

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

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

**Adriane Federici Bido
Bióloga**

2020

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

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

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

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

2020

B585e	Bido, Adriane Federici Efeitos da restrição alimentar nos sistemas metabólico, imunológico e antioxidante em juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> / Adriane Federici Bido. -- Jaboticabal, 2020 99 p. : il., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati 1. Metabolismo energético. 2. Crescimento. 3. Imunidade. 4. Estresse oxidativo. 5. Antioxidantes. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ADRIANE FEDERICI BIDO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

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

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

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

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

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

Jaboticabal, 13 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

Charles Darwin

Dedico com muito amor e gratidão...
Aos meus pais, Luiz Antonio Bido e Lúcia H. Federici Bido
Ao meu irmão, Luiz Bido Neto
Eu amo vocês infinitamente. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

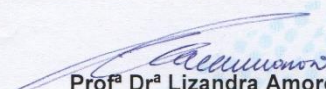


CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 31 de outubro de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fca.unesp.br

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

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

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

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

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução e justificativa

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão de literatura

2.1 Restrição alimentar/realimentação em peixes

Muitas são as estratégias utilizadas na piscicultura para otimizar a produção, entre elas o manejo alimentar que utiliza restrição na oferta do alimento. Ao longo do período de privação alimentar, há regulação das vias metabólicas dos peixes, sendo o estoque energético proveniente do alimento utilizado como fonte de energia para sua sobrevivência (Morales et al., 2004). Os animais, incluindo os peixes, tem a capacidade de enfrentar, na natureza, períodos longos de escassez de alimentação (McCue, 2012, Staples, 2016).

Na literatura são descritas diferentes estratégias alimentares que envolvem alimentação diária contínua e períodos curtos e períodos longos de restrição seguidos de períodos também variáveis de realimentação (Rueda et al., 1998; Souza et al., 2000; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2010; Gimbo et al., 2015; Favero et al., 2018). Os estudos mostram que estas estratégias podem aumentar a eficiência do aproveitamento do alimento e promove crescimento compensatório, aspectos que diminuem o custo de produção e reduzem a presença de resíduos metabólicos e de ração no ambiente (Turano et al., 2008; Takahashi et al., 2010; Urbinati et al., 2014; Favero et al., 2018).

2.1.1 Desempenho zootécnico na restrição alimentar

Os dados de desempenho zootécnico dos peixes são informações relevantes para o desenvolvimento e adequação de novos métodos para viabilizar a melhoria da produção no setor aquícola. Uma estratégia de manejo que tem mostrado resultados satisfatórios é o manejo alimentar que inclui a aplicação de ciclos de jejum e realimentação. Uma das vantagens desta estratégia é o crescimento compensatório dos animais (Xiao et al., 2013; Urbinati et al., 2014), que se aproveitam de mecanismos bioquímicos compensatórios para aumentar a ingestão (hiperfagia) e melhor aproveitar o alimento ingerido, mecanismos estes que sustentam o crescimento compensatório (Won e Borski, 2013; Urbinati et al., 2014). O ganho compensatório é caracterizado pela recuperação rápida de peso através do fornecimento de alimentos na realimentação, sustentado pela velocidade de recuperação do perfil metabólico (Morales et al., 2004).

O crescimento compensatório pode ser dividido em diferentes graus de compensação, assim: 1 - Sobre-compensação: animais em restrição alimentar atingem tamanho maior, no mesmo período que animais alimentados continuamente; 2 - Compensação total: animais em restrição alimentar atingem no mesmo período, o mesmo tamanho dos animais alimentados continuamente. 3 - Compensação parcial: após a restrição alimentar, os animais não atingem o mesmo tamanho que animais alimentados continuamente, embora apresentem alta taxa de crescimento, podendo apresentar melhora na conversão alimentar durante o período de realimentação; 4 - Não compensação: ausência de respostas compensatórias durante a realimentação em animais submetidos a restrição alimentar (Ali et al., 2003).

A utilização de estratégias de alimentação com jejum e realimentação é uma forma de explorar a capacidade natural de recuperação metabólica, crescimento dos animais e, ao mesmo tempo reduzir custo de produção e eliminação dos resíduos da alimentação (Souza et al., 2003). Muitos estudos avaliaram o uso de estratégias de restrição alimentar e realimentação em peixes, entretanto os resultados são muito variáveis e dependem de vários fatores, como espécie, condições climáticas, época do ano e extensão dos períodos de restrição e de realimentação, entre outros.

Takahashi et al. (2010) não observaram crescimento compensatório total em pacu submetidos