; Qiyu et al., 2011; Cheng et al., 2011; 2012, Pereira et al., 2017). A melhora no aproveitamento das dietas pode ser atribuída às modificações intestinais positivas causadas pela suplementação desse aminoácido. De acordo com De Silva e Anderson (1995), o comprimento e peso relativo do intestino variam entre as espécies de peixes e podem estar relacionados com seus hábitos alimentares, podendo ser alterados pela dieta. No que se refere à altura de vilosidades e relação vilo:cripta a suplementação dietética de 1,5% Gln, se comparada ao tratamento controle, proporcionou aumento superior a 30% na altura de vilosidades e cerca de 45% de aumento na relação vilo:cripta na porção proximal do intestino. Por meio de sua via de oxidação, a Gln é importante substrato energético para células de divisão rápida, como os enterócitos, proporcionando ATP para o *turnover*

proteico intracelular, transporte de nutrientes através da membrana plasmática, crescimento e migração celular, bem como a manutenção da integridade celular (Wu et al., 2013). Resultados semelhantes foram determinados em frangos de corte (Yi et al., 2005; Bartell e Batal, 2007; Murakami et al., 2007; Soltan, 2009), suínos (Wu et al., 1996) e peixes (Yan e Zhou, 2006; Cheng et al., 2011; Qiyu et al., 2011; Cheng et al., 2012; Pohlenz et al., 2012). O aumento da altura das vilosidades do epitélio intestinal determinado pela suplementação de Gln e observadas no presente estudo pode ter contribuído para melhora na absorção de nutrientes e, conseqüentemente, o ganho de peso.

A suplementação dietética de Gln teve efeito na atividade antioxidante, apresentando aumento significativo na concentração de GSH no intestino. Resultados semelhantes foram descritos em estudos *in vivo* (Zhu et al., 2011; Hong et al., 2014, Li et al., 2017) e *in vitro* (Jiang et al., 2009). A Gln desempenha papel importante na eliminação de radicais livres uma vez que, como uma das principais fontes de glutamato, atua como precursor e modulador na síntese de GSH (Wu, 1998) apresentando efeito significativo sobre a regulação do estado redox celular (Wu et al., 2004; Zhu et al., 2011; Wu, 2013).

Os parâmetros sanguíneos dos peixes do presente estudo estão dentro da faixa considerada saudável para a espécie (Barros et al., 2009; Weiss e Wardrop, 2010; Barros et al., 2015) e não foram afetados pela inclusão de Gln nas dietas. Resultados contrários foram descritos por Soltan et al. (2009) e Li et al. (2017), que em estudo com frangos de corte e carpa Jian relataram aumento no número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito nos animais que receberam dietas com suplementação de Gln. Devido às diferenças entre as espécies em questão, mais informações são necessárias no que se refere aos efeitos da Gln na eritropoiese dos peixes. Os índices hematimétricos se mostram coerentes aos valores de eritrócitos, Hb e Htc descartando a hipótese de anemias. Os dados relativos aos efeitos da suplementação de Gln no eritrograma de peixes são escassos na literatura, assim, os resultados obtidos no presente estudo podem servir como base para estudos posteriores.

Os valores de proteínas plasmáticas têm sido utilizados na avaliação da resistência dos peixes frente às condições estressoras, pois regulam a resposta inflamatória e proporcionam resistência às infecções (Tizard, 2002). No presente estudo, a

suplementação de Gln não teve influência nas concentrações de PPT e ALB. Assim, novos estudos são necessários para compreensão do papel da Gln na produção e manutenção do perfil de proteínas plasmáticas.

Quando o organismo é exposto a patógenos e corpos estranhos, os macrófagos podem ser ativados produzindo citocinas e mediadores químicos, como o H_2O_2 e NO (Janeway, 1999). No presente estudo, não houve efeito da Gln na produção dos intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio pelos monócitos, apesar de atuar como substrato energético para leucócitos e modulador-chave na produção de citocinas e NO (Li et al., 2009). O aumento na produção de NO e maior capacidade bactericida dos monócitos seriam esperados, uma vez que a Gln é precursora da arginina, fundamental no metabolismo do nitrogênio, síntese de poliaminas, creatina e principal substrato para a produção de NO (Jobgen et al., 2006), sendo essencial para a atividade de macrófagos (Murphy e Newsholme, 1998). Entretanto, a não significância dos resultados neste estudo pode estar associada ao elevado desvio padrão.

Após o desafio por *A. hydrophila* foi observado aumento significativo nos valores de H_2O_2 no soro dos peixes de todos os tratamentos, independentemente da dieta utilizada. O aumento da produção de intermediários reativos de oxigênio por monócitos/macrófagos e neutrófilos é considerado indicador de ativação do sistema imune não-específico nos peixes (Jeney e Anderson 1993; Jorgensen e Robertsen 1995; El-Boshy et al 2010). Resultados positivos da suplementação de Gln na produção de radicais oxidativos foram determinados em estudos com “red drum” (Cheng et al., 2011) e robalo híbrido (Cheng et al., 2012). Entretanto, no presente estudo, a Gln não afetou a produção desses compostos. As diferenças entre os resultados desses estudos podem estar relacionadas às espécies utilizadas, tamanho e estado nutricional dos peixes, duração do período experimental, patogenicidade da bactéria, além de diferenças nos métodos de desafio.

