

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

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

Adriana Soliris Corredor Castillo

**Jaboticabal - São Paulo
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
(CAUNESP)



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

Adriana Soliris Corredor Castillo

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

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

Jaboticabal - São Paulo
2016

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

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

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

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

Bibliografia

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

CDU 639.3.043

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

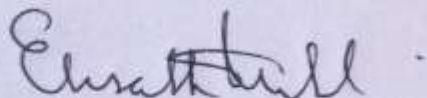
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

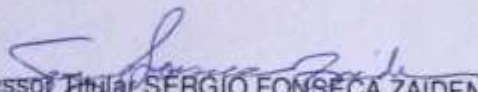
AUTORA: ADRIANA SOLIRIS CORREDOR CASTILLO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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



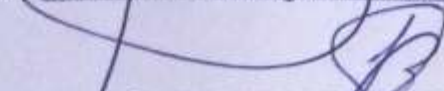
Prof. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



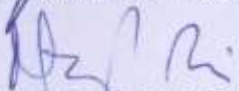
Professor Titular SÉRGIO FONSECA ZAIDEN
FUNDAÇÃO DE ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE



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



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



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

Jaboticabal, 20 de julho de 2016

Sumário

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APOIO FINANCEIRO

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

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

Só há duas maneiras de viver a vida:

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

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

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

32

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

33

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

34

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

35

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

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

Capítulo 3

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

1.1 Uso de restrição alimentar na aquicultura

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

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

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

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

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

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

1.2 Sistema imunológico dos peixes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Modelo biológico experimental

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

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

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

2. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

O β -GLUCANO AFETA O APROVEITAMENTO DO ALIMENTO E A DINÂMICA METABÓLICA DO PACU *Piaractus mesopotamicus* APÓS CICLOS CURTOS DE JEJUM E REALIMENTAÇÃO

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito da administração oral de β -glucano, no crescimento, aproveitamento do alimento e dinâmica metabólica de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a ciclos curtos de jejum e realimentação. Cento e oitenta peixes foram distribuídos em 18 tanques e alimentados durante sete semanas, de acordo com as estratégias: GC - Alimentação todo dia com ração comercial (RC); G 6/1- Alimentação com RC por 6 dias e jejum por 1 dia (6/1); G 2/1 - Alimentação com RC por 2 dias e jejum por 1 dia (2/1); GCS - Alimentação todo dia com RC, e com suplementação de 0,5% glucano (RCS), nos últimos 15 dias; GS 6/1 - Alimentação com RC por 6 dias e 1 dia de jejum, e RCS nos últimos 15 dias; GS 2/1 - Alimentação com RC, por 2 dias de alimentação e 1 dia de jejum, e RCS nos últimos 15 dias. Ao final, nove peixes de cada tratamento foram amostrados para determinação do crescimento, do aproveitamento do alimento e da concentração de metabólitos circulantes e teciduais. A taxa de crescimento específico foi menor nos peixes do G 2/1 e a conversão alimentar foi melhor em todos os peixes alimentados com β -glucano. Nos peixes do G 2/1, os níveis sanguíneos de glicose e de ácidos graxos não esterificados foram maiores e os níveis de triglicerídeos foram menores. As concentrações de glicogênio e lipídeos do fígado e a concentração de lipídeos do músculo diminuíram gradualmente nos peixes dos grupos 6/1 e 2/1, em relação ao GC. O β -glucano aumentou a glicemia nos peixes do G 2/1 e o número de células caliciformes no intestino anterior de todos os peixes. Concluindo, a estratégia alimentar com restrição alimentar mais intensa mobilizou mais severamente as reservas energéticas do fígado e músculo e o β -glucano não alterou esse perfil, a não ser por aumento da glicemia em condições de maior déficit energético. O β -glucano melhorou o aproveitamento do alimento independente da estratégia alimentar.

Palavras-chave: conversão alimentar, crescimento, metabolismo energético, peixe, imunoestimulante.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of oral administration of β -glucan on growth, feed utilization and metabolic dynamics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) subjected to short-term starvation and refeeding. A total of 180 pacus distributed in 18 tanks was fed for seven weeks, according to the strategies: GC - feeding daily with commercial feed (RC); G 6/1- 6-day feeding with RC and 1 restraint day (6/1); G 2/1 - 2-day feeding with RC and 1 restraint day (2/1); GCS - Feeding daily with RC and supplemented with 0.5% β -glucan (RCS) in the last 15 days; GS 6/1 - 6-day feeding with RC and 1 restraint day, and RCS in the last 15 days; GS 2/1 - 2-day feeding with RC and 1 restraint day, and RCS in the last 15 days. In the end, nine fish of each treatment were sampled for determination of growth, food utilization, morphology of the intestinal mucosa and concentration of circulating and tissue metabolites. The specific growth rate was lower in G 2/1 fish and feed conversion was better in all fish fed with β -glucan. In fish G 2/1, blood glucose and non-esterified fatty acids levels were higher and triglyceride levels were lower. Liver glycogen and lipid concentrations and lipid muscle concentration decreased gradually in G 6/1 and G 2/1 fish in relation to the CG. β -glucan increased glycemia in GS 2/1 fish and the number of goblet cells in the foregut of all fish groups. In conclusion, the feeding strategy with more intense food restriction mobilized more severely the energy reserves of the liver and muscles, and β -glucan caused increased blood glucose levels in higher energy deficit conditions. The β -glucan improved the use of feed independent on the feeding strategy.

Key-words: Feed conversion, growth, energy metabolism, fish, immunostimulant.

1. INTRODUÇÃO

A alta demanda por alimentos de qualidade para atender o crescimento populacional mundial tem impulsionado o desenvolvimento da aquicultura e de técnicas de manejo que otimizam a produção. A suplementação da dieta dos peixes com substâncias que melhorem o aproveitamento do alimento pode ser uma estratégia importante no manejo alimentar, na piscicultura.

Os β -glucanos, polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular de fungos, plantas e algumas bactérias, podem ser uma das substâncias com esse potencial. Em recente revisão, Meena et al. (2013) descreveram um efeito potencializador dos β -glucanos no aproveitamento dos alimentos e no crescimento de diferentes espécies de peixes susceptíveis de exploração, além de considerar os β -glucanos um imunoestimulante ideal para organismos com potencial para aquicultura.

Estudo com *Labeo rohita* alimentado β -glucano (0,025 e 0,05 %) descreveu aumento no ganho de peso e diminuição na taxa de conversão alimentar (Misra et al., 2006). Também houve melhora no ganho de peso e na taxa de crescimento específico de *Pseudosciaena crocea* alimentado com 0,09% de β -glucano (Ai et al., 2007). A suplementação dietética com 1 e 2 % de β -glucano melhorou o ganho de peso, a taxa de crescimento específico e conversão alimentar em *Cyprinus carpio* (Kühlwein et al., 2014), e resposta semelhante de crescimento foi relatada para *Cyprinus carpio koi*, ao ser alimentada com 0,5% de β -glucano (Lin et al., 2011). Entretanto, a suplementação dietética com 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% de β -glucano não afetou o desempenho produtivo de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Chagas et al., 2013), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Shelby et al., 2009), híbrido *Morone chrysops* X *Morone saxatilis* (Li et al., 2009), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Welker et al., 2007) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (Bagnia et al., 2005).

Os estudos com as diversas espécies de peixes, acima citados, utilizaram o β -glucano por períodos longos, superiores a quatro semanas. O efeito em curto prazo no desempenho produtivo de peixes não é conhecido.

Um número crescente de evidências sugere que os β -glucanos podem afetar fortemente o metabolismo de carboidratos em humanos e apresentam papel benéfico em doenças relacionadas à síndromes metabólicas.

Do ponto de vista da absorção intestinal, estudos em humanos sugerem que os β -glucanos podem ser fermentados pela microbiota intestinal, aumentando a taxa de crescimento e a produção de microrganismos ácido-lácticos (Kedia et al., 2008). De acordo com Khoury et al. (2012), os β -glucanos formam soluções altamente viscosas no intestino humano, e retardam a taxa de esvaziamento gástrico, o que seria a base dos efeitos benéficos do imunoestimulante.

No que se refere à eficiência dos processos intestinais e metabólicos, a possibilidade de que o organismo esteja mais predisposto ao aproveitamento do alimento durante a realimentação, após restrição de alimento, deve ser explorada.

No sistema produtivo, estratégias que incluem variações na oferta alimentar dos peixes, por aplicação de períodos de restrição alimentar e realimentação, podem ser usadas para aumentar o desempenho produtivo aumentando a eficiência do sistema (Chatakondi e Yant, 2001; Hayward et al., 1997; Känkänen e Pirhonen, 2009) e minimizando os problemas de qualidade da água (Turano et al., 2008). As estratégias estudadas incluem períodos de total privação alimentar, períodos de restrição de uma porcentagem da ração, períodos curtos de privação do alimento e realimentação alternados em ciclos (Rueda et al., 1998; Tian e Qin, 2003; Metón et al., 2003; Wang et al., 2005; Caruso et al., 2010; Takahashi et al., 2011; Caruso et al., 2011; Gimbo et al., 2015).

Na restrição alimentar, o organismo apresenta mecanismos bioquímicos de mobilização de nutrientes, especialmente reservas de glicogênio e lipídeo, para preservar as funções normais do corpo (Collins e Anderson, 1997; Mackenzie et al., 1998; Power et al., 2000).

Estudos prévios avaliaram as alterações fisiológicas que ocorrem durante a privação alimentar e realimentação em peixes pelo interesse no fenômeno do crescimento compensatório (Souza et al., 2000b; Davis e Gaylord, 2011; Takahashi et al., 2011). Segundo Rueda et al. (1998) e Cho et al. (2006), a exposição dos peixes a períodos de restrição alimentar seguidos de realimentação não compromete a capacidade de crescimento, mas ao contrário pode promover crescimento compensatório. Este fenômeno foi definido por Ali et

al. (2003) como uma fase de crescimento maior que a normal, resultado de uma realimentação adequada após um período de privação alimentar, sendo influenciado por diversos fatores, como a biologia da espécie, a fase de desenvolvimento dos peixes e a severidade da restrição alimentar aplicada.

Os resultados encontrados variam, mas os protocolos experimentais também são muito distintos. Em *Lates calcarifer*, restrição alimentar por uma semana induziu compensação completa do crescimento após realimentação por três semanas, mas com restrição de duas semanas ou mais, os peixes não apresentaram compensação (Tian e Qin, 2003). Na mesma espécie, restrição moderada (50-75% saciedade), durante duas semanas, induziu o crescimento compensatório total após cinco semanas de realimentação, mas isso não ocorreu com restrições mais severas (0-25% saciedade) (Tian e Qin, 2004). Compensação total do crescimento foi observada em *Paralichthys olivaceus* submetido a duas semanas de privação alimentar depois de 6 semanas de realimentação (Cho et al., 2006). Do mesmo modo, houve compensação total no crescimento de *Ictalurus punctatus* privado de alimento por 28 dias e realimentado por 56 dias (Gaylord e Gatlin, 2000).

Estudos sobre o uso dessas estratégias alimentares em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mostraram que exemplares juvenis apresentaram capacidade de crescimento compensatório total quando foram submetidos a estratégias de alimentação que incluíam seis semanas de restrição e sete semanas de realimentação durante um ano (Souza et al., 2003) ou quando foram submetidos a períodos de 60 dias de restrição seguidos de 30 dias de realimentação (Souza et al., 2000b). Entretanto, Takahashi et al. (2011) não observaram crescimento compensatório total em ciclos curtos (3 dias de restrição seguidos de 3 dias de realimentação), embora diferentes ciclos curtos, com períodos de realimentação mais longos promoveram crescimento compensatório completo (Urbinati, E.C. dados não publicados). Estudo com matrinxã (*Brycon amazonicus*), outra espécie neotropical, também mostrou a habilidade da espécie em apresentar crescimento compensatório total após ciclos curtos de restrição e realimentação (Urbinati et al., 2014).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o β -glucano oferecido a juvenis de pacu durante 15 dias, ao final de um período de sete semanas, com ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação (restrição

a cada seis ou dois dias), poderia influenciar as respostas de crescimento, aproveitamento do alimento e dinâmica do metabolismo energético, considerando que os mecanismos de aproveitamento dos nutrientes estão muito ativos. A escolha do pacu como modelo experimental levou em consideração a importância da espécie na piscicultura brasileira e os estudos prévios que mostram sua capacidade de responder ao manejo alimentar envolvendo restrição e realimentação (Souza et al., 2000b; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e delineamento experimental

O procedimento experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 04013/14), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

Um total de 180 peixes ($18,3 \pm 9,6$ g) foi distribuído aleatoriamente em 18 unidades experimentais (10 peixes por unidade), com o fluxo de água constante e fotoperíodo de 12 horas luz:12 horas escuro. Os peixes foram aclimatados a estas condições durante duas semanas, sendo alimentados até saciedade aparente, duas vezes por dia com ração comercial peletizada (28% de PB e 3.600 kcal EB kg^{-1}). O consumo de ração foi registrado para se estabelecer a taxa de alimentação a ser usada durante o período experimental.

Após a aclimação, os peixes foram pesados ($27,7 \pm 6,7$ g) e distribuídos em seis grupos, com três réplicas (unidades experimentais de 100 litros) por tratamento. Os peixes foram, então, alimentados com 3% do peso corporal, por sete semanas, de acordo com as seguintes estratégias alimentares:

- GC: Peixes alimentados diariamente com ração comercial RC (controle).
- G 6/1: Peixes alimentados com RC, em ciclos de 6 dias alimentados e 1 dia não alimentados.
- G 2/1: Peixes alimentados com RC, em ciclos de 2 dias alimentados e 1 dia não alimentados.

- GCS: Peixes alimentados diariamente com ração RC, e nos últimos 15 dias com ração suplementada com 0,5% de β -glucano (controle suplementado).
- GS 6/1: Peixes alimentados com ração RC em ciclos de seis dias de alimentação seguidos de um dia de jejum e nos últimos 15 dias com ração suplementada com 0,5% de β -glucano.
- GS 2/1: Peixes alimentados com ração RC em ciclos de dois dias de alimentação seguidos de um dia de jejum e nos últimos 15 dias com ração suplementada com β -glucano (0,5%).

As rações experimentais foram preparadas a partir de uma ração comercial extrusada que foi moída, misturada com 0,5 % de β -glucano e, então, peletizada. A ração controle era isenta do imunoestimulante, mas, foi submetida ao mesmo procedimento de moagem e peletização. O β -glucano era derivado de *Saccaromyces cerevisiae* (Macrogard®, Biorigin, São Paulo; http://www.biorigin.net/biorigin/macrogard/macrogard_en/index.html), com 70,9% de atividade, de acordo com o fornecedor. A quantidade de ração oferecida foi corrigida a cada 15 dias, quando os peixes foram pesados novamente.

2.2 Amostragens e análises

No último dia do experimento, nove peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína (1,0g/10 mL de álcool/15L de água) e pesados para a determinação da taxa de crescimento específico e a conversão alimentar, calculadas pelas fórmulas: taxa de crescimento específico (TCE) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})/\text{tempo}] \times 100$; conversão alimentar (CA) = consumo de alimento/GP (ganho de peso). Adicionalmente, foi calculada a uniformidade em peso dos peixes pela fórmula: $U = (N_{\pm 20} / N_t) \times 100$ proposta por Furuya et al. (1998), sendo: U = Uniformidade do lote: variação no peso total (%); $N_{\pm 20}$ = nº de animais com peso total $\pm 20\%$ em torno da média da unidade experimental; N_t = número total de peixes em cada unidade experimental.