Diferentemente dos demais parâmetros imunológicos, a atividade sérica da lisozima foi influenciada pela suplementação dietética de Gln. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados para outras espécies como esturjão híbrido *Acipenser schrenckii* × *Huso dauricus* (Zhu et al., 2011), “stripped bass” híbrido *Morone chrysops* × *Morone saxatilis* (Cheng et al., 2012) e carpa-espelho *Cyprinus carpio* L. (Hong et al., 2014). A lisozima, assim como outros fatores líticos presentes no plasma,

dificulta a aderência e colonização de microrganismos invasores (Alexander e Ingram, 1992) apresentando, ainda, propriedades opsonizantes, bactericidas e anti-inflamatórias (Jollès e Jollès, 1984). Sabe-se que a Gln é essencial, tanto para a proliferação de linfócitos quanto para produção e liberação de citocinas por células do sistema imune (Wu et al., 1992). Esse conjunto de fatores pode ter promovido a produção e atividade de lisozima nos animais que receberam a suplementação dietética de Gln.

Os resultados deste estudo demonstram que a suplementação dietética de Gln melhora o ganho de peso e eficiência alimentar da tilápia-do-nilo promovendo o desenvolvimento e funcionamento intestinal. A dieta suplementada com 1,5% de Gln proporcionou ainda melhora na capacidade antioxidante pelo aumento na concentração de GSH intestinal e possível melhora na capacidade de eliminação de agentes patógenos em função da maior atividade da lisozima sérica. Entretanto, os efeitos da Gln na resposta imunológica frente ao desafio bacteriano foram inconclusivos, necessitando estudos futuros. Por meio de análise de regressão polinomial do ganho de peso associada aos efeitos benéficos da Gln na atividade da lisozima e concentração de GSH no intestino, o nível recomendado de suplementação em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo foi estimado em 1,4% Gln.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*, in: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Florida, pp. 114–121.
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499-509.
- Albro, P. W., Hall, R. D., Cobertt, J. T., Schroeder, J., 1985. Activation of non-specific lipase (EC 3.1.1.) by biles salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 835, 477-490.
- Almeida, E.A., Marques, S.A., Klitzke, C.F., Bainsy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Loureiro, A.P.M., 2003. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comp. Biochem. Phys.* 135, 295–303.
- Alexander, J. B., Ingram, G. A., 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2, 249-279.
- Akerboom, T. P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists, 1995. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc, Arlington.
- Bartell, S.M., Batal, A.B., 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult. Sci.* 86, 1940–1947.
- Barros, M. M., Ranzani-Paiva, M. J. T., Pezzato, L. E., Falcon, D. R., Guimaraes, I. G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquac. Res.* 40, 895-903.
- Barros, M. M., Falcon, D. R., Orsi, R. O., Pezzato, L. E., Fernandes Junior, A. C., Fernandes Junior, A., Sartori, M. M., 2015. Immunomodulatory Effects of Dietary β -glucan and Vitamin C in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L., Subjected to Cold-induced Stress or Bacterial Challenge. *J. World Aquac. Soc.* 46, 363-380.
- Buentello, J.A., Gatlin III, D.M., 1999. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish *Ictalurus punctatus*: influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture* 179, 513–521.

- Chen, J., Zhou, X. Q., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., 2009. Effects of glutamine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 288, 285–289.
- Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin III, D.M., 2011. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 319, 247–252.
- Cheng, Z., Gatlin III, D.M., Buentello, A., 2012. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 43, 362–363.
- Costello, M.J., 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *J. Fish Dis.* 32, 115–118.
- Dai, Z.L., Wu, G., Zhu, W.Y., 2011. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front. Biosci.* 16, 1768–1786.
- Dai, Z.L., Li, X.L., Xi, P.B., 2012a. Regulatory role for L-arginine in the utilization of amino acids by pig small-intestinal bacteria. *Amino Acids* 43, 233–244.
- Dai, Z.L., Li, X.L., Xi, P.B., 2012b. L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. *Amino Acids* 45, 501–512.
- Dass, P.D., Murdoch, F.E., Wu, M.C., 1984. Glutamine promotes colony formation in bone marrow and HL-60 cells, accelerates myeloid differentiation in induced HL-60 cells. *In vitro* 20, 869–75.
- De Silva, S.S., Anderson, T.A., 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*, first ed. Chapman & Hall, London.
- Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Dumon, M.F., Receveur, M.C., Le Bras, M., Clerc, M., 1995. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin. Biochem.* 28, 163–169.
- El-Boshy, M. E., A. M. M. El-Ashram, F. M. Abdelhamid, and H. A. Gadalla., 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 802–808.

- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays, in: Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Robertson, B.S.; Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Heaven, pp.101-103.
- FAO. Fisheries and aquaculture information and statistic service: 2016: Global aquaculture production: 1950-2015. <http://www.fao.org/figis/> (Acesso 06.04.2017).
- Furuya, W.M., 2010. *Tabelas brasileiras para nutrição de tilápias*, 1ª ed. GMF Gráfica & Editora, Toledo.
- Green, L.C., Luguriaga, V.R., Wager, D.A., Rand, W., Istfan, N., Yeung, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78, 7764-7768.
- Guimarães, I. G., Pezzato, L. E., Santos, V. G., Orsi, R. O., Barros, M. M., 2014. Vitamin A affects haematology, growth and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.), but has no protective effect against bacterial challenge or cold-induced stress. *Aquac. Res.* 47, 2004-2018.
- Helton, W.S., Jacobs, D.O., Bonner-Weir, S., 1990. Effects of glutamine-enriched parenteral nutrition on the exocrine pancreas. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 14, 344–352.
- Higashiguchi, T., Hasselgren, P. O., Wagner, K., Fischer, J. E., 1993. Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 17, 307–314.
- Hong, X., Qing, Z., Chang-an, W., Zhi-gang, Z., Ling, L., Lian-sheng, W., Qi-you, X., 2014. Effect of Dietary Alanine-glutamine Supplementation on Growth Performance, Development of Intestinal Tract, Antioxidant Status and Plasma Non-specific Immunity of Young Mirror Carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Northeast Agric. Univ.* 21, 37-46.
- Hrubec T.C., Smith S.A., 2010. Hematology in Fishes, in: Weiss D.J., Wardrop K.J. (Eds.), *Schalm's Veterinary Haematology*. Willey-Blackwell Publishing, Iowa, pp. 994-1003.
- Hu, K., Zhang, J. X., Feng, L., Jiang, W. D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Zhou, X.Q., 2015. Effect of dietary glutamine on growth performance, non-specific immunity, expression of cytokine genes, phosphorylation of target of rapamycin (TOR), and antioxidative system in spleen and head kidney of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Phys. Biochem.* 41, 635-649.

- Janeway, C. J., 1999. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*, 4^o ed. Editora Artes Médicas Sul Ltda, Porto Alegre.
- Jeney, G., Anderson, D. P., 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116, 315–329.
- Jiang, J., Zheng, T., Zhou, X.Q., Liu, Y., Feng, L., 2009. Influence of glutamine and vitamin E on growth and antioxidant capacity of fish enterocytes. *Aquac. Nutr.* 15, 409–414.
- Jobgen, W.S., Fried, S.K., Fu, W.J., Meininger, C.J., Wu, G., 2006. Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 17, 571–588.
- Jollès, P., Jollès, J. What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165–189.
- Jorgensen, J. B., Robertsen., B., 1995. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 43–57.
- Kultz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects of in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Bio.* 198, 1883–1894.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43–53.
- Li, X., Rezaei, R., Li, P., Wu, G., 2011. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids* 40, 1159–1168.
- Li, H. T., Jiang, W. D., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y. A., Wu, P., Zeng, Y., Zhou, X., Feng, L., 2017. Dietary glutamine improves the function of erythrocytes through its metabolites in juvenile carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*, in press, 2017.
- Lin, H., 1998. *Fish Physiology*. 1^o ed. Higher Education Press of Guangdong, Guangzhou, 1998.
- Liu, J., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., Ai, Q., 2015. Effects of dietary glutamine on survival, growth performance, activities of digestive enzyme, antioxidant status and hypoxia stress resistance of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) post larvae. *Aquaculture* 446, 48–56.

- MacLennan, P. A., Brown, R. A., Rennie, M. J., 1987. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Letters*, 215, 187-191.
- Millward, D. J., Jepson, M. M., Omer, A., 1989. Muscle glutamine concentration and protein turnover *in vivo* in malnutrition and in endotoxemia. *Metabolism* 38, 1-6.
- Moinard, C., Caldefie, F., Walrand, S., Vasson, M.P., Cynober, L., 2002. Evidence that glutamine modulates respiratory burst in stressed rat polymorphonuclear cells through its metabolism into arginine. *Br. J. Nutr.* 88, 689–695.
- Murakami, A.E., Sakamoto, M.I., Natali, M.R.M., Souza, L.M.G., Franco, J.R.G., 2007. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86, 488–495.
- Murphy, C., Newsholme, P., 1998. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin. Sci.* 89, 397–407.
- National Research Council (NRC), 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academic Press, Washington, DC.
- Pereira, R. T., Rosa, P. V., Gatlin III, D. M., 2017. Glutamine and arginine in diets for Nile tilapia: Effects on growth, innate immune responses, plasma amino acid profiles and whole-body composition. *Aquaculture* 473, 135-144.
- Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161-170.
- Polhill, R.B., Pruitt, K.M., Johnston Jr., R.B., 1978. Kinetic assessment of alternative complement pathway in a hemolytic system. Experimental and mathematical analysis. *J. Immunol.* 121, 363-370.
- Qiyu, X., Qing, Z., Hong, X., Chang`an, W., Dajiang, S., 2011. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion/absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* ♀ × *Huso dauricus* ♂). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 721–726.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., Egami, M. I., 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*, 1º ed. Editora UEM, Maringá.
- Rogero, M. M., Tirapegui, J., Vinolo, M. A. R., Borges, M. C., de Castro, I. A., de Oliveira Pires, I. S., Borelli, P., 2008. Dietary glutamine supplementation increases the

- activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J. Nutr.* 138, 1343-1348.
- Sealey, W.M., Gatlin, D.M., 2001. Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish, in: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), *Nutrition and Fish Health*. Food Products Press, Binghamton, New York, pp. 103–118.
- Secombes, C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity, in: Stolen, J.; Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds.). *Techniques in fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, pp.137-154.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks, in SIES, H. (Ed.), *Oxidative Stress*. Academic Press, London, pp. 18.
- Soltan, M.A., 2009. Influence of dietary glutamine supplementation on growth performance, small intestinal morphology, immune response and some blood parameters of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 8, 60–68.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*, 1º ed. M. Tavares-Dias, Ribeirão Preto.
- Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins, in Feldman, B.F. (Ed.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott, Philadelphia, pp. 891-1344.
- Tizard, I. R., 2002. *Imunologia veterinária*. 6ª ed. Editora Roca, São Paulo.
- Verlhac Trichet, V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquac. Res.* 41, 356–372.
- Walter, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. U. (Org.). *Methods of Enzymatics Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. p. 270-277.
- Wang, C. A., Xu, Q. Y., Xu, H., Zhu, Q., Yang, J. L., Sun, D. J., 2011. Dietary l-alanyl-l-glutamine supplementation improves growth performance and physiological function of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii*♀ × *A. baerii*♂. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 727-732.
- Weiss D.J., Wardrop K.J., 2010. *Schalm's Veterinary Haematology*, 6º ed. Blackwell Publishing, Iowa.

- Wendel, A., Feuerstein, S., 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice—I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* 30, 13–20.
- Wu, G., Meier, S.A., Knabe, D.A., 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *J. Nutr.* 126, 2578–2585.
- Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17.
- Wu, G., Wu, Z.L., Dai, Z.L., 2013. Dietary requirements of “nutritionally nonessential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44, 1107–1113.
- Wu, G., 2013. *Amino Acids Biochemistry and Nutrition.*, 1^o ed. Taylor & Francis Group. CRC Press, Boca Raton.
- Yan, L., Qiu-Zhou, X., 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256, 389–394.
- Yi, G., Allee, G., Knight, C., Dibner, J., 2005. Impact of glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. *Poult. Sci.* 84, 283–293.
- Zagmutt, F.J., Sempier, S.H., Hanson, T.R., 2013. Disease spread models to estimate highly uncertain emerging diseases losses for animal agriculture insurance policies: An application to the U.S. farm-raised catfish industry. *Risk Analysis* 33, 1924–1937.
- Zhang, K., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, Y., Peng, M., Chen, J., Ai, Q., 2017. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, nonspecific immunity, and disease resistance in relation to arginine catabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 468, 246–254.
- Ziegler, T.R., Bye, R.L., Persinger, R.L., Young, L.S., Antin, J.H., Wilmore, D.W., 1998. Effects of glutamine supplementation in circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am. J. Med. Sci.* 315, 4–10.
- Ziegler, T. R. Glutamine supplementation in bone marrow transplantation. *Br. J. Nutr.* 87, 9–15.

7. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Formulação (%) e composição analisada das dietas experimentais.

Ingredientes	Níveis de glutamina (%)				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Farelo de soja	42,53	42,53	42,53	42,53	42,53
Farinha de peixe	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Milho moído	47,72	47,49	47,26	47,04	46,80
Óleo de soja	0,57	0,57	0,57	0,57	0,58
L-Alanina	1,14	0,86	0,57	0,28	0,00
L-Glutamina	0,00	0,51	1,02	1,53	2,04
DL-Metionina	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
L-Treonina	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Fosfato Bicálcico	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
BHT ¹	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix Vit/Min ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto de colina	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Vitamina C ³	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
NaCl	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>Composição analisada (% matéria seca)</i>					
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4156	4146	4165	4185	4204
Proteína bruta	29,18	29,77	29,98	30,58	30,95
Matéria seca	92,90	92,72	92,13	93,18	92,82
Extrato etéreo	8,27	8,06	8,47	8,91	9,21
Fibra bruta	1,82	1,74	1,66	1,67	1,93
Matéria mineral	5,92	6,08	5,88	5,99	6,26

¹ Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante);

² Premix mineral e vitamínico (Composição kg⁻¹ de produto): Vit. A=1.200.000 UI; vit. D3=200.000 UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ác. fólico=1.200 mg; pantotenato de cálcio =12.000 mg; vit. C=48.000 mg; biotina =48 mg; colina =65.000 mg; ácido nicotínico =24.000 mg; Fe=10.000 mg; Cu=600 mg; Mn=4.000 mg; Zn=6.000 mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg;

³ Vitamina C: Rovimix® Stay-C® 35 – DSM Nutritional Products, Suíça;

Tabela 2. Perfil de aminoácidos totais e glutamina livre das dietas experimentais.

Aminoácidos totais (%) ¹	Níveis de suplementação de glutamina nas dietas (%)				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
<i>Aminoácidos essenciais</i>					
Arginina	1,57	1,59	1,64	1,58	1,54
Fenilalanina	1,30	1,32	1,31	1,24	1,23
Histidina	0,62	0,60	0,63	0,62	0,61
Isoleucina	1,06	1,05	1,07	1,06	1,04
Leucina	2,06	2,04	2,06	2,05	2,03
Lisina	1,39	1,35	1,43	1,43	1,36
Metionina	0,70	0,69	0,71	0,75	0,71
Metionina+Cistina	0,98	0,97	1,00	1,02	1,01
Treonina	1,11	1,09	1,13	1,13	1,12
Triptofano	0,29	0,28	0,29	0,27	0,28
Valina	1,20	1,16	1,19	1,16	1,15
<i>Aminoácidos não-essenciais</i>					
Ácido aspártico	2,56	2,49	2,59	2,64	2,61
Ácido glutâmico	4,41	4,80	5,41	6,06	6,56
Alanina	2,35	2,05	1,77	1,52	1,29
Cistina	0,28	0,28	0,29	0,28	0,30
Glicina	1,22	1,20	1,23	1,25	1,22
Glutamina (livre)	0,05	0,36	0,83	1,29	1,71
Prolina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Serina	1,25	1,22	1,27	1,27	1,28
Tirosina	0,94	0,94	0,96	0,87	0,84

¹ Concentrações de aminoácidos totais e livres determinadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC: High-Performance Liquid Chromatography).

Tabela 3. Peso médio inicial (PI), peso médio final (PF), ganho de peso médio (GP), consumo médio de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (S) de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias¹.

Glutamina (%)	PI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA	TCE	S (%)
0,0	4,43 ± 0,14	238,91 ± 2,61 ^b	234,48 ± 2,54 ^b	319,08 ± 11,99	1,36 ± 0,04 ^b	1,92 ± 0,01 ^b	97,73 ± 4,21
0,5	4,40 ± 0,11	243,15 ± 7,96 ^{ab}	238,75 ± 7,93 ^{ab}	319,80 ± 8,21	1,34 ± 0,04 ^{ab}	1,94 ± 0,02 ^{ab}	100,00 ± 0,00
1,0	4,43 ± 0,15	245,40 ± 5,67 ^{ab}	240,97 ± 5,60 ^{ab}	311,20 ± 15,41	1,29 ± 0,05 ^a	1,94 ± 0,01 ^{ab}	97,73 ± 4,21
1,5	4,35 ± 0,14	248,79 ± 2,66 ^a	244,43 ± 2,71 ^a	323,41 ± 8,97	1,32 ± 0,04 ^{ab}	1,95 ± 0,02 ^a	95,45 ± 4,86
2,0	4,43 ± 0,13	244,88 ± 7,39 ^{ab}	240,45 ± 7,31 ^{ab}	324,12 ± 8,28	1,35 ± 0,04 ^{ab}	1,94 ± 0,01 ^{ab}	94,32 ± 4,70
<i>P</i> value	0,724	0,025	0,023	0,157	0,033	0,018	0,067

¹ Os valores são médias de oito repetições por tratamento. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 4. Peso relativo do intestino (PRI), comprimento relativo do intestino (CRI), índice hepato-somático (IHS) e índice víscero-somático (IVS) de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias¹.

Glutamina (%)	PRI	CRI	IHS	IVS
0,0	2,26 ± 0,51 ^b	5,34 ± 0,52 ^c	2,21 ± 0,58	1,87 ± 0,91
0,5	2,61 ± 0,44 ^{ab}	5,58 ± 0,19 ^{bc}	2,42 ± 0,16	1,91 ± 0,83
1,0	2,83 ± 0,56 ^{ab}	6,33 ± 0,56 ^{ab}	2,75 ± 0,74	2,13 ± 0,80
1,5	2,86 ± 0,32 ^{ab}	6,17 ± 0,35 ^{ab}	2,57 ± 0,46	1,97 ± 0,46
2,0	3,06 ± 0,44 ^a	6,64 ± 0,62 ^a	2,73 ± 0,36	2,08 ± 1,20
<i>P</i> value	0,048	0,001	0,314	0,982

¹ Os valores são médias de oito repetições por tratamento. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 5. Morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias¹.

Segmento do intestino	Glutamina (%)					P value
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
<i>Proximal</i>						
Altura de vilos (µm)	498,2 ± 45,2 ^{bc}	482,8 ± 63,7 ^c	607,2 ± 106,8 ^{abc}	656,7 ± 21,1 ^a	628,7 ± 113,9 ^{ab}	0,002
Profundidade de cripta (µm)	53,2 ± 2,3	51,0 ± 4,5	49,8 ± 4,8	48,3 ± 4,2	50,2 ± 4,5	0,404
Relação vilos:cripta	9,4 ± 1,2 ^b	9,4 ± 0,7 ^b	12,8 ± 1,9 ^a	13,7 ± 1,2 ^a	12,5 ± 1,8 ^a	0,001
<i>Medial</i>						
Altura de vilos (µm)	392,6 ± 83,9	315,2 ± 87,6	391,3 ± 62,8	396,7 ± 62,7	418,9 ± 61,6	0,192
Profundidade de cripta (µm)	41,1 ± 6,6	40,1 ± 9,7	40,8 ± 5,7	36,4 ± 4,8	38,7 ± 5,4	0,766
Relação vilos:cripta	9,6 ± 1,6 ^{ab}	7,8 ± 0,5 ^b	9,6 ± 0,7 ^{ab}	10,9 ± 1,7 ^a	10,9 ± 1,3 ^a	0,002
<i>Distal</i>						
Altura de vilos (µm)	286,6 ± 79,7	331,1 ± 67,6	328,8 ± 56,9	311,1 ± 50,2	331,5 ± 41,7	0,692
Profundidade de cripta (µm)	55,4 ± 2,8	57,8 ± 4,2	50,4 ± 5,2	53,1 ± 5,5	54,0 ± 5,5	0,214
Relação vilos:cripta	5,2 ± 1,6	5,2 ± 0,3	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,1 ± 0,6	0,273

¹ Os valores são médias de 25 medidas por segmento para cada peixe. Foram amostrados 8 peixes por tratamento (n = 8). Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 6. Valores de matéria original (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) corporal de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias¹.