Em seguida, foram coletadas amostras de sangue, por punção dos vasos caudais, amostras de músculo branco, fígado, gordura visceral e fragmentos de intestino anterior para determinação da altura das vilosidades intestinais e número de células caliciformes. O fígado e a gordura visceral foram pesados para cálculo

dos índices hepatossomático e gorduroviscerossomático [(peso do órgão / peso corporal)*100, respectivamente].

O sangue foi colocado em micro-tubos sem e com anticoagulante para a obtenção de soro e plasma. No plasma, foram determinadas as concentrações de glicose, triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados (Kits Labtest[®], códigos 133 e 87, e Kit Randox, NEFA, código FA 115, respectivamente). No soro, foram determinadas as concentrações de proteína total (Kit Labtest[®] código 99) e colesterol (Kit Labtest[®], código 76).

As amostras de fígado e de músculo branco foram utilizadas para a determinação das concentrações de glicogênio hepático (Perry et al., 1988) lipídeo total hepático e muscular (Bligh e Dyer, 1959) e de proteína muscular (Bradford, 1976).

Os fragmentos do intestino anterior foram abertos longitudinalmente, fixados em papel cartonado, lavados com solução salina 0,6% e fixados em formalina tamponada 10% (pH 7,2) durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram preparadas para inclusão em historesina. Seis cortes seriados (3 µm de espessura) foram corados com Hematoxilina e Floxina e PAS - Alcian Blue. Cinco campos foram fotografados com o auxílio de câmera fotográfica digital (Leica DFC 295) acoplada a microscópio (Leica-DM 2500) e as imagens foram analisadas pelo programa de captura e análise de imagens LAS V.3.8 (Leica, Germany).

Para a determinação das variáveis foram escolhidas aleatoriamente três fotomicrografias por lâmina com uma tabela de randomização. Foi medida a altura de cinco vilosidades (Mello et al., 2013). Para a contagem das células caliciformes, uma grade com cinco quadros (50 x 50 µm cada) compostos por linhas pontilhadas e contínuas foi sobreposta a cada uma das fotos para aleatorizar a área de contagem. A contagem das células foi realizada em todos os quadros, incluindo as células sobre as linhas pontilhadas e descartando as que se encontraram sobre as linhas contínuas (Gundersen et al., 1977). Foi padronizado que a contagem deveria atingir um número mínimo de 100 enterócitos por lâmina (adaptado de Ferguson et al., 2010). Os resultados obtidos foram convertidos em porcentagem do número de células em cada 100 enterócitos.

Durante o experimento, foram registradas diariamente a temperatura (26,7 ± 0,7 °C) e concentração de oxigênio dissolvido (6,3 ± 0,75 mg L⁻¹) na água das

unidades experimentais. No último dia do período experimental, foi determinada a concentração de amônia total ($0,256 \pm 0,033 \text{ mg L}^{-1}$).

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos em esquema fatorial três (estratégias alimentares) x dois (níveis de glucano), com três repetições cada. Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade e homogeneidade pelo teste de *Cramér-von Mises e Brown-Forsythe*. Quando necessário, os dados foram transformados para que as premissas fossem satisfeitas (glicogênio hepático e proteína muscular com $\log_{10}$), sendo, então, submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando encontrada diferença, as médias foram submetidas ao teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc).

3. RESULTADOS

Para avaliar se a administração oral de β -glucano afeta a dinâmica do crescimento, do aproveitamento do alimento e do metabolismo energético, nós alimentamos peixes juvenis em ciclos de seis ou dois dias de alimentação seguidos de um dia de jejum, durante sete semanas, sendo que o β -glucano foi oferecido só nos últimos 15 dias de alimentação dos peixes suplementados.

3.1. Indicadores produtivos e de crescimento

3.1.1 Crescimento e conversão alimentar

A taxa de crescimento específico (TCE) diferiu ($p = 0,0403$) entre as estratégias alimentares, sendo menor nos peixes do G 2/1. A TCE não foi afetada pela suplementação dietética com o β -glucano ($p = 0,5772$) (Figura 1A).

A conversão alimentar (CA) não foi afetada pelas estratégias alimentares ($p = 0,0553$), mas a administração oral de β -glucano melhorou a CA, independente da estratégia ($p = 0,0158$) (Figura 1B).

3.1.2 Uniformidade de peso do lote e sobrevivência

A sobrevivência foi de 100% em todos os grupos durante o período experimental.

A uniformidade do peso dos peixes não variou entre as estratégias alimentares ($p = 0,3275$) ou entre os grupos suplementados ou não com β -glucano ($p = 0,2743$). Seus valores variaram de 67,15 a 82,03 %.

3.2 Indicadores metabólicos circulantes

3.2.1 Glicose plasmática

As estratégias alimentares afetaram os níveis de glicose circulante ($p < 0,0001$). Observamos um aumento gradativo da glicose circulante, à medida que aumentava a intensidade da restrição alimentar, ocorrendo o mesmo perfil nos peixes com e sem suplementação com β -glucano. Entre os peixes que receberam o β -glucano, os níveis de glicose circulante foram mais elevados nos peixes do G 2/1 ($p = 0,0147$) que nos peixes do G 6/1 e GC. Comparando os grupos suplementados ou não, o β -glucano intensificou o aumento da glicemia nos peixes do G 2/1 (Figura 2A).

3.2.2 Triglicerídeos plasmáticos

Os níveis plasmáticos de triglicerídeos apresentaram os níveis mais baixos nos peixes do G 2/1 ($p < 0,0001$), enquanto não houve diferença entre os peixes das outras duas estratégias. Este perfil foi observado em ambos os grupos de peixes, suplementados ou não com β -glucano. O β -glucano não afetou esta resposta ($p = 0,3916$) (Figura 2B).

3.2.3 Ácidos graxos não esterificados plasmáticos (AGNE)

As concentrações plasmáticas de AGNE foram menores nos peixes do GC e aumentaram, de forma gradual, nos peixes das estratégias 6/1 e 2/1 ($p < 0,0001$). O mesmo comportamento foi observado nos peixes que receberam ou não a ração suplementada com β -glucano. O imunoestimulante não afetou esta resposta ($p = 0,096$) (Figura 2C).

3.2.4 Colesterol sérico

As concentrações séricas de colesterol não diferiram entre os peixes dos diferentes protocolos alimentares ($p = 0,6365$) nem entre os grupos que receberam as rações, suplementadas ou não com β -glucano ($p = 0,4939$) e variaram de 115,161 a 200,919 mg/dL.

3.2.5 Proteína total sérica

As concentrações de proteína total circulante não foram afetadas pelos fatores testados, ou seja, pelas estratégias alimentares aplicadas ($p = 0,879$) e pela suplementação com β -glucano ($p = 0,0747$) e variaram de 7,078 a 10,456 g/dL.

3.3. Indicadores teciduais (metabólicos e histológicos)

3.3.1 Glicogênio hepático

As concentrações de glicogênio hepático foram reduzidas gradualmente nos peixes dos G 6/1 e G 2/1 ($p < 0,0001$) em relação ao GC. O mesmo comportamento foi observado nos peixes que receberam ou não a suplementação de β -glucano. O imunoestimulante não afetou esta resposta ($p = 0,5776$) (Figura 3A).

3.3.2 Lipídeo total hepático

As concentrações de lipídeo total hepático seguiu o perfil verificado nos níveis de glicogênio. Os níveis mais elevados foram observados nos peixes do GC, com redução crescente nos peixes dos G 6/1 e G 2/1 ($p < 0,0001$). A mesma resposta foi observada nos peixes que receberam ou não a suplementação de β -glucano. O imunoestimulante não afetou esta resposta ($p = 0,2176$) (Figura 3B).

3.3.3 Lipídeo total muscular

As concentrações de lipídeo total muscular mais elevadas foram observados nos peixes do GC e naqueles do G 6/1 ($p < 0,0001$). Valores mais baixos foram verificados nos peixes do protocolo 2/1. A mesma resposta foi observada nos peixes que receberam ou não a suplementação de β -glucano. O imunoestimulante não afetou esta resposta ($p = 0,5896$) (Figura 3C).

3.3.4 Proteína muscular

As concentrações de proteína muscular dos peixes não foram alteradas pelas estratégias alimentares aplicadas ($p = 0,0891$), nem pela suplementação com β -glucano ($p = 0,8359$) e variaram de 42,6 a 60,4 mg/g.

3.3.5 Índices hepatossomático (IHS) e de gordura visceral somático (IGVS)

Os valores do IHS não foram influenciados pelas estratégias alimentares ($p = 0,1407$), e pela suplementação dietética com β -glucano ($p = 0,2445$). Os valores deste índice variaram de 0,63 a 1,89%. Do mesmo modo, o IGVS não mostrou diferença entre as estratégias ($p = 0,0940$) e entre suplementação ou não com o imunoestimulante ($p = 0,3717$). Os valores variaram de 0,49 a 1,79 %.

3.3.6 Vilosidades intestinais

Os valores médios da altura das vilosidades intestinais diferiram ($p=0,0101$) (Figura 4A) entre as estratégias alimentares, sendo menores nos peixes do G 2/1, mas não foram diferentes entre os do G 6/1 e do controle. Não observamos diferença significativa entre os peixes suplementados e os não suplementados com glucano ($p=0,7304$).

3.3.7 Células caliciformes

O número de células caliciformes foi maior no grupo controle e diminuindo segundo o aumento da restrição alimentar ($P<0,0001$) (Figura 4B). Os menores valores foram encontrados nos pacus do G 2/1. A suplementação com glucano também causou diferenças significativas observando-se um número de células caliciformes maior nos peixes alimentados com o imunoestimulante ($P<0,0001$).

A morfologia das células caliciformes é mostrada na Figura 5. Observamos no epitélio do intestino anterior de pacus que receberam β -glucano células caliciformes com evidente presença de grânulos secretórios e maior preenchimento por mucinas (ácidas e neutras) mostrando formato piriforme (figuras 5B, 5D, 5F), em contraste com os pacus não suplementados que apresentaram células caliciformes com menos conteúdo de mucinas e formato fusiforme (figuras 5A, 5C, 5E).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, juvenis de pacu foram submetidos a ciclos curtos de jejum e realimentação durante sete semanas e nos últimos 15 dias receberam alimento suplementado com β -glucano, como possível estratégia para melhorar o aproveitamento de nutrientes. O β -glucano melhorou o aproveitamento do

alimento, independente da estratégia alimentar dos peixes e modulou os níveis de glicose nos peixes expostos à estratégia mais severa de restrição alimentar (restrição a cada dois dias).

O β -glucano, a 0,5% na dieta, oferecido por 15 dias, melhorou a conversão alimentar independente da estratégia alimentar testada. Diferentemente de nossa pesquisa, em que o β -glucano foi oferecido por período de apenas 15 dias e com alternância cíclica de alimentação e jejum, outros estudos também mostraram melhora da conversão alimentar, embora tenham utilizado outras concentrações do produto e oferta diária, por períodos longos. O efeito do β -glucano obtido em nosso estudo se deu pela oferta do produto por 15 dias independente da estratégia alimentar. A inclusão de 1% e 2% de β -glucano em dieta purificada de *Cyprinus carpio* melhorou a conversão alimentar em relação à inclusão de 0,1% ou não inclusão, após 8 semanas (Kühlwein et al., 2014). Menor taxa de conversão alimentar também foi descrita em *Labeo rohita* alimentados com 0,025 % e 0,05 % de β glucano por 56 dias (Misra et al., 2006).

Não encontramos na literatura relatos em peixes que possam dar embasamento aos nossos resultados da influência do glucano na modulação da glicemia nos peixes do G 2/1, destacando que, em nosso estudo, os peixes se encontravam em uma condição nutricional de maior eficiência dos processos absorptivos e metabólicos, e mais preparados para o aproveitamento dos nutrientes durante a realimentação, após restrição de alimento.

A glicemia aumentou à medida que aumentou a restrição, sugerindo ativação dos processos bioquímicos compensatórios de gliconeogênese para atendimento da demanda energética dos peixes (Drew et al., 2008; Polakof et al., 2012). A administração do β -glucano não alterou esse perfil, mas intensificou a disponibilidade de glicose nos peixes que passaram por maior privação do alimento. Diferente de nosso estudo, Misra et al. (2006) relataram redução da glicemia, a partir de 14 dias de tratamento em *Labeo rohita* alimentados diariamente com 0,025 % e 0,05 % de β -glucano, durante 56 dias. Em trutas que foram alimentadas diariamente com 0,1%; 0,5% e 1.0% de β -glucano, por quatro semanas, a glicemia não se alterou em relação ao grupo de peixes que não recebeu o imunoestimulante (Jeney et al., 1997).

Recentes evidências sugerem que, em humanos, os β -glucanos afetam fortemente o metabolismo de carboidratos, com papel benéfico em doenças relacionadas à síndromes metabólicas. Essa ação parece ocorrer em nível de absorção intestinal. Os β -glucanos podem ser fermentados pela microbiota intestinal (Kedia et al., 2008) e formar soluções altamente viscosas (Khoury et al., 2012), alterando assim a microbiota e retardando a taxa de esvaziamento gástrico, o que colaboraria para os efeitos benéficos do produto (Thronde e Henry, 2011). Estudos anteriores mostraram claras diferenças na digestão de amido, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e na resposta glicêmica dependendo do peso molecular, nível de pureza e métodos de preparação do β -glucano (Thondre e Henry, 2009; Thondre et al., 2010). Confirmando, Regand et al. (2009) analisaram o efeito do processamento de alimentos com diferentes bioatividades sobre as propriedades físico-químicas e fisiológicas do β -glucano da aveia e encontraram que o processamento alterava a viscosidade intestinal promovida pelo β -glucano e a resposta glicêmica.

Em nosso estudo, nós avaliamos a resposta histológica do epitélio intestinal dos peixes. O número das células caliciformes no epitélio intestinal reduziu gradativamente à medida que a restrição de alimentos aumentou. Diferentes alterações no epitélio intestinal de peixes durante período de jejum já foram descritas (Zaldúa e Naya, 2014), incluindo redução do número e altura das vilosidades da mucosa (Gaucher et al., 2012), que nós encontramos em nosso estudo, e também aumento (Gaucher et al., 2012) e redução (Zeng et al., 2012) do número das células caliciformes, no último caso em concordância com nossos achados.

O β -glucano promoveu aumento do número das células caliciformes, independente do tratamento, sugerindo alteração no processo absorptivo e participação do imunoestimulante na formação de soluções viscosas, como observado em intestino humano (Reyna et al., 2003; Thronde e Henry, 2011; Khoury et al., 2012).

A microbiota intestinal de animais aquáticos é mais fluida que dos vertebrados terrestres e é altamente sensível às mudanças dietéticas. Em peixes, nutracêuticos, como probióticos, prebióticos, simbióticos e imunoestimulantes afetam a microbiota intestinal (Ringo et al., 2016). Sobrevivência aumentada de larvas de *Scophthalmus maximus* foi atribuída ao β -glucano e sua habilidade de

modular a fisiologia, a imunidade e a microbiota dos animais (Miest et al., 2016). O β -glucano também melhorou a contagem de *Vibrio*, entre outros parâmetros no *Trachinotus ovatus* (Huu et al., 2016).

O β -glucano, a 0,5% na dieta, oferecido por 15 dias, não afetou o crescimento dos peixes, independente da estratégia alimentar testada. Diferentes estudos têm mostrado que após privação alimentar, na realimentação, os peixes conseguem crescer aceleradamente até atingir o mesmo tamanho e peso dos que foram alimentados continuamente (Gaylord e Gatlin, 2000; Ali et al., 2003; Tian e Qin, 2004; Cho et al., 2006). No presente estudo, observamos que a severidade da restrição impediu a recuperação do crescimento dos peixes G 2/1. O mesmo não ocorreu com os peixes do grupo 6/1 que apresentaram a mesma TCE dos peixes alimentados todos os dias. Na mesma espécie, Takahashi et al. (2011) não observaram crescimento compensatório total nos peixes submetidos a ciclos curtos de 3 dias de restrição seguidos de 3 dias de realimentação, embora, de acordo com Urbinati, E.C. (dados não publicados) em ciclos curtos de 6/1 e 3/1 (dias de realimentação/dia de jejum), com período de realimentação mais longo que o da estratégia 2/1, o pacu apresentou crescimento compensatório completo, como observado no presente estudo nos peixes do grupo 6/1.

Em relação ao uso de β -glucano, diferentemente do que observamos, outros estudos relataram maior crescimento dos peixes por influência do imunoestimulante (Misra et al., 2006; Kühlwein et al., 2014). Também houve melhora no ganho de peso e na taxa de crescimento específico de *Pseudosciaena crocea* alimentado com 0,09% de β -glucano (Ai et al., 2007) e em *Cyprinus carpio koi* alimentada com 0,5% do produto (Lin et al., 2011).

Para preservar a saúde e o funcionamento dos órgãos vitais, os peixes submetidos à privação de alimento redistribuem os recursos para os sistemas biológicos essenciais como estratégia de adaptação ao jejum, destacando-se em zebrafish diminuição na atividade metabólica, no metabolismo de lipídeos, na biossíntese de proteínas, na proteólise e na respiração celular, além de aumento na gliconeogênese (Drew et al., 2008).

Os resultados deste estudo seguem um padrão conhecido em outros peixes. Durante os períodos de privação alimentar, os teleósteos transformam suas reservas de glicogênio hepático em glicose, transportada pelo sangue para

uso nos diferentes tecidos, pelo menos durante o estágio inicial do jejum (Souza et al., 2000b; Figueiredo-Garutti et al., 2002). Neste estudo, observamos os níveis mais elevados de glicose nos peixes submetidos a jejum, especialmente os peixes do grupo G 2/1, como citado anteriormente.

Inversamente, os níveis de glicogênio hepático foram menores nos peixes restritos comparados aos alimentados, e com diferença entre os peixes das estratégias 6/1 e 2/1. Isto se justifica pela mobilização da reserva energética, por glicogenólise. Souza et al. (2000b) não observaram diferença na glicemia de juvenis de pacu submetidos à restrição alimentar por 60 dias, em relação aos alimentados continuamente, mas relataram redução do glicogênio hepático no início da restrição, sugerindo que esta é uma reserva prontamente disponível para favorecer a homeostase glicêmica, mas passa a ser preservada em períodos crônicos de restrição. Em matrinxã *Brycon cephalus*, também houve diminuição dos níveis de glicogênio hepático 72 horas depois de jejum (Figueiredo-Garutti et al., 2002). Uma intensa mobilização de glicogênio foi observada em juvenis *Sparus aurata* após uma semana de jejum (Peres et al., 2011).

Segundo Souza et al. (2000b), a homeostase glicêmica pode ser restabelecida pela mobilização de outras fontes de energia como os lipídios e as proteínas. Estes autores observaram que os peixes exibiram redução na concentração lipídica durante a privação alimentar e recuperação quando foram realimentados. Isto pode ser explicado pelo modelo lipostático proposto por Jobling e Johansen (1999), segundo o qual, durante a restrição alimentar, as reservas lipídicas são utilizadas para a manutenção do metabolismo dos peixes, por lipólise, e, durante a realimentação, os peixes restabelecem os estoques lipídicos. No presente estudo, observamos maior atividade lipolítica nos peixes do grupo G 2/1, com os níveis mais elevados de ácidos graxos livres circulantes e diminuição na concentração de triglicerídeos. Aumento nos níveis de ácidos graxos livres também foi descrito em pacu após 60 dias de jejum (Souza et al., 2000b) e *Brycon cephalus* submetidos a 48 h de jejum (Figueiredo-Garutti et al., 2002).

Em relação às reservas teciduais, a concentração hepática de lipídeos foi menor nos peixes em restrição. Nos peixes do grupo G 2/1, a concentração foi menor que nos do grupo G 6/1, indicando maior severidade na restrição.

Takahashi et al. (2011) e Urbinati et al. (2014) mostraram perfis semelhantes em *Piaractus mesopotamicus* e *Brycon amazonicus*, respectivamente.

No tecido muscular, a concentração de lipídeos dos peixes G 2/1 estava reduzida em relação aos outros grupos. Takahashi et al. (2011) e Tian et al. (2010) também observaram diminuição em *Piaractus mesopotamicus*, depois de 36 dias de ciclos repetidos de três dias de restrição e três de realimentação e em *Cynoglossus semilaevis* a partir dos quatro dias de jejum, enquanto Urbinati et al. (2014) relataram uma redução significativa de lipídios no músculo de *Brycon amazonicus* após 60 dias de ciclos de dois dias de restrição seguidos por três ou quatro dias de realimentação. Os índices IHS e IGVS, que indicam depósitos de lipídeos, não foram afetados.

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que entre as estratégias alimentares testadas a 6/1 teve o mesmo rendimento fisiológico que a controle, embora no período de 49 dias de experimento houvesse uma economia de 7 dias sem alimentação. Além disso, a administração oral de β -glucano, nos últimos 15 dias de alimentação, promoveu melhor aproveitamento do alimento e modulou a disponibilidade de glicose, aumentando-a nos peixes em condições de restrição mais intensa de alimento.

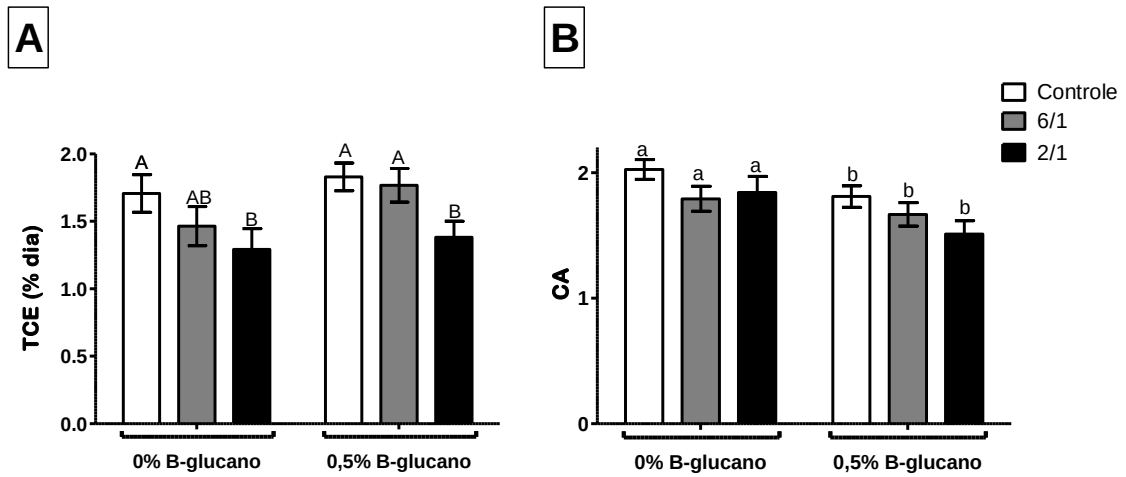


Figura 1. Taxa de crescimento específico (TCE) (A) e conversão alimentar (CA) (B) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por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

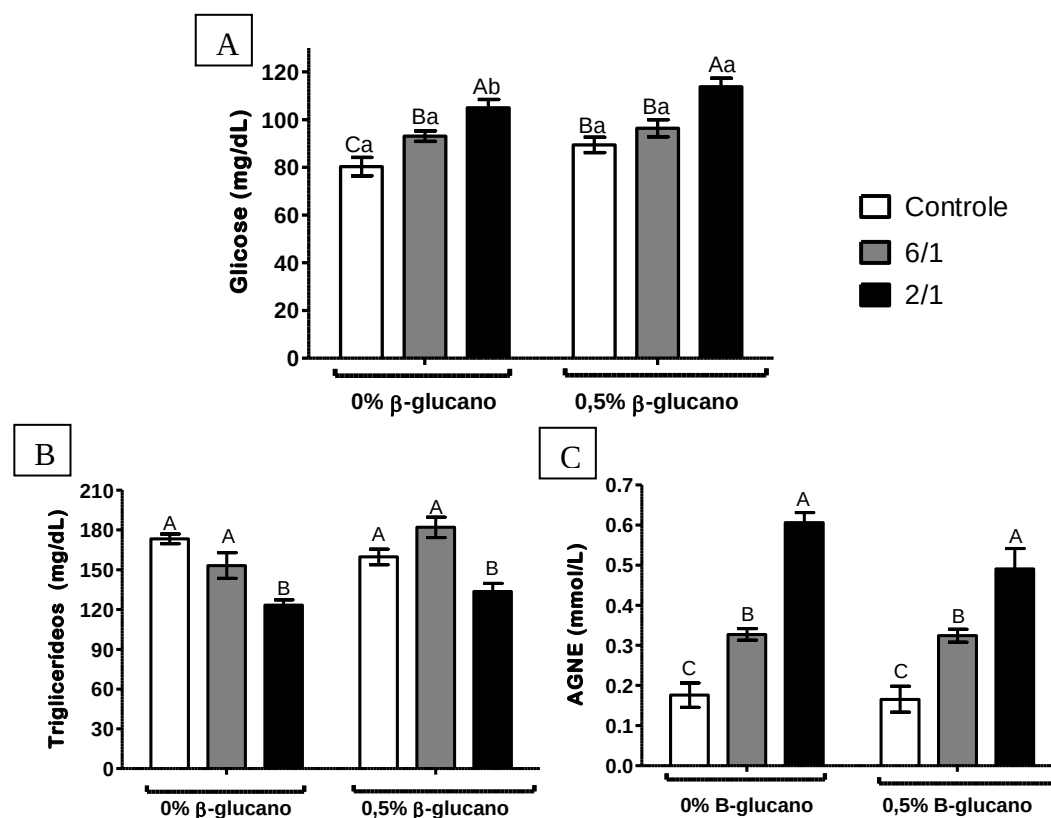


Figura 2. Concentrações plasmáticas de glicose (A), de triglicerídeos (B) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (C) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1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

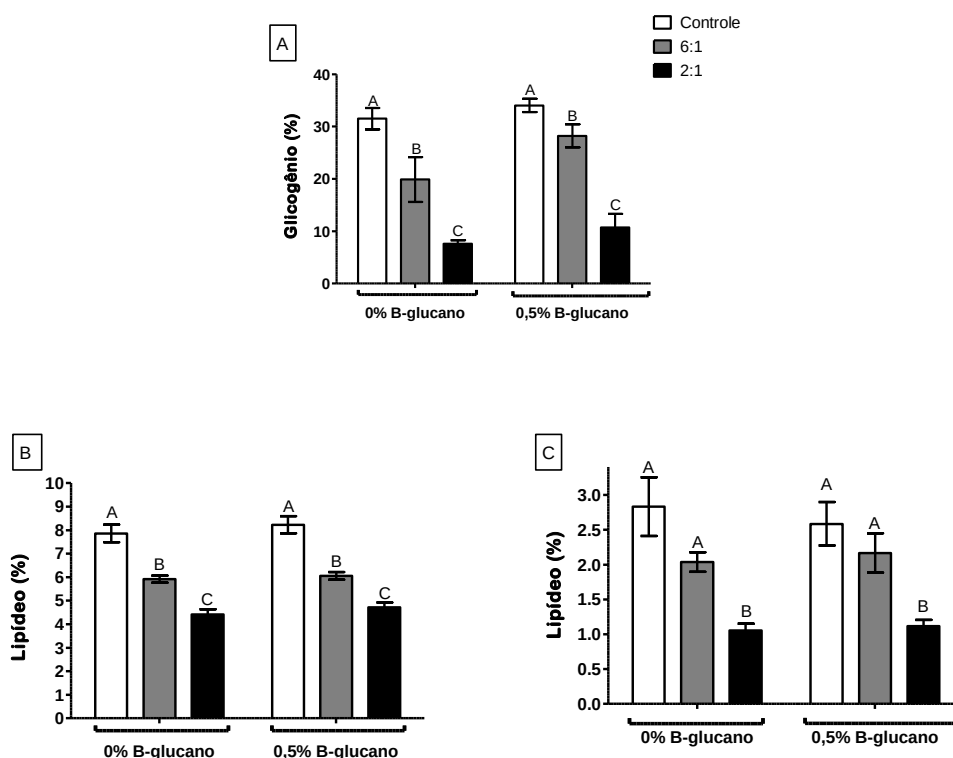


Figura 3. Concentrações de glicogênio (A) e lipídeos (B) no tecido hepático e lipídeos (C) no tecido muscular em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação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

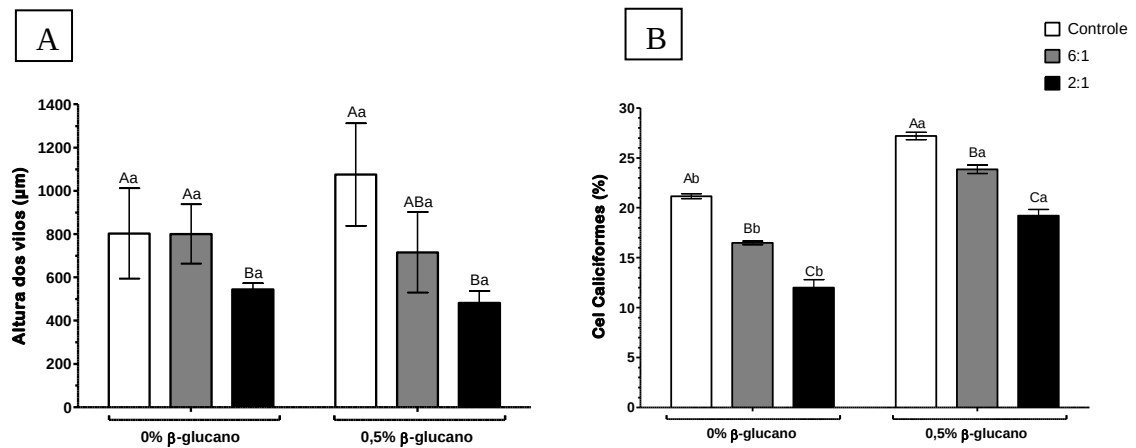


Figura 4. Altura das vilosidades intestinais (A) e número de células caliciformes (B) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação, com ou sem suplementação de β -glucano. Controle - alimentação diária, 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras maiúsculas indicam diferença entre estratégias de alimentação e letras minúsculas entre níveis de β -glucano.