Glutamina (%)	MO (%)	MM (%)	PB (%)	EE (%)	EB (%)
0,0	71,84 ± 0,81	11,84 ± 1,37	56,41 ± 3,30	33,97 ± 4,24	5740 ± 211
0,5	71,34 ± 1,74	12,43 ± 1,49	55,60 ± 3,89	32,41 ± 5,90	5771 ± 173
1,0	71,55 ± 1,41	10,79 ± 1,56	55,18 ± 4,13	34,01 ± 6,81	5779 ± 309
1,5	70,11 ± 1,16	10,93 ± 2,46	53,12 ± 3,40	33,22 ± 4,19	6022 ± 126
2,0	71,73 ± 0,87	11,82 ± 1,62	54,24 ± 3,51	30,50 ± 2,68	6017 ± 131
<i>P</i> value	0,145	0,463	0,586	0,728	0,053

¹ Os valores são médias de oito repetições por tratamento. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 7. Atividade antioxidante no intestino e fígado de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina por 90 dias¹.

Parâmetro	Glutamina (%)					P value
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
<i>Intestino</i>						
GSH (nmol g ⁻¹)	0,48 ± 0,03 ^b	0,47 ± 0,08 ^b	0,49 ± 0,04 ^b	0,60 ± 0,04 ^a	0,56 ± 0,06 ^{ab}	0,002
MDA (nmol g ⁻¹)	59,56 ± 5,58	44,38 ± 20,69	47,94 ± 21,45	49,95 ± 19,43	49,09 ± 15,29	0,717
SOD (U ml ⁻¹)	5,22 ± 0,67	5,65 ± 0,30	5,34 ± 0,42	5,58 ± 0,39	5,35 ± 0,36	0,497
GPx (U g.prot ⁻¹)	2,21 ± 1,11	2,64 ± 1,18	4,55 ± 1,34	3,69 ± 1,61	3,25 ± 1,80	0,076
<i>Fígado</i>						
GSH (nmol g ⁻¹)	0,43 ± 0,05	0,49 ± 0,07	0,49 ± 0,06	0,48 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,296
MDA (nmol g ⁻¹)	59,55 ± 18,41	35,92 ± 10,26	38,89 ± 30,15	36,08 ± 24,94	44,78 ± 19,77	0,310
SOD (U ml ⁻¹)	6,10 ± 0,29	5,75 ± 0,85	5,52 ± 0,41	5,30 ± 0,38	5,39 ± 0,49	0,142
GPx (U g.prot ⁻¹)	0,57 ± 0,17	0,52 ± 0,20	0,99 ± 0,47	0,94 ± 0,29	1,19 ± 0,57	0,072

¹ Os valores são médias de seis repetições por tratamento. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 8. Eritrograma de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila* ¹.

Glutamina (%)	Eritrócitos ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)			Hematócrito (%)			Hemoglobina (g dL^{-1})		
	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value
0,0	1,87 ± 0,14	1,84 ± 0,18	0,533	31,58 ± 2,54	29,92 ± 2,82	0,329	7,37 ± 0,33	7,59 ± 0,35	0,290
0,5	1,83 ± 0,12	1,76 ± 0,14	0,418	31,50 ± 2,35	28,50 ± 3,30	0,290	7,66 ± 0,65	6,97 ± 0,58	0,419
1,0	1,83 ± 0,19	1,90 ± 0,45	0,791	32,90 ± 2,41	29,90 ± 4,75	0,376	7,92 ± 0,71	7,11 ± 0,96	0,323
1,5	1,90 ± 0,21	1,71 ± 0,23	0,151	32,25 ± 3,40	27,42 ± 3,07	0,081	7,67 ± 0,76	7,26 ± 0,60	0,141
2,0	1,90 ± 0,13	1,63 ± 0,32	0,137	31,00 ± 1,58	28,50 ± 2,45	0,119	7,61 ± 0,30	7,10 ± 0,97	0,291
<i>P</i> value	0,867	0,586		0,838	0,679		0,621	0,762	

¹ Os valores são médias de seis repetições por tratamento. Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores com letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo o teste *t*-pareado.

Tabela 9. Volume corpuscular média (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila* ¹.

Glutamina (%)	VCM (fL)			CHCM (%)		
	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value
0,0	168,88 ± 9,96	163,91 ± 17,21	0,554	23,43 ± 1,58	25,39 ± 2,46	0,143
0,5	171,12 ± 14,45	167,87 ± 30,00	0,822	24,45 ± 1,25	24,59 ± 3,73	0,935
1,0	178,93 ± 8,43	160,14 ± 17,23	0,142	24,42 ± 1,06	23,86 ± 1,08	0,405
1,5	170,65 ± 12,26	161,54 ± 18,16	0,332	23,84 ± 1,45	25,35 ± 1,02	0,064
2,0	164,00 ± 12,11	179,09 ± 27,66	0,256	24,59 ± 1,23	24,87 ± 2,30	0,803
<i>P</i> value	0,302	0,654		0,514	0,793	

¹ Os valores são médias de seis repetições por tratamento. Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores com letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo o teste *t*-pareado.

Tabela 10. Proteína plasmática total (PPT), Albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*¹.