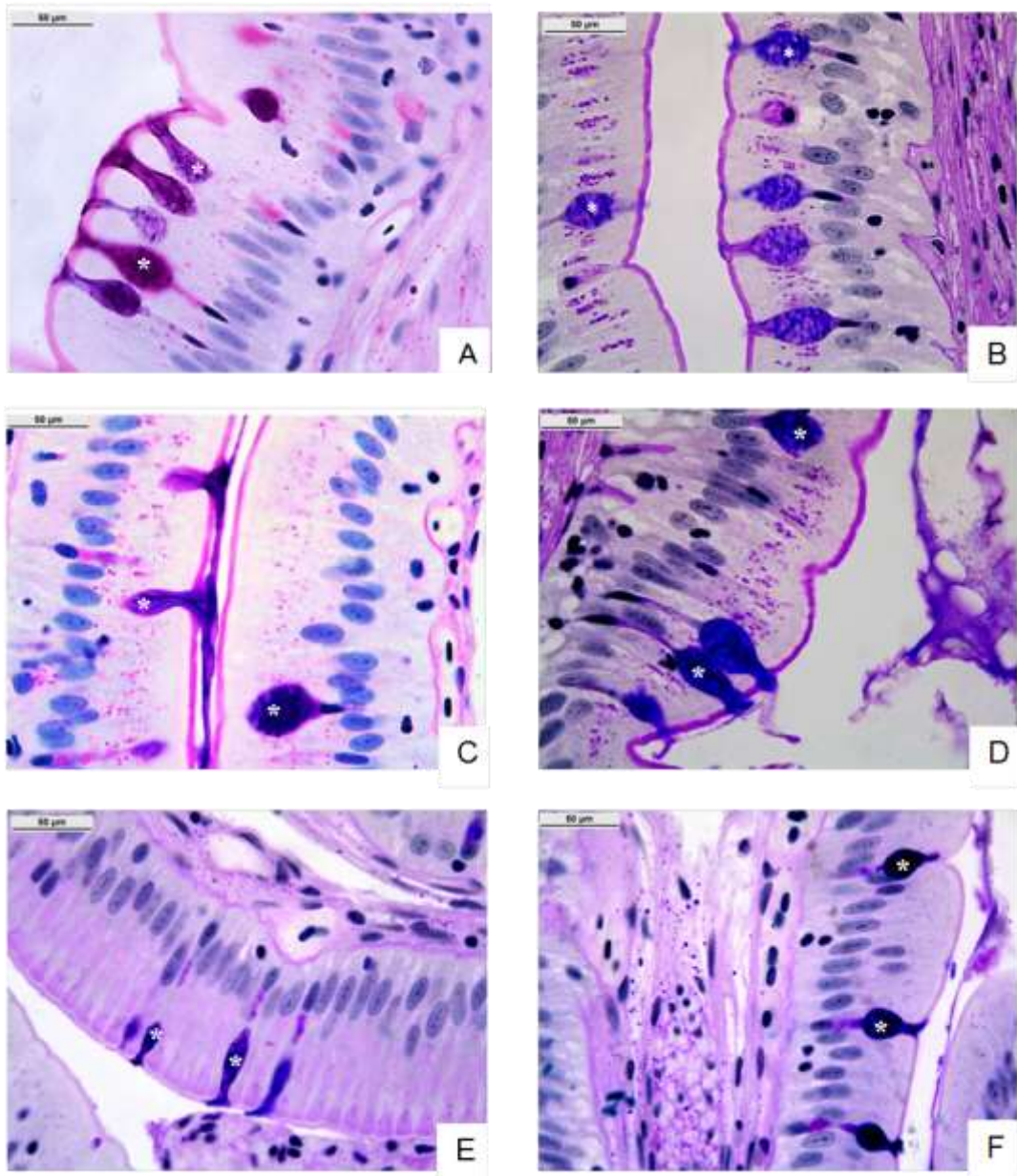


Figura 5. Fotomicrografias de células caliciformes (*) na porção anterior do intestino (PAS - Alcian Blue, 100x) em pacus submetidos a diferentes protocolos de alimentação. Controle - alimentação diária sem (A) e com β -glucano (B), 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia sem (C) e com β -glucano (D), 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia sem (E) e com β -glucano (F).

6. REFERÊNCIAS

- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary beta-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish and Shellfish Immunology**, n. 22, p. 394-402. 2007.
- ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R.J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries**, n. 4, p. 147-190. 2003.
- BAGNIA, M.; ROMANOB, N.; FINOIAA, M G.; ABELLIC, L.; SCAPIGLIATIB, G.; TISCARD, P G.; SARTIE, M.; MARINOA, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, n. 18, p. 311-325. 2005.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, n. 37, p. 911-917. 1959.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254. 1976.
- FURUYA, W. M.; DE SOUZA, S.R.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. RIBEIRO, R.P. Dietas peletizada e extrusada para machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de terminação. **Ciência Rural**, Santa Maria v.28, n.3, p.483-487. 1998.
- CARUSO, G., MARICCHIOLO, G.; MICALÉ, V.; GENOVESE, L.; CARUSO, R.; DENARO, M.G. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on hematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. **Fish Physiology and Biochemistry**, n. 36, p. 71-83. 2010.
- CARUSO, G.; DENARO, M.G.; CARUSO, R.; MANCARI, F.; GENOVESE, L.; MARICCHIOLO, G. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). **Marine Environmental Research**, n. 72, p. 46-52. 2011.

CAVALLI, L.; CHAPPAZ, R.; BOUCHARD, P.; BRUN, G. Food availability and growth of the brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in a French alpine lake. **Fisheries Management and Ecology**, v 4, n.3, 167-177. 1997.

CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MORAES, F. R. Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com β -glucano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 899-905. 2013.

CHATAKONDI, N.G.; YANT, R.D. Application of compensatory growth to enhance production in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of World Aquaculture Society**, n. 32, p. 278–285. 2001.

CHO, S H.; LEE, S.; PARK, B.; JI, S. Compensatory growth of juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* L., and changes in proximate composition and body condition indexes during fasting and after refeeding in summer season. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 2, p. 168-174. 2006.

COLLINS, A. L.; ANDERSON, T. A. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 6, p. 1158-1165. 1997.

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

DREW, R.E.; KENNETH J.R.; MATTHEW, S.; WACYK, J.; CHURCHILL J.W.; MADISON, S.P.; RONALD W.H.; GORDON K.M.; RODNEY, A.; ERIN, H.; BARRIE D.R. Effect of starvation on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Physiological Genomics**, n. 35, p. 283-295. 2008.

FIGUEREDO-GARUTTI, M.L.; NAVARRO, I.; CAPILLA, E.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G.; GUTIERREZ, J.; VICENTINI-PAULINO, M.LM. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, n. 132, p. 467-476. 2002.

- GAUCHER, L., VIDAL, N., D'ANATRO, A., NAYA, D.E. Digestive flexibility during fasting in the characid fish *Hyphessobrycon luetkenii*. **Journal of Morphology**, n. 273, p. 49–56. 2012.
- GAYLORD, T.G.; GATLIN D.M. Assessment of Compensatory Growth in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* R. and Associated Changes in Body condition Indices. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 3, p. 326-336. 2000.
- HAYWARD, R.S.; NOLTIE, D.B.; WANG, N. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. **Transactions of the American Fisheries Society**, n. 126, p. 316–322. 1997.
- HUU, H.D.; SANG, H.M.; THUY, N.T.T. Dietary b-glucan improved growth performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. **Fish and Shellfish Immunology**, n. 54, p. 402-410. 2016.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; , Z.; ANDRESON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, n. 154, p.1-15. 1997.
- JOBLING, M.; JOHANSEN, S.J.S. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. **Aquaculture Research**, n. 30, p. 473–478. 1999.
- JONSSON, N.; JONSSON, B.; HANSEN, L P. Changes in proximate composition and estimates of energetic costs during upstream migration and spawning in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Journal of Animal Ecology**, n. 66, p. 425–436. 1997.
- KÄNKÄNEN, M.; PIRHONEN, J. The effect of intermittent feeding on feed intake and compensatory growth of whitefish *Coregonus lavaretus* L. **Aquaculture**, n. 288, p. 92–97. 2009.
- KEDIA, G.; VÁZQUEZ, J.A.; PANDIELLA, S.S. Evaluation of the fermentability of oat fractions obtained by debranning using lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, n. 105, p. 1227–1237. 2008.

KHOURY, D. E.; CUDA, C.; LUHOVYY, B. L.; ANDERSON, G. H. Beta glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal Nutrition and Metabolism**. Article ID: 851362, 28 pages. 2012.

KÜHLWEIN, H.; MERRIFIELD, D. L.; RAWLING, M. D.; FOEY, A. D.; DAVIES, S. J. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 279-89. 2014.

LI, P.; WEN, Q.; GATLIN, D. M. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. **Aquaculture Research**, n. 40, p. 1578-1584. 2009.

LIN, S.; PAN, Y.; LUO, L.; LUO, L. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). **Fish and Shellfish Immunology**, n. 31, p. 788–794. 2011.

MACKENZIE, D. S.; VANPUTTE, C. M.; LEINER, K. A. Nutrient regulation of endocrine function in fish. **Aquaculture**, v. 161, n. 1–4, p. 3-25. 1998.

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

MEENA, D. K. ; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S. C.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K.; AKHTAR, M. S.; BEHERA, B. K.; KUMAR, K.; PAL, A. K. S.; MUKHERJEE, C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology Biochemistry**, n. 39, p. 431–457. 2013.

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

MIEST, J. J.; ARNDT, C.; REUSCH, T. B. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by

altering immunity, metabolism and microbiota. **Fish Shellfish Immunology**, n. 48, p. 94-104. 2016.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, n. 255, p. 82–94. 2006.

MOMMSEN, T P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, n. 139, p. 383 – 400. 2004.

MOON, T.W.; FOSTER, G.D.; PLISETSKAYA, E.M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 9, p. 2189-2193. 1989.

PERES, H.; SANTOS, S.; OLIVA-TELES, A. Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. **Aquaculture**, n. 318, p. 384–388. 2011.

PERRY S.F., WALSH P.J., MOMMSEN T.P., MOON T.W., Metabolic consequences of hypercapnia in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: β -adrenergic effects. **General and Comparative Endocrinology**, n. 69, p 439-447, 1988.

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

POWER, D.M.; MELO, J.; SANTOS, C.R.A. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. **Journal of Fish Biology**, n. 56, p. 374 – 387. 2000.

REYNA, N Y.; CANO, C.; BERMÚDEZ, V J.; MEDINA, M T.; SOUKI, A J.; AMBAR, M.; NUÑEZ, M.; INGLETT, G E. Sweeteners and beta-glucans improve metabolic and anthropometrics variables in well controlled type 2 diabetic patients. **American Journal of Therapeutics**, n. 10, p. 438-443. 2003.

RINGØ, E., ZHOU, Z., VECINO, J.L.G., WADSWORTH, S., ROMERO, J., KROGDAHL, A., OLSEN, R.E., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., DAVIES, S., OWEN, M., LAUZON, H.L., MARTINSEN, L.L., DE SCHRYVER, P., BOSSIER, P., SPERSTAD, S., MERRIFIELD, D.L. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? **Aquaculture Nutrition**, n. 22, p. 219–282. 2016.

RUEDA, F. M.; MARTINEZ, FJ.; ZAMORA, S.; KENTURI, M.; DIVANACH, P. Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture Research**, v. 29, n. 6, p. 447-452. 1998.

SHELBY, RA.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; WELKER, TL.; KLESIUS, PH. Effects of yeast oligosaccharide diet supplements on growth and disease resistance in juvenile nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, n. 21, p. 61–71. 2009.

SOUZA, V L.; SIPAÚBA-TAVARES, L H.; URBINATI, E C., Manejo alimentar e tempo de residência da água em viveiros de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 115-121. 2000a.

SOUZA, V.L.; OLIVERA, E.G.; URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy, stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, n.4, p. 371-379. 2000b.

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

TAKAHASHI, L.S.; TAKAHASHI-BILLER, J.D.; CRISCUOLO-URBINATI, E. URBINATI, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding. Effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n.2, p. 259–266. 2011.

THONDRE PS, HENRY CJK. High-molecular-weight barley b-glucan in chapatis (unleavened Indian flatbread) lowers glycemic index. **Nutrition Research**, n. 29, p. 480–486. 2009.

THONDRE PS, MONRO JA, MISHRA S, HENRY CJK. High molecular weight barley b-glucan decreases particle breakdown in chapattis (Indian flat breads) during in vitro digestion. **Food Research International**, n. 43, p. 1476–1481. 2010.

THONDRE, P.S., HENRY, C.J.K. Effect of a low molecular weight, high-purity b-glucan on in vitro digestion and glycemic response. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n. 62, p. 678–684. 2011.

TIAN, X.; FANG, J.; DONG, S. Effects of starvation and recovery on the growth, metabolism and energy budget of juvenile tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Aquaculture**, n. 310, p. 122–129. 2010.

TIAN, X.; QIN, J.G. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, n. 22, p. 169-179. 2003.

TIAN, X.; QIN, J.G. Effects of previous ration restriction on compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, n. 235, p. 273-283. 2004.

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

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

WANG, Y.; CUI, Y.; YANG, Y.; CAI, F. Partial compensatory growth in hybrid tilapia *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* following food deprivation. **Journal of Applied Ichthyology**, n. 21, p. 389–393. 2005.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R. A.; KLESIOUS, P. H. Immune Response and Resistance to Stress and *Edwardsiella ictaluri* Challenge in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Fed Diets Containing Commercial Whole-Cell Yeast or Yeast Subcomponents. **Journal of the World Aquaculture Society**, n. 38, p. 24–35. 2007.

ZALDÚA, N.; NAYA, D. E. Digestive flexibility during fasting in fish: A review **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, n. 169, p. 7–14. 2014.

ZENG, L.-Q.; LI, F.-J.; LI, X.-M.; CAO, Z.-D.; FU, S.-J.; ZHANG, Y.-G. The effect of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Che). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, n. 162, p. 200–211. 2012.

CAPITULO 3

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE β -GLUCANO MELHORA AS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS INATAS DE PACUS *Piaractus* *mesopotamicus* EXPOSTOS A ESTRATÉGIAS ALIMENTARES DE RESTRIÇÃO E REALIMENTAÇÃO

RESUMO

Este trabalho avaliou as respostas imunes inatas de pacus submetidos a ciclos curtos e repetidos de restrição alimentar e realimentação e a ação imunoestimulante de β -glucano oferecido ao final dos ciclos. Os peixes foram submetidos, durante sete semanas a seis diferentes estratégias alimentares que incluíram alimentação todos os dias com ração comercial RC (controle - GC), seis dias de alimentação e um dia de restrição (G 6/1), dois dias de alimentação e um dia de restrição (G 2/1), e com RC suplementada com 0,5% β -glucano nos últimos 15 dias de alimentação (GC Glu), (G 6/1 Glu) e (G 2/1 Glu). No dia 50, os peixes (n=9 por tratamento) foram amostrados para a determinação da atividade respiratória dos leucócitos (ARL), concentração de lisozima sérica, atividade hemolítica do sistema complemento no soro (AHC), concentração plasmática de glicose, contagem de leucócitos e determinação de infiltrado leucocitário no epitélio intestinal (ILI) antes e três e vinte quatro horas depois da inoculação dos peixes com *Aeromonas hydrophila*. Os resultados mostraram que os ciclos de restrição alimentar (6/1 e 2/1) promoveram redução da ARL, da concentração de lisozima e do ILI. Ocorreu aumento dos níveis de glicose e contagem de leucócitos nos peixes G 6/1 e G 2/1 quando os peixes foram infectados com a bactéria. A suplementação com β -glucano melhorou a resposta imunológica, aumentando a ARL, AHC, concentração da lisozima, a contagem de células de defesa e o infiltrado leucocitário na mucosa intestinal do pacu.

Palavras-chave: Jejum, realimentação, Resposta imunológica, peixe, β -glucano.

ABSTRACT

This study evaluated innate immune responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) subjected to short-term starvation and refeeding and the immunostimulatory action of β -glucan offered in the final phase of the feeding cycles. Fish were submitted for seven weeks to different feeding strategies: feeding daily commercial feed CF (CG); 6 days feeding CF and 1 day restriction (G 6/1); 2 days feeding RC and 1 day restriction (G 2/1); feeding daily CF supplemented with 0.5% β -glucan SCF (SCG) in the last 15 days; 6 days feeding CF and 1 day restriction and SCF in the last 15 days (SG 6/1 Glu); 2 days feeding CF and 1 day restriction, and SCF in the last 15 days (GS 2/1 Glu). On day 50, nine fish of each treatment were sampled for determination of leukocyte respiratory burst, the lysozyme concentration, the hemolytic activity of complement system (alternative pathway), total and differential leukocyte count and intestinal leukocyte infiltration (ILI). The remaining fish were inoculated with *Aeromonas hydrophila*. Nine fish per treatment were sampled at three and 24 h after inoculation. The results showed that food restriction cycles reduced leukocyte respiratory burst, serum lysozyme and ILI. There were increased glycemia and leukocyte counts when fish were infected with the bacterium. β -glucan supplementation improved immune response causing increase in the leukocyte respiratory burst, serum lysozyme, the hemolytic activity of complement system, defense cell count in the blood and leukocyte infiltration in the foregut of pacu.

Key-words: Fast, energy deficit, innate immunity, immunestimulant.

1. INTRODUÇÃO

O estado nutricional dos peixes determina seu crescimento e estado de saúde (Merrifield et al., 2010). Diferentes estudos tem demonstrado que os peixes são altamente tolerantes a manejos alimentares que incluem restrição alimentar e realimentação, por períodos curtos ou prolongados (Tian e Qin, 2003; Metón et al., 2003; Wang et al., 2005; Caruso et al., 2010; Caruso et al., 2011; Takahashi et al., 2011; Urbinati et al., 2014). Como resposta à ausência do alimento, os peixes utilizam reservas energéticas e podem apresentar crescimento compensatório quando a alimentação é retomada. Assim, a escolha de estratégias adequadas para as diferentes espécies pode melhorar a eficiência produtiva (García-Mesa et al., 2014) e a qualidade da carne (Amin et al., 2012), diminuir os custos da criação (Chatakondi e Yant, 2001) e a contaminação da água (Turano et al., 2008) durante o processo de criação dos peixes.

Na restrição alimentar, os peixes utilizam suas reservas energéticas para manter a homeostase orgânica, enquanto o esforço metabólico durante as respostas compensatórias, na realimentação, é dirigido, prioritariamente, para o crescimento compensatório. Entretanto, pouco se sabe se este esforço afeta negativamente o sistema imunológico dos peixes, quando este for ativado. Poucos estudos têm abordado este tema.

Os peixes teleósteos apresentam um sistema imune inato altamente desenvolvido, que envolve componentes físicos (mucosa da pele, brânquias e mucosa intestinal), celulares (macrófagos, neutrófilos e monócitos) e químicos (lisozimas e proteínas do sistema complemento) (Verlhac et al., 1996; Kantari et al., 2008). Estes indicadores são ferramentas úteis para se avaliar o comportamento do sistema imune dos peixes.

Caruso et al. (2010) submeteram *Anguilla anguilla* a restrição alimentar por 31, 42 e 58 dias e não encontraram alteração na concentração de lisozima no rins e no plasma; mas na pele, a concentração da enzima foi maior nos peixes em restrição. Em outro estudo, Caruso et al. (2011) observaram que, em duas espécies de peixes (*Dicentrarchus labrax* e *Pagellus bogaraveo*) mantidas em jejum por 31 dias, as concentrações de lisozima no plasma e no muco foram mais elevadas nos peixes alimentados do que nos restritos. Da mesma forma, a

atividade respiratória dos leucócitos foi maior no *Dicentrarchus labrax* alimentado, em relação aos restritos. Em estudo recente, Gimbo et al. (2015) mostraram que o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), mesmo em condição de balanço energético negativo, após 30 dias de jejum, foi capaz de acionar respostas imunes inatas contra infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

O papel dos nutrientes e de aditivos no sistema imunológico dos peixes tem sido investigado desde os anos 1980 (Kiron et al., 2012). O uso de imunoestimulantes na alimentação dos peixes como estratégia preventiva de enfermidades é considerado um aspecto importante na aquicultura atual.

Segundo Ringo et al. (2012), a resposta imune dos peixes pode ser modulada pelos β -glucanos, que são os principais polissacarídeos estruturais da parede celular de leveduras, fungos, e bactérias. Os β -glucanos estimulam os mecanismos de defesa não específicos dos peixes, aumentando a atividade fagocitária dos macrófagos e, assim, melhorando a capacidade de defesa contra patógenos (Robertsen, 1999; Ortuño et al., 2002; Cook et al., 2003; Li e Gatlin, 2004; Selvaraj et al., 2005; Kiron, 2012; Ringo et al., 2012; Meena et al., 2013).

Os β -glucanos agem como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e interagem com o sistema imune inato através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nos leucócitos (Meena et al., 2013) estimulando, assim, as respostas de defesa mediante sinalização intracelular que causa a produção de radicais livres e enzimas antioxidantes com atividade antimicrobiana (Pohlenz e Gatlin, 2014).

A utilização de 0,1% de β -glucano na alimentação de *Labeo rohita* por sete dias promoveu proteção contra *Aeromonas hydrophila* (Sahoo e Mukherjee, 2001). O β -glucano (250 mg/kg) também estimulou a imunidade não específica de carpas indianas desafiadas com *A. hydrophila* e *Edwardsiella tarda*, aumentando a atividade fagocítica, número de leucócitos, atividade de lisozima e atividade do sistema complemento (Misra et al., 2006). Gopalakannan e Arul (2010) observaram em *Cyprinus carpio*, que 1% de β -glucano aumentou a atividade respiratória dos leucócitos e a atividade da lisozima após 30 dias de suplementação e a contagem de glóbulos brancos após 60 dias, em desafio com *Aeromonas hydrophila*. Nesta mesma espécie, a administração de 1 e 2 % de β -glucano, por oito semanas, aumentou a infiltração de leucócitos na camada epitelial do intestino anterior (Kühlwein et al., 2014).

Considerando o exposto, investigamos se a exposição de juvenis de pacu a ciclos curtos e repetidos de restrição alimentar e realimentação prejudica a resposta imune inata dos peixes, e se a alimentação com β -glucano, ao final dos ciclos alimentares, pode melhorar estas respostas induzidas por inoculação com *Aeromonas hydrophila*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamentos

O procedimento experimental deste trabalho seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 04013/14) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

Um total de 210 juvenis de pacu ($18,3 \pm 9,6$ g), fornecido pelo Centro de Aquicultura da UNESP, foi distribuído aleatoriamente em 21 unidades experimentais (caixas de 100 litros), com 10 peixes por unidade, em sistema com fluxo de água constante, para aclimação por duas semanas, sendo alimentados até saciedade aparente, duas vezes por dia com ração comercial peletizada (28% de PB e 3.600 kcal EB kg^{-1}). O fotoperíodo foi de 12 horas luz:12 horas escuro. Durante a aclimação, o consumo de ração foi registrado para se estabelecer a taxa de alimentação a ser usada durante os dias experimentais.

Após a aclimação, os peixes foram pesados ($27,7 \pm 6,7$ g) e redistribuídos em seis estratégias alimentares (21 caixas, três réplicas por tratamento). Os peixes foram, então, alimentados com 3,5% do peso corporal, por sete semanas, de acordo com as seguintes estratégias:

- GC: Peixes alimentados com ração comercial (RC), todos os dias.
- G 6/1: Peixes alimentados com RC, por 6 dias e não alimentados por 1 dia (6/1).
- G 2/1: Peixes alimentados com RC, por 2 dias e não alimentados por 1 dia (2/1).

- GC Glu: Peixes alimentados com ração RC, todos os dias, e suplementados com 0,5% de β -glucano, nos últimos 15 dias de alimentação.
- G 6/1 Glu: Peixes alimentados com RC, em ciclos de 6 dias de alimentação e 1 dia de restrição e suplementados com 0,5% de β -glucano, nos últimos 15 dias de alimentação (6/1).
- G 2/1 Glu: Peixes alimentados com RC, em ciclos de 2 dias de alimentação e 1 dia de restrição e suplementados com 0,5% de β -glucano, nos últimos 15 dias de alimentação (2/1).
- GC PBS: Peixes alimentados com ração comercial (RC), todos os dias, para controle de inoculação com PBS, ao final do experimento.

Em três caixas restantes, os peixes foram alimentados diariamente, com ração comercial, para serem injetados com tampão PBS no final do experimento.

A quantidade de ração foi corrigida a cada 15 dias, quando os peixes eram pesados novamente.

A dieta foi suplementada com β -glucano (Macrogard®) derivado de *Saccharomyces cerevisiae*, fornecido pela Biorigin, com 70,9% de pureza (Lote Q513187).

2.2 Amostragem e análises

Ao final de sete semanas de tratamentos, três peixes de cada caixa (n=9 por tratamento) foram pesados e anestesiados (benzocaína, 1,0g/10mL de álcool/15L de água) para retirada de sangue. Uma alíquota de 50 μ L foi colocada em microtubo com heparina para a análise da atividade respiratória de leucócitos (ARL). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo das células, por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm (Biller-Takahashi et al., 2013).

Uma segunda alíquota de sangue foi colocada em micro-tubo com anticoagulante inibidora da glicólise (Glistab, Ref. 29) para a obtenção de plasma e determinação da concentração de glicose, por método enzimático (Kit Labtest[®] código 133).

O restante de sangue foi colocado em microtubo sem anticoagulante para separação de soro, e posterior determinação da concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC), segundo metodologia descrita por Zanuzzo et al. (2015).

Além disso, foram realizadas extensões sanguíneas coradas com solução de Rosenfeld, modificado por Tavares-Dias e Moraes (2003), para a contagem diferencial dos leucócitos. A contagem total de leucócitos foi feita por método indireto (Ranzani-Paiva et al., 2013), multiplicando-se o número de células contadas na câmara de Neubauer pelo número de células contadas na extensão sanguínea, dividido por 2000 para obter o valor absoluto.

Imediatamente após a coleta do sangue, os peixes foram eutanasiados para retirada de fragmentos de intestino anterior para observação e contagem do infiltrado leucocitário na camada epitelial. Os fragmentos foram abertos longitudinalmente e grampeados sobre papel cartonado, lavados cuidadosamente com solução salina 0,6% e imediatamente fixados em formalina tamponada 10% (pH 7,2). Após 24 horas, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90 e 100%) para serem incluídos em historesina. Foram realizados seis cortes seriados de 3 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Floxina. Cinco campos foram capturados com o auxílio de câmera fotográfica digital (Leica DFC 295) acoplada a microscópio (Leica-DM 2500), com objetiva de 40X. As imagens foram analisadas pelo programa de captura e análise de imagens LAS V.3.8 (Leica, Germany).

Foram escolhidas aleatoriamente três fotomicrografias por lâmina com o uso de tabela de randomização e a cada uma delas foi sobreposta uma grade com cinco quadros (50 x 50 µm cada) compostos por linhas pontilhadas e contínuas para aleatorizar a área de contagem das células. A determinação do infiltrado leucocitário intraepitelial (ILI) foi realizada contando as células presentes em cada um dos quadros, incluindo as que ficaram sobre as linhas pontilhadas e descartando-se as que se encontraram sobre as linhas contínuas (Gundersen et al., 1977). Finalmente, seguindo a metodologia de Ferguson et al. (2010), foi

padronizada uma contagem mínima de 100 enterócitos por lâmina para expressar os resultados em porcentagem (número de células infiltradas a cada 100 enterócitos).

2.3 Desafio bacteriano

Os peixes restantes foram anestesiados e inoculados por injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila*, diluída em PBS (0,01 M), a uma concentração de 3×10^9 UFC mL⁻¹ (ajustada segundo a escala de McFarland) e inativada em banho a 40 °C, durante 30 minutos, segundo Castro et al. (2014). Os peixes GC PBS, alimentados todos os dias com RC, foram injetados com PBS para controle. Três e vinte quatro horas depois da inoculação, foram amostrados nove peixes de cada tratamento.

Durante o experimento, foram monitoradas diariamente a temperatura ($26,7 \pm 0,7$ °C) e concentração de oxigênio dissolvido ($6,3 \pm 0,75$ mg L⁻¹) na água das unidades experimentais. Ao final do experimento, foi determinada a concentração da amônia total ($0,256$ mg L⁻¹).

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado e arranjo fatorial 3 (protocolos alimentares) x 2 (níveis de glucano) x (3 tempos de coleta) em triplicata. Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade e homogeneidade de Cramér-von Mises test e Brown-Forsythe. Quando necessário, os dados foram transformados para que as premissas fossem satisfeitas (AHC e basófilos com raiz quadrada; eosinófilos com log₁₀), sendo, então, submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando encontrada diferença, as médias foram submetidas ao teste de Tukey (p<0,05). As análises foram realizadas pelo Statistical Analysis System (SAS Institute Inc).

3. RESULTADOS

Para avaliar se protocolos de alimentação, com restrição alimentar cíclica, afetava as respostas imunes inatas do pacu, e se o β-glucano interferia nessa

resposta, amostramos os peixes ao final dos 50 dias de aplicação dos ciclos alimentares, antes e depois de três e 24 horas da inoculação com *A. hydrophila*.

3.1 Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) (Figura 1)

A ARL foi afetada pelas estratégias de alimentação ($P < 0,0001$), pelo β -glucano ($P < 0,0001$) e houve interação entre as estratégias de alimentação e o nível de β -glucano ($P < 0,0001$). Também houve diferenças na ARL nos diferentes tempos de amostragem ($P < 0,0001$).

A restrição, por si, reduziu a ARL. Comparando os peixes das três estratégias que não receberam β -glucano, na amostragem inicial, observamos redução da ARL na restrição mais intensa (G2/1) (a,a,b). Perfil parecido ocorreu quando comparamos os peixes das três estratégias, que receberam β -glucano. Observamos redução gradativa da ARL à medida que a restrição aumentou (a,b,c). Quando comparamos os peixes que receberam ou não β -glucano, em cada estratégia, na mesma amostragem, observamos que o β -glucano aumentou a ARL no GC e no G 6/1. A intensidade da restrição no G 2/1 impediu o efeito do β -glucano (*).

Três horas após a inoculação, as respostas tiveram o mesmo comportamento observado antes da inoculação, tanto em peixes que receberam β -glucano quanto nos que não receberam, mostrando a influência da restrição do alimento e do glucano.

Já, às 24 h após a inoculação da bactéria, observamos que a restrição reduziu a ARL nos dois grupos (G 6/1 e 2/1) de peixes que não receberam β -glucano (a,b,b). Nos peixes que receberam β -glucano, a redução gradativa da ARL à medida que a restrição aumentou (a, b, c) foi semelhante ao observado 3 h depois da inoculação.

Comparando os peixes que receberam ou não β -glucano, em cada estratégia, observamos que o β -glucano aumentou a ARL no GC e no G 6/1, mas não na restrição mais severa (2/1) (*), como ocorreu 3 h depois da inoculação.

Ao longo do tempo, observamos que três horas depois da inoculação, a ARL foi maior do que na amostragem inicial nos peixes alimentados com β -glucano, nas três estratégias alimentares, e retornou aos valores iniciais às 24 h

(B,A,AB). Os peixes dos G 6/1 G 2/1 alimentados sem β -glucano também apresentaram aumento do ARL às três horas, em valores que se mantiveram constantes até 24 horas depois (B,A,A).

Nos peixes injetados com PBS não houve diferença entre amostragens, em relação aos peixes controle ($P = 0,4341$).

3.2 Concentração de lisozima sérica (CLS) (Figura 2)

A concentração da lisozima foi afetada pelas estratégias alimentares ($P < 0,0001$), pelo β -glucano ($P < 0,0001$) e houve interação entre as estratégias de alimentação e o nível de β -glucano ($P < 0,0001$), entre nível de β -glucano e desafio bacteriano ($P < 0,0001$) e também entre estratégias de alimentação e desafio bacteriano ($P = 0,0002$).