Glutamina (%)	PPT (mg dL ⁻¹)			ALB (mg dL ⁻¹)			GLOB (mg dL ⁻¹)			A:G		
	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value
0,0	3,29 ± 0,49	3,73 ± 0,28	0,117	0,81 ± 0,10 ^B	1,01 ± 0,11 ^A	0,049	2,48 ± 0,42	2,72 ± 0,31	0,287	0,33 ± 0,04	0,38 ± 0,07	0,235
0,5	3,16 ± 0,22	3,46 ± 0,25	0,157	0,84 ± 0,18	1,07 ± 0,18	0,256	2,32 ± 0,21	2,39 ± 0,27	0,794	0,37 ± 0,09	0,46 ± 0,17	0,195
1,0	3,32 ± 0,17	3,53 ± 0,45	0,366	0,89 ± 0,11 ^B	1,02 ± 0,09 ^A	0,017	2,43 ± 0,17	2,51 ± 0,38	0,476	0,37 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,207
1,5	3,23 ± 0,34	3,56 ± 0,44	0,269	0,89 ± 0,13	1,01 ± 0,18	0,353	2,34 ± 0,35	2,54 ± 0,31	0,307	0,39 ± 0,15	0,40 ± 0,06	0,934
2,0	3,06 ± 0,25 ^B	3,78 ± 0,33 ^A	0,045	0,78 ± 0,09	1,03 ± 0,17	0,078	2,28 ± 0,23	2,75 ± 0,36	0,119	0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,09	0,454
<i>P</i> value	0,505	0,572		0,61	0,975		0,605	0,382		0,844	0,638	

¹ Os valores são médias de seis repetições por tratamento. Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores com letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo o teste *t*-pareado.

Tabela 11. Atividade sérica de lisozima e produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por monócitos de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis de suplementação de glutamina antes e após desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*¹.

Glutamina (%)	Óxido Nítrico (μmol)			Peróxido de Hidrogênio (nmol)			Lisozima ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value	Antes	Depois	<i>P</i> value
0,0	6,62 \pm 2,29	6,44 \pm 0,72	0,855	1,68 \pm 0,11 ^B	2,04 \pm 0,07 ^A	0,004	8,85 \pm 2,84 ^{bB}	12,56 \pm 1,69 ^{bA}	0,002
0,5	6,96 \pm 1,56	6,56 \pm 1,35	0,760	1,76 \pm 0,10 ^B	2,14 \pm 0,09 ^A	0,003	9,56 \pm 4,60 ^b	12,75 \pm 3,15 ^b	0,098
1,0	8,61 \pm 2,53	7,04 \pm 1,35	0,396	1,75 \pm 0,13 ^B	2,13 \pm 0,05 ^A	0,030	10,70 \pm 1,75 ^{ab}	11,35 \pm 3,34 ^b	0,868
1,5	8,20 \pm 1,43	7,51 \pm 2,37	0,492	1,84 \pm 0,14 ^B	2,12 \pm 0,07 ^A	0,010	14,97 \pm 2,39 ^a	17,86 \pm 2,09 ^a	0,057
2,0	6,28 \pm 1,84	6,80 \pm 2,62	0,803	1,84 \pm 0,09 ^B	2,05 \pm 0,04 ^A	0,017	13,59 \pm 3,55 ^{ab}	14,98 \pm 2,06 ^{ab}	0,860
<i>P</i> value	0,397	0,909		0,203	0,092		0,012	0,007	

¹ Os valores são médias de seis repetições por tratamento. Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores com letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes ($P < 0,05$) segundo o teste *t*-pareado.