Antes da inoculação da bactéria, ocorreu redução gradativa da CLS à medida que a restrição aumentou (a,b,c), tanto nos peixes que não receberam β -glucano quanto nos peixes que receberam (a,b,c), embora nestes, e em condição de restrição alimentar, a redução tenha sido menos acentuada. O glucano não afetou a influência da restrição, mas atenuou a queda. Quando comparamos os peixes que receberam ou não β -glucano, em cada estratégia, observamos que o β -glucano aumentou a CLS tanto no G 6/1 quanto no G 2/1 (*). O glucano estimulou a CLS nos grupos submetidos a restrição.

Três horas após a inoculação, comparando os peixes das três estratégias que não receberam β -glucano, observamos o mesmo perfil da amostragem inicial (a,b,c) e o mesmo ocorreu nos peixes que receberam β -glucano (a,b,c). O mesmo comportamento da CLS é observado às 24h nos peixes não alimentados com β -glucano (a,b,c), o que não ocorreu com os peixes que receberam β -glucano. Neste grupo, a CLS não se alterou entre todas as estratégias (a,a,a), e teve valor mais elevado que de todas as outras amostragens (A,B,B). No G 2/1, essa elevação foi mais acentuada (A,B,C).

Comparando os peixes que receberam ou não β -glucano, em cada estratégia alimentar, às 3 e 24 h após a inoculação, o β -glucano aumentou a CLS tanto no G 6/1 quanto no G 2/1 (*).

A CLS permaneceu constante até 3 h depois da inoculação nos peixes do GC e G 6/1, tanto nos alimentados quanto nos não alimentados com β -glucano,

apresentando aumento na CLS unicamente as 24 horas (B,B,A). Os peixes do G 2/1 mostraram aumento gradual a partir de três h depois do desafio bacteriano (C,B,A), tanto nos peixes alimentados quanto nos não alimentados com β -glucano.

Nos peixes injetados com PBS não houve diferença quando comparados com os peixes controle, antes do desafio ($P = 0,0518$).

3.3 Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) (Figura 3)

A AHC não foi afetada pelas estratégias alimentares ($P = 0,3684$), mas foi pelo β -glucano ($P = 0,0004$) e houve interação entre o nível de β -glucano e os tempos de amostragem ($P = 0,0151$).

A restrição alimentar não afetou a AHC, nem antes nem depois da inoculação bacteriana, enquanto o β -glucano aumentou a AHC em todas as estratégias alimentares (*).

A inoculação da bactéria aumentou a AHC ao longo do tempo. Nos peixes GC, com ou sem glucano, o perfil foi mesmo (A,B,C). Já nos peixes do G 6/1 e 2/1 sem glucano a ativação foi observada às 3 h e se manteve às 24 h. Quando os peixes receberam β -glucano, a ativação continuou a aumentar até as 24 h. Melhorou a resposta em condições de restrição.

A AHC dos peixes injetados com PBS não diferiu da atividade dos peixes controle antes do desafio ($P = 0,3328$).

3.4 Concentração plasmática de glicose (Figura 4)

As estratégias de alimentação afetaram os níveis de glicose circulante ($P < 0,0001$), tanto antes do desafio quanto as três e 24 horas depois, sendo mais elevados nos peixes que receberam alimentação a cada dois dias. Os níveis plasmáticos de glicose aumentaram ($P = 0,0274$) três horas após o desafio bacteriano, e retornaram à condição inicial às 24 horas, em todos os tratamentos. Nos peixes que receberam o β -glucano, os níveis de glicose foram maiores ($P < 0,0001$) às três horas, em relação aos que não receberam. Os valores de glicose dos peixes GC PBS, , não diferiram em relação aos peixes controle, antes do desafio nem 24 horas após do desafio ($P = 0,5712$).

3.5 Infiltração leucocitária intraepitelial (ILI) (Figura 5)

A ILI, na porção anterior do intestino anterior, foi afetada pelas estratégias de alimentação ($P < 0,0001$) e também pelo β -glucano ($P < 0,0001$) e houve interação entre o nível de β -glucano e as estratégias ($P < 0,0001$).

A ILI na porção anterior do intestino anterior foi maior nos peixes alimentados com β -glucano em todas as estratégias alimentares (A,B). Os peixes alimentados sem β -glucano apresentaram diminuição na ILI tanto no G 6/1 quanto no G 2/1 (a,b,b), enquanto que nos alimentados com β -glucano a ILI foi semelhante nos peixes do G 6/1 e GC. Apenas nos peixes do G 2/1 houve diminuição do ILI (a,a,b).

3.6 Contagem total de leucócitos (Tabela 1)

O número total de leucócitos foi maior ($P < 0,0001$) 3 horas após a inoculação com *A. hydrophila* nos peixes não suplementados com β -glucano, voltando aos valores iniciais às 24 horas independente da estratégia alimentar. Este perfil foi observado unicamente no grupo 2/1 alimentado com β -glucano, enquanto que no GC e 6/1 o número de células permaneceu estável apesar do desafio com a bactéria. Os peixes que receberam β -glucano durante os últimos quinze dias de alimentação apresentaram número de leucócitos mais elevado independente da estratégia alimentar ($P = 0,0061$). Não houve diferenças significativas entre estratégias de alimentação.

3.7 Contagem diferencial de leucócitos (Tabela 2)

3.7.1 Linfócitos

O número de linfócitos diminuiu depois do desafio com a bactéria, em todos os tratamentos ($P < 0,0001$). Os peixes alimentados com β -glucano apresentaram um número maior de linfócitos antes do desafio, em relação aos que não receberam, nos peixes GC e 6/1 ($P < 0,0001$). Apesar da diminuição no número de linfócitos 3 horas depois do desafio, os peixes 6/1 que receberam β -glucano, apresentaram maior quantidade de linfócitos em relação aos que não receberam no mesmo protocolo alimentar. Às 24 horas, havia mais linfócitos em todos os peixes alimentados com β -glucano em relação aos não alimentados. Nos peixes

injetados com PBS não houve diferença em nenhuma amostragem em relação aos peixes controle, antes do desafio ($P = 0,4261$).

3.7.2 Neutrófilos

O número de neutrófilos foi maior três horas depois do desafio bacteriano em relação à condição inicial, em todos os grupos de peixes ($P < 0,0001$). Às 24 horas, os valores voltaram aos valores iniciais. Não houve diferença entre as estratégias alimentares, em nenhuma amostragem ($P = 0,7554$). O número de neutrófilos dos peixes alimentados com β -glucano foi menor ($P < 0,0001$), em relação aos não alimentado em todas as amostragens, nos peixes 6/1. Nos outros dois grupos, o número de neutrófilos foi menor nos peixes que receberam β -glucano, às três horas, no grupo controle, e as três e 24 horas no grupo 2/1. Nos peixes injetados com PBS não houve diferença em nenhuma amostragem em relação aos peixes controle, antes do desafio ($P = 0,3459$).

3.7.3 Monócitos

O número de monócitos aumentou três horas após o desafio bacteriano em todos os grupos ($P < 0,0001$), recuperando os valores iniciais, em 24 horas. Às três horas depois do desafio, havia maior número de monócitos nos peixes alimentados com β -glucano, tanto nos peixes GC quanto nos 6/1, em relação aos não alimentados ($P < 0,0001$). A resposta dos peixes injetados com PBS não diferiu em nenhuma amostragem em relação aos peixes controle, antes do desafio ($P = 0,2948$).

3.7.4 Eosinófilos e basófilos

O número de eosinófilos não variou entre os estratégias de jejum e realimentação ($P = 0,2150$) e entre os alimentados ou não com β -gucano ($P = 0,2695$). O desafio com *Aeromonas hydrophila* também não afetou a quantidade de eosinófilos ($P = 0,8758$). A resposta dos peixes injetados com PBS não diferiu em nenhuma amostragem em relação aos peixes controle, antes do desafio ($P = 0,4837$).

O número de basófilos foi muito pequeno (de 113 até 197), não permitindo análise estatística dos dados.

3.7.5 Células granulocíticas especiais (CGE)

O número de CGE aumentou gradualmente da coleta inicial, às três e 24 horas após o desafio bacteriano em todos os grupos de peixes ($P < 0,0001$). Havia um número maior de CGE nos peixes que receberam β -glucano independente da estratégia de alimentação ($P < 0,0001$). As estratégias de alimentação não afetaram o número de CGE ($P = 0,3241$). Nos peixes injetados com PBS não houve diferença em nenhuma amostragem em relação aos peixes controle, antes do desafio ($P = 0,2734$).

4. DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que a aplicação de ciclos intermitentes de restrição alimentar e realimentação, por 50 dias, e a associação com o fornecimento de β -glucano nos últimos 15 dias de alimentação de juvenis de pacu interferem na resposta de componentes humorais, celulares e de mucosa do sistema imune inato dos peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Pela primeira vez, pelo nosso conhecimento, demonstramos um efeito promotor do β -glucano em peixes em condições de restrição alimentar.

Nosso estudo utilizou estratégias alimentares, com ciclos curtos de restrição alimentar e realimentação, de modo que houvesse intermitente resposta compensatória para buscar a homeostase biológica, ao longo do período de aplicação dos ciclos. Observamos que as estratégias testadas reduziram a ARL, quando mais intensa (2/1), reduziram a CLS, de forma crescente à medida que a restrição se intensificou, e não afetou a AHC. Entretanto, esta condição não impediu que o sistema imune inato dos peixes reagisse à presença da bactéria inoculada. Após a inoculação da bactéria, a ARL, a CLS e a AHC aumentaram nos peixes sob restrição. Igualmente, em outro estudo (Gimbo et al., 2015), após 30 dias de restrição alimentar, em condição de balanço energético negativo, o pacu foi capaz de responder imunologicamente a uma infecção experimental com *A. hydrophila*.

Do ponto de vista energético, os processos de ativação imunológica observados em nosso estudo, nos peixes sob restrição alimentar, foram sustentados pelo maior aporte de glicose circulante, fornecido pelos mecanismos compensatórios da restrição alimentar (Navarro e Gutierrez, 1995).

Em relação aos indicadores celulares utilizados, a restrição não alterou o perfil dos leucócitos circulantes e não alterou as respostas ao desafio com a bactéria. Por outro lado, a restrição reduziu a imunidade da mucosa intestinal, pois a ILI foi menor nos peixes que tiveram a alimentação reduzida.

Nossos resultados são consistentes com os dados de outros autores que estudaram a imunidade de peixes em restrição alimentar (Caruso et al., 2011; Gimbo et al., 2015), embora estes tenham utilizado período de restrição contínuo, durante 30 dias. Nestes casos, com pacu e pargo *Pagellus bogaraveo*, respectivamente, houve redução da ARL e CLS e aumento da concentração de lisozima no muco. Entretanto, em robalo *Dicentrarchus labrax*, exposto ao mesmo tempo de jejum (Caruso et al., 2011), nenhuma alteração foi observada. Outro estudo com enguia europeia *Anguilla anguilla*, após restrição alimentar de 31 a 58 dias não observou alteração da CLS, mas apenas da enzima no muco (Caruso et al., 2010). Utilizando outro protocolo de restrição (restrição por 14 dias e realimentação por sete ou 15 dias), Caruso et al. (2012) não encontraram alterações em indicadores de imunidade em red porgy *Pagrus pagrus*.

De nosso conhecimento, não há estudos que tenham utilizado estratégias alimentares de ciclos curtos de restrição e realimentação como em nosso estudo. Adicionalmente, estes estudos não desafiaram o sistema imune dos peixes com patógenos, como no nosso caso, a não ser o estudo de Gimbo et al. (2015).

Outra abordagem de nosso estudo foi o uso de β -glucano ao final dos ciclos alimentares, que potencializou as respostas do sistema imune à inoculação bacteriana tanto em condições normais de alimentação quanto em condições de restrição.

Os β -1,3-glucanos são polímeros estruturais complexos de glicose, comumente extraídos de células da parede de bactérias, cogumelos, algas, grãos de cereais, fermento e fungos (Zekovic e Kwiatowski, 2005).

É conhecido que a resposta imune dos peixes pode ser modulada pelos β -glucanos (Ringo et al. (2012). Os β -glucanos tem papel importante no reconhecimento de patógenos e estimulam os mecanismos de defesa não específicos dos peixes, aumentando a atividade fagocitária dos macrófagos e, assim, melhorando a capacidade de defesa contra patógenos (Robertsen, 1999;

Ortuño et al., 2002; Cook et al., 2003; Li e Gatlin, 2004; Selvaraj et al., 2005; Kiron, 2012; Ringo et al., 2012; Meena et al., 2013).

β -glucanos de alto peso molecular, como o derivado da *Saccharomyces cerevisiae* utilizado em nosso estudo, apresentam efeitos estimulatórios nos leucócitos que incluem indução da fagocitose e atividades citotóxicas e antimicrobianas exercidas por vários fatores humorais do sistema imune inato, tais como espécies reativas de oxigênio, lisozima e as proteínas do sistema complemento, entre outros (Meena et al., 2013).

Entretanto, não são conhecidos estudos que utilizam este imunostimulante em condições de restrição alimentar, como nosso estudo abordou.

Em relação aos indicadores testados, a administração oral de β -glucano no pacu aumentou a ARL no GC e no G 6/1, mas não em restrição mais severa. Isso aconteceu antes e 3 horas depois da inoculação da bactéria.

No caso da CLS, o β -glucano fornecido aos peixes atenuou a redução da concentração da enzima e aumentou nos grupos submetidos à restrição, especialmente no G 2/1. Às 24 horas, a elevação da CLS foi mais evidente e aconteceu nos níveis mais elevados, independente da estratégia.

A ativação da lisozima foi mais tardia comparada com a ARL e pode estar associada ao tipo de bactéria utilizada. A lisozima hidrolisa as ligações $\beta(1-4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico e o N-acetilglicosamínico nas paredes de bactérias gram positivas. Bactérias gram negativas, como a *A. hydrophila*, não são diretamente afetadas pela lisozima. Inicialmente, o sistema complemento rompe a membrana externa das bactérias gram negativas, expondo os peptídeoglicanos da parede interna, que ficam expostos à ação da lisozima (Magnadóttir, 2006; Gimbo et al., 2015).

A administração oral de glucanos aumentou indicadores de imunidade inata, tais como capacidade fagocítica e oxidativa, lisozima e atividade do sistema complemento em diversas espécies de peixes (Santarém et al., 1997; Misra et al., 2006; Gopalakannan e Arul, 2010; El-Boshy et al., 2010; Siwicki et al., 2010; Lin et al., 2011; Biller-Takahashi et al., 2014; Guzman-Villanueva et al., 2014; Chang et

al., 2013; Kühlwien et al., 2014; Dawood et al., 2015). Entretanto, os estudos acima citados foram realizados em condições de alimentação constante.

A imunidade celular dos peixes é constituída principalmente por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e monócitos / macrófagos (MMs), que são capazes de fagocitar e destruir os agentes infecciosos (Kantari et al., 2008).

Neste estudo, observamos diminuição de linfócitos nas primeiras três horas após do desafio, ao mesmo tempo em que ocorria aumento de neutrófilos. Estes dois fenômenos foram descritos em peixes submetidos a estresse agudo por injeção de glicocorticoides exógenos (Davis et al., 2008). Podemos inferir que a exposição ao agente patógeno como o utilizado neste estudo desencadeou as mudanças na contagem de linfócitos e neutrófilos. Também observamos que o β -glucano oral atenuou a redução de linfócitos e o aumento de neutrófilos, independente do protocolo de alimentação. De acordo com Palic et al. (2006), a suplementação da dieta de *Pimephales promelas* com β -glucano aumentou a atividade dos neutrófilos melhorando a resistência a doenças.

Os neutrófilos são atraídos para os locais de infecção, como parte da resposta imune inata (Jorgensen, 2016). Quando a função dos neutrófilos é ativada, estes liberam sinais para a ativação dos monócitos para se converterem em (Kumar e Sharma, 2010). Assim, tanto os monócitos, como os neutrófilos, têm função fagocítica e citotóxica não-específica (Cuesta et al., 1999). Neste estudo observamos, aumento destas células no pacu, após três horas da inoculação com *A. hydrophila* como era esperado pela semelhança de função destas células. Aumento de óeutrofilos após infecção experimental com *Ichthyophthirius multifiliis* foi observada por Jorgensen (2016) em peixe-zebra, no local da inoculação com o parasita, mas diferente dos nossos resultados os autores observaram que a quantidade de neutrófilos permaneceu elevada em comparação com os valores obtidos antes da infecção. Já nossos resultados mostraram que a contagem destas células voltou aos valores iniciais 24 horas da inoculação com a bactéria.

Também observamos que o β -glucano oral, no protocolo 6:1, aumentou o número de monócitos 3 horas depois do desafio. Consistente com nossos resultados, carpas *Cyprinus carpio* infectadas com ectoparasitas que receberam

0,3% de β -glucano apresentaram aumento de neutrófilos e monócitos e redução de linfócitos (Sahan et al., 2010).

Finalmente, observamos que a administração oral de β -glucano alterou a imunidade da mucosa intestinal e aumentou a infiltração leucocitária na camada epitelial do intestino anterior de pacu, similar ao reportado por Kühlwein et al. (2013) em carpas.

Os resultados deste estudo, utilizando indicadores do sistema imune inato, como componentes humorais, celulares e de mucosa, indicam que estratégias alimentares que envolvem períodos cíclicos de jejum, como o utilizado, que têm sido usadas como ferramenta de otimização da produção na aquicultura, embora afetem negativamente alguns indicadores do sistema imune inato de pacus, não impedem a resposta deste sistema frente a um desafio bacteriano. Além disso, pela primeira vez, este estudo mostra que a suplementação dietética com β -glucano, mesmo que realizada por períodos curtos, durante restrição alimentar, melhora a resposta imunológica de pacu frente a desafio com *Aeromonas hydrophila*, causando aumento na ARL, AHC, lisozima e mobilização de células de defesa, no sangue e na mucosa intestinal.

Figuras

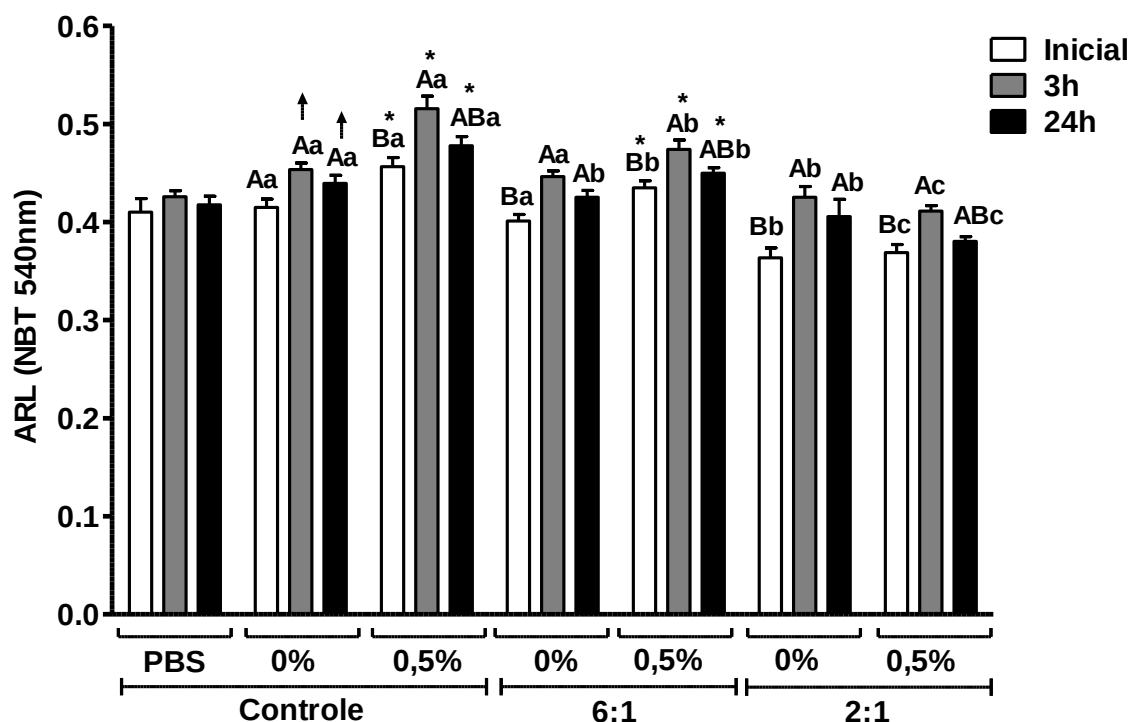


Figura 1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas,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

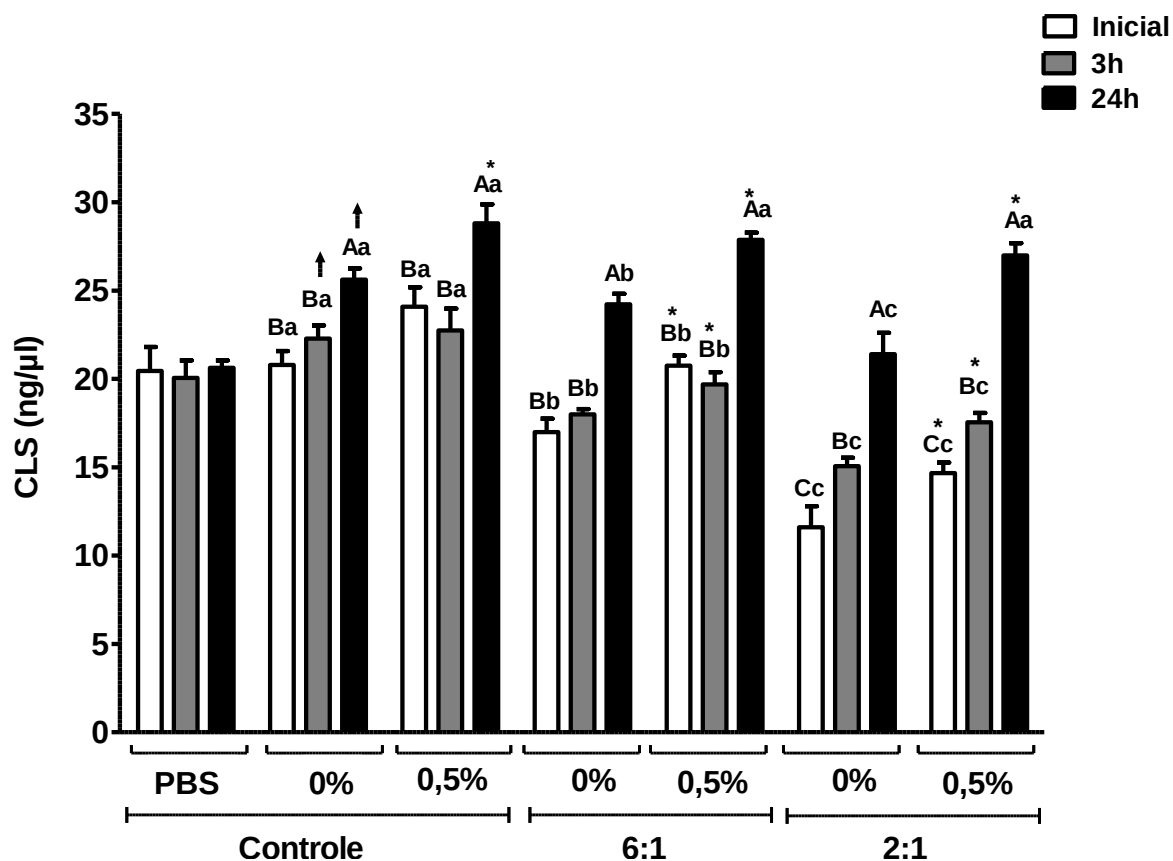


Figura 2. Concentração de lisozima sérica (CLS) de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas,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

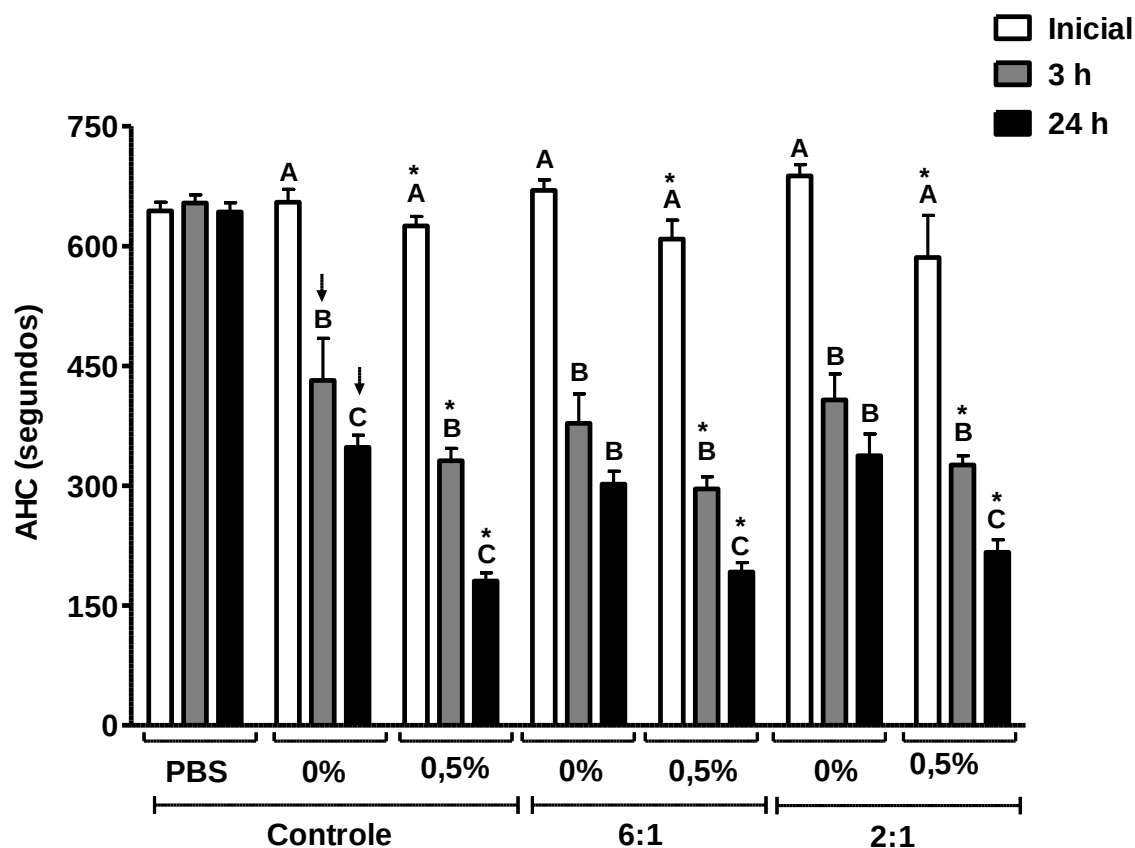


Figura 3. Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) no soro de pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia,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

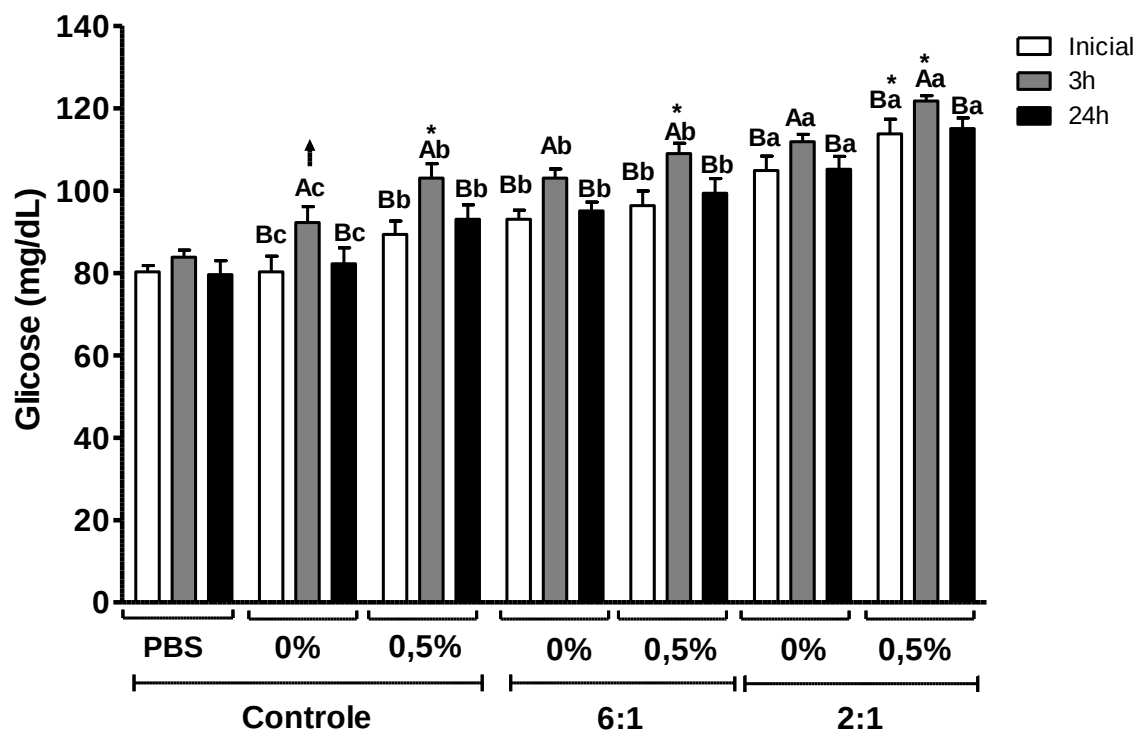


Figura 4. Concentração plasmática de glicose de pacu submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas, inoculados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

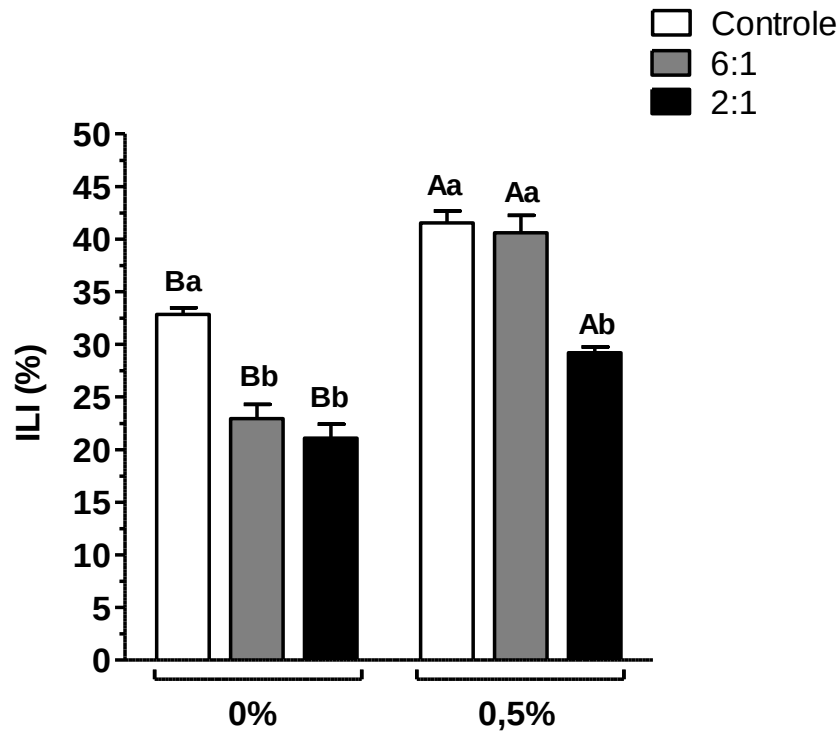


Figura 5. Infiltração leucocitária (LI) em pacus submetidos a diferentes estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Letras minúsculas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

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

Leucócitos totais			
		0%	0,50%
Controle	0h	22916 $\pm$ 1513 B	*27380 $\pm$ 1742 A
	3h	25616 $\pm$ 1843 A	26104 $\pm$ 1632 A
	24h	22288 $\pm$ 1954 B	*23697 $\pm$ 1479 B
Controle PBS	0h	22861 $\pm$ 1763 A	
	3h	23240 $\pm$ 1674 A	
	24h	22507 $\pm$ 1983 A	
6/1	0h	25052 $\pm$ 1652 B	*29153 $\pm$ 1532 A
	3h	27032 $\pm$ 1815 A	*28501 $\pm$ 1865 AB
	24h	26169 $\pm$ 1838 AB	*27921 $\pm$ 1863 B
2/1	0h	26670 $\pm$ 1792 B	27366 $\pm$ 1742 B
	3h	28639 $\pm$ 1653 A	*31211 $\pm$ 1582 A
	24h	25379 $\pm$ 1682 B	*28571 $\pm$ 1657 B

Estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Controle PBS - alimentação diária e injeção de PBS no dia 50 do experimento.