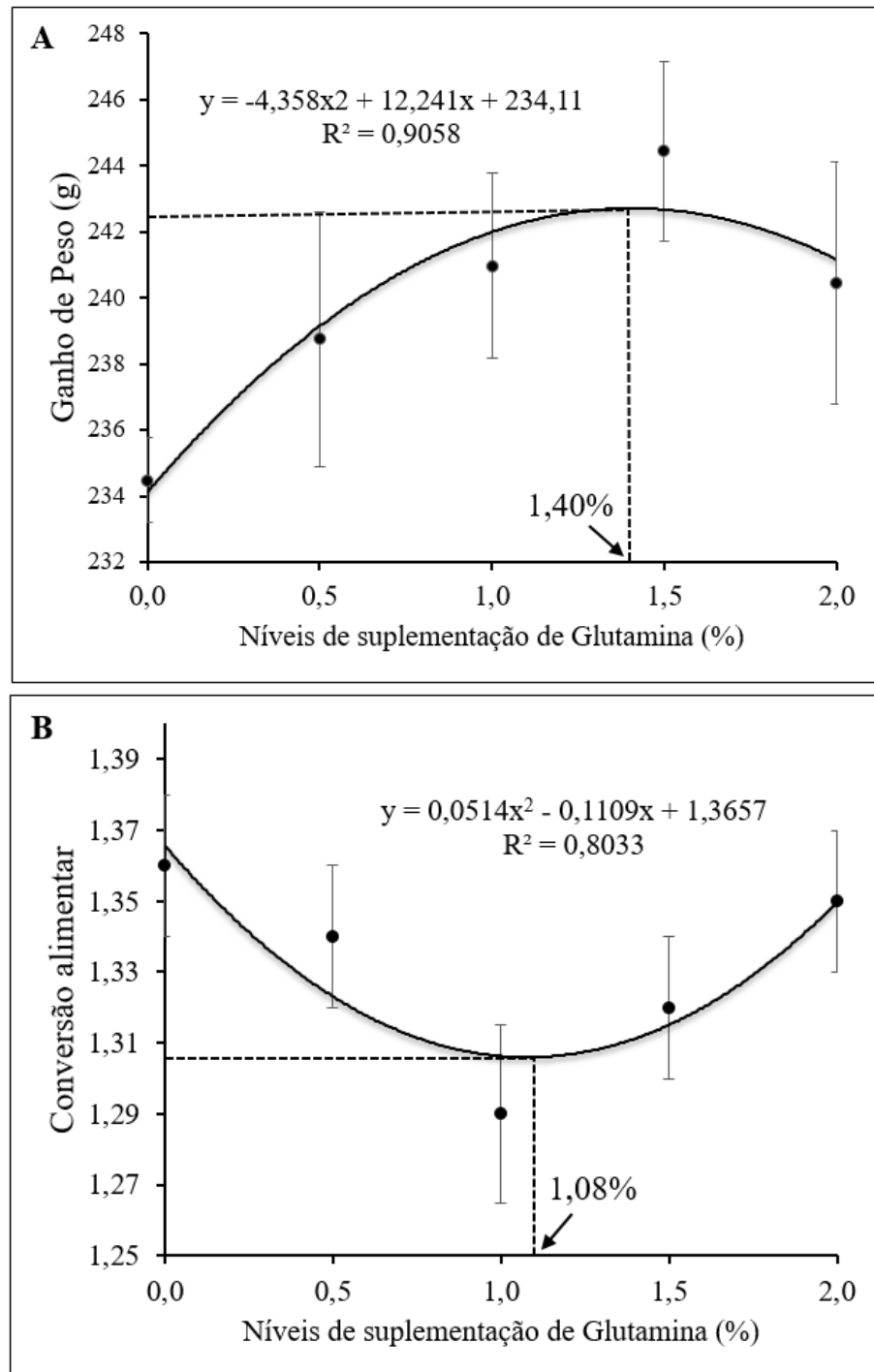


Figura 1. Dispersão e equação de regressão polinomial para ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) em função da suplementação de glutamina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

A aquicultura assume papel importante na produção de proteína animal para o consumo humano e as tendências mostram que sua importância para as gerações futuras será ainda maior, uma vez que essa atividade tem apresentado crescimento anual superior ao das demais indústrias de produção animal nas últimas décadas. Apesar da incidência de doenças ser considerada rotineira na produção animal, a intensificação dos sistemas de produção tem aumentado a disseminação e surto de doenças infecciosas. Assim, o estudo dos mecanismos de defesa e a compreensão de como nutrir e modular os diferentes componentes do sistema imunológico de peixes são cruciais para a prevenção, tratamento e controle de doenças. É sabido que a nutrição adequada é fundamental não apenas para atingir taxas de crescimento ótimas, mas também para manter a saúde dos peixes cultivados, fazendo com que estudos voltados à nutrição e saúde de peixes recebam destaque nos últimos anos.

A utilização da Gln objetivando melhor desempenho produtivo e melhores condições de saúde estão comprovadas por este estudo. Os resultados do estudo *in vivo* demonstram o potencial da Gln como melhorador de desempenho para essa espécie, uma vez que sua suplementação teve influência positiva nas características morfológicas do intestino, resultando em maior eficiência alimentar e ganho de peso. Sua ação na saúde foi também comprovada pela melhora na produção de moléculas importantes do sistema antioxidante e na resposta imunológica. Embora a suplementação de Gln tenha apresentado efeitos pontuais na resposta imune, como o aumento da concentração sérica de lisozima, esses efeitos não puderam ser avaliados de forma conclusiva pelo desafio bacteriano.

Vale ressaltar que os resultados foram obtidos utilizando-se dietas peletizadas, em função da estabilidade térmica do produto. Essa informação é importante para a indústria animal, uma vez que as dietas para peixes são, em sua maioria, extrudadas, processo no qual os ingredientes são submetidos à elevadas temperaturas e pressão. Dessa forma, novos estudos são necessários com o intuito de avaliar diferentes fontes de Gln. Atualmente, estão disponíveis no mercado fontes termo-resistentes desse aminoácido possibilitando novos estudos.

O estudo *in vitro* foi realizado com o intuito de elucidar alguns dos mecanismos de ação da Gln em células do sistema imune da tilápia-do-nilo. Com base nos resultados desse estudo, foi possível confirmar algumas das funções desse aminoácido já descritas em vertebrados superiores e outras espécies de peixes. A suplementação de Gln se mostrou essencial na atividade dos leucócitos, aumentando sua capacidade fagocítica, produção de substâncias bactericidas e, conseqüente, capacidade de eliminação de agentes invasores. Adicionalmente, a inclusão desse aminoácido nos meios de cultura teve influência positiva na proliferação de linfócitos. Apesar dessa característica já ter sido identificada em outros animais, esse foi o primeiro relato da ação da Gln na proliferação de linfócitos da tilápia-do-nilo, especificamente. Os resultados obtidos nesse estudo são interessantes pois destacam a importância da inclusão desse aminoácido em meios de cultura de células do sistema imune da tilápia-do-nilo constituindo informação valiosa e que deve ser considerada em estudos *in vitro* posteriores. Dados relacionados à influência da glutamina na liberação de citocinas e outros mediadores celulares necessitam, ainda, de estudos adicionais. Desta forma fica evidenciada a possibilidade de uso da Gln como aminoácido funcional, pela indústria de dietas para tilápia-do-nilo.