Tempos de amostragem: (desafio *Aeromonas hydrophila*) amostrados antes do desafio; 3h e 24h depois.

Letras maiúsculas indicam diferenças significativas nos tempos de amostragem dentro do mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano.

A ausência de letras minúsculas nas barras indica que não houve diferenças significativas entre estratégias de alimentação.

Asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano dentro do mesmo protocolo e tempo de amostragem e setas indicam diferenças apenas entre o controle PBS e o controle inoculado com *Aeromonas hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem.

Tabela 2. Contagem diferencial de células brancas em valores absolutos/ μL^3 (média $\pm$ D.P.) para 3 estratégias alimentares, 2 níveis de β -glucano e 3 tempos de amostragem.

Células		Lin		Neu		Mon		Eos		CGE	
		0%	0,50%	0%	0,50%	0%	0,50%	0%	0,50%	0%	0,50%
Controle	0h	14569 $\pm$ 386 A	*18230 $\pm$ 221 A	3172 $\pm$ 219 B	2764 $\pm$ 413 B	3345 $\pm$ 145 B	4012 $\pm$ 307 B	1008 $\pm$ 41	1081 $\pm$ 86	822 $\pm$ 179B	*1293 $\pm$ 176
	3h	↓13933 $\pm$ 245 B	14486 $\pm$ 241 B	↑5436 $\pm$ 219 A	*4066 $\pm$ 228 A	↑4022 $\pm$ 205 Ab	*5010 $\pm$ 346 Ab	↑1108 $\pm$ 58	1208 $\pm$ 182	1117 $\pm$ 116A	*1334 $\pm$ 107
	24h	↓13474 $\pm$ 393 Bb	*14911 $\pm$ 869 Bb	2913 $\pm$ 350 B	2633 $\pm$ 211 B	↑3638 $\pm$ 297 AB	3674 $\pm$ 235 B	↑1076 $\pm$ 123	1115 $\pm$ 148	1187 $\pm$ 155A	*1364 $\pm$ 228
Controle PBS	0h	14643 $\pm$ 412		3256 $\pm$ 238		3127 $\pm$ 236		1013 $\pm$ 54		822 $\pm$ 179	
	3h	14326 $\pm$ 395		3621 $\pm$ 275		3356 $\pm$ 274		1017 $\pm$ 36		920 $\pm$ 210	
	24h	14175 $\pm$ 389		3052 $\pm$ 317		3257 $\pm$ 219		1025 $\pm$ 48		998 $\pm$ 429	
6/1	0h	15591 $\pm$ 362 A	*19231 $\pm$ 838 A	3664 $\pm$ 309 B	*2936 $\pm$ 395 B	3737 $\pm$ 187 B	4451 $\pm$ 197 B	1017 $\pm$ 103	1150 $\pm$ 119	1043 $\pm$ 97B	*1385 $\pm$ 99
	3h	13238 $\pm$ 415 B	*15110 $\pm$ 257 C	6457 $\pm$ 333 A	*4719 $\pm$ 240 A	4942 $\pm$ 293 Aa	*5772 $\pm$ 354 Aa	1185 $\pm$ 155	1267 $\pm$ 215	1210 $\pm$ 161A	*1633 $\pm$ 222
	24h	15604 $\pm$ 488 Aa	*17609 $\pm$ 525 Ba	4116 $\pm$ 283 B	*3268 $\pm$ 172 B	4014 $\pm$ 232 B	4337 $\pm$ 208 B	1108 $\pm$ 101	1352 $\pm$ 150	1327 $\pm$ 181A	1355 $\pm$ 89
2/1	0h	18080 $\pm$ 621 A	18902 $\pm$ 323 A	3291 $\pm$ 343 B	*2407 $\pm$ 296 B	3331 $\pm$ 153 B	3753 $\pm$ 254 C	1067 $\pm$ 143	1067 $\pm$ 99	901 $\pm$ 29B	*1237 $\pm$ 94
	3h	15401 $\pm$ 324 B	17495 $\pm$ 557 B	5326 $\pm$ 252 A	*4585 $\pm$ 256 A	5309 $\pm$ 347 Aa	6007 $\pm$ 154 Aa	1273 $\pm$ 157	1354 $\pm$ 241	1420 $\pm$ 328A	*1770 $\pm$ 289
	24h	14499 $\pm$ 466 Bb	*17293 $\pm$ 503 Ba	3810 $\pm$ 109 B	3660 $\pm$ 307 AB	4281 $\pm$ 303 AB	4767 $\pm$ 373 B	1301 $\pm$ 258	1322 $\pm$ 251	1488 $\pm$ 226A	1529 $\pm$ 157

Estratégias de alimentação, com β -glucano (0,5%) ou sem β -glucano (0%). Controle - alimentação diária; 6/1 – alimentação por 6 dias e jejum por 1 dia; 2/1 – alimentação por 2 dias e jejum por 1 dia, durante 7 semanas. Controle PBS - alimentação diária e injeção de PBS no dia 50 do experimento.

Tempos de amostragem: (desafio *Aeromonas hydrophila*) amostrados antes do desafio; 3h e 24h depois.

Letras maiúsculas indicam diferenças significativas nos tempos de amostragem dentro do mesmo protocolo de alimentação e nível de β -glucano.

Letras minúsculas entre estratégias de alimentação dentro do mesmo nível de β -glucano e mesmo tempo de amostragem.

Asteriscos indicam diferença entre os níveis de β -glucano dentro do mesmo protocolo e tempo de amostragem e setas indicam diferenças apenas entre o controle PBS e o controle inoculado com *Aeromonas hydrophila* nos diferentes tempos de amostragem.

6. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, P.A.; IWAMA, G.K.; THORNTON, J.C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout. **Journal of Aquatic Animal Health**, n. 12, p. 157-164. 2000.
- AMIN, A.K.M.R.; ISLAM, M.; KADER, M.A.; BULBUL, M.; HOSSAIN, M.A.R.; AZIM, M.E. Production performance of sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus* S. in restricted feeding regime: effects on gut, liver and meat quality. **Aquaculture Research**, n. 43, p. 621–627. 2012.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, n. 73, p. 425-429. 2013.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* fed with β -glucan. **Brazilian Journal of Biology**, n. 74, p. 698-703. 2014.
- CARUSO, G.; DENARO, M.G.; CARUSO, R.; GENOVESE, L.; MANCARI, F.; MARICCHIOLO, G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non-specific immune parameters. **Marine Environmental Research**, n. 81, p. 18-25. 2012.
- CARUSO, G.; DENARO, M.G.; CARUSO, R.; MANCARI, F.; GENOVESE, L.; MARICCHIOLO, G. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). **Marine Environmental Research**, n. 72, p. 46 – 52. 2011.
- CARUSO, G.; MARICCHIOLO, G.; MICALE, V.; GENOVESE, L.; CARUSO, R.; DENARO, M.G. Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*) effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. **Fish Physiology and Biochemistry**, n. 36, p. 71–83. 2010.

CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; BORTOLUZZI, N.L.; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R.Y.; BELO, M.A.A.; SHIMADA, M.T.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Chromium carbocholate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, n. 432, p. 114–118. 2014.

CHANG, C.S.; HUANG, S.L.; CHEN, S.; CHEN, S.N. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 35, p. 115-125. 2013.

CHATAKONDI, N.; YANT, R. Application of compensatory growth to enhance production in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, n. 32, p. 278-285. 2001.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase respiratory burst and the growth rate of snapper *Pagrus auratus*, in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 14, p. 333-345. 2003.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes - Assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 71, p. 161-171. 1999.

DAWOOD, M.A.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and beta-glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Shellfish Immunology**, n. 45, p. 33-42. 2015.

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

- FERGUSON, R. M. W.; MERRIFIELD, D. L.; HARPER, G. M.; RAWLING, M. D.; MUSTAFA, S.; PICCHIETTI, S., BALCÁZAR, J. L.; DAVIES, S. J. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Microbiology**, n. 109, p. 851–862. 2010.
- GARCÍA-MESA, S.; SUÁREZ, M.D.; RODRÍGUEZ-RÚA, A.; CÁRDENAS, S.; GARCÍA-GALLEGO, M. Productive and physiological implications of different feeding frequencies in meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). **Aquacultural Engineering**, n. 60, p. 6–13. 2014.
- GIMBO, R.Y.; FÁVERO, G.C.; MONTOYA, L.N.F.; URBINATI, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, n. 43, p. 295-300. 2015.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. **Aquaculture Research**, n. 41, p. 884-892.
- GUZMAN-VILLANUEVA, L.T.; TOVAR-RAMIREZ, D.; GISBERT, E.; CORDERO, H.; GUARDIOLA, F.A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ASCENCIO-VALLE, F.; ESTEBAN, M.A. Dietary administration of beta-1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead sea bream growth, immune responses and gene expression. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 39, p. 34-41. 2014.
- KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to Microbiology**, n. 15, p. 118-146. 2008.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, n. 173, p. 111-133. 2012.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, n. 22, p. 760–772. 2008.

- KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, n. 10, p. 1325–1334. 2010.
- JORGENSEN, L.V.G. The dynamics of neutrophils in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 55, p. 159 -164. 2016.
- KÜHLWEIN, H.; MERRIFIELD, D. L.; RAWLING, M. D.; FOEY, A. D.; DAVIES, S. J. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 279-289. 2014.
- LI, P.; GATLIN, III. D. M. Dietary brewer yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* $\times$ *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, n. 231, p. 445-456. 2004.
- LIN, S.M.; PAN, Y.; LUO, L., LUO; L. Effects of dietary beta-1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). **Fish & Shellfish Immunology**, n. 31, p. 788-794. 2011.
- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, n. 20, p. 137-151. 2006.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (*Osteichthyes:Cichlidae*) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, n. 30, p. 71-80. 2004.
- MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, SC.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K.; AKHTAR, M. S.; BEHERA, B. K.; KUMAR, K.; PAL, A. K .; MUKHERJEE, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, n. 39, p. 431–457. 2013.

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; CASTEX, J.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, n. 302 p. 1-18. 2010.

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

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, n. 255, p. 82-94. 2006.

NAVARRO, I., GUTIERREZ, J. Fasting and starvation. In Hochachka e Mommsen (eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, vol. 4, p. 393-434, Elsevier Science B.V. 1995.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 85, p. 41-50. 2002.

PALIC, D.; ANDREASEN, C.B.; HEROLT, D.M.; MENZEL, B.W.; ROTH, J.A. Immunomodulatory effects of b-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n.9, p. 817–830. 2006.

POHLENZ, C.; GATLIN III.D.M Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, n. 431, p.111–117. 2014.

RANZANI-PAIVA,M.J.; DE PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS,M.; EGAMI, M.I. **Métodos Para Análise Hematológica Em Peixes**. 1ª Edição. Maringa: Universidade Estadual De Maringa. 2013.

RINGO, E.; OLSEN, R.E.; VECINO, G.L.; WADSWORTH, S.; SONG, S.K. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. **Marine Science Research and Development**, v. 2, n. 1, p. 104-126. 2012.

- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 9, p. 269-290. 1999.
- SAHAN, A.; DUMAN, S. Effects of β glucan on haematology of common carp (*Cyprinus carpio*) infected by ectoparasites. **Mediterranean Aquaculture Journal**, n. 1, p. 1-7. 2010.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary 1,3 β -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 11, p. 683-95. 2001.
- SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) **Fish & Shellfish Immunology**, n. 7, p. 429–437. 1997.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 19, p. 293-306. 2005.
- SIWICKI, A.K.; ZAKES', Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KAZUN', K.; LEPA, A.; GŁABSKI, E. Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms. **Reviews of Fish Biology and Fisheries**, n. 20, p. 435–439. 2010.
- TAKAHASHI, L.S.; TAKAHASHI-BILLER, J.D.; CRISCUOLO-URBINATI, E. URBINATI, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: Effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 95, n.2, p. 259–266. 2011.
- TAKAHASHI, L.S.; TAKAHASHI-BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Physiological Response to *Dolops carvalhoi* (Crustacea: *Branchiura*) infection by pacu, *Piaractus mesopotamicus*, subjected to short cycles of food restriction and refeeding. **Journal of the World Aquaculture Society**, n. 45, p. 567-576. 2014.

- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. Características hematológicas da tilápia rendalli Boulenger, 1986 (osteichthyes: cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, n.19, p.107-114, 2003.
- Tian, X.; Qin, J.G. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, n. 22, p.169-179. 2003.
- Turano, M.J.; Borski, R.J.; Daniels, H.V. Effects of cyclic feeding on compensatory growth of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) foodfish and water quality in production ponds. **Aquaculture Research**, n. 39, p. 1514-1523. 2008.
- Urbinati, E.C.; Sarmiento, S.J.; Takahashi, L.S. Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Aquaculture**, n. 433, p. 430-433. 2014.
- Verlhac, V.; Gabaudan, J.; Obach, A.; Schuep, W.; Hole, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, n. 143, p. 123-133. 1996.
- Wang, Y.; Cui, Y.; Yang, Y.; Cai, F. Partial compensatory growth in hybrid tilapia *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* following food deprivation. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, n.5, p. 389–393. 2005.
- Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C.; Rise, M.L.; Hall, J.R.; Nash, G.W.; Gamperl, A.K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, n. 435, p. 1–9. 2015.
- Zekovic, D.B.; Kwiatkowski, S. Natural and modified (1→3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 25, p. 205–230. 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A estratégia de restrição alimentar por um dia seguida de seis dias de alimentação em pacu não afetou negativamente a taxa de crescimento específico. Porém, a restrição alimentar por um dia seguida de dois de alimentação diminuiu o desempenho produtivo.
2. A suplementação com β -glucano por 15 dias melhorou a conversão alimentar e a absorção de nutrientes, independente da estratégia alimentar empregada,
3. As duas estratégias alimentares testadas, que envolveram períodos de restrição alimentar por um dia, afetaram a resposta imunológica inata de pacu antes do desafio com *Aeromonas hydrophila*, mas não impediram que o sistema imune inato dos peixes reagisse na presença da bactéria.
4. A suplementação com β -glucano melhorou a capacidade de resposta imunológica de pacu quando desafiado com *Aeromonas hydrophila*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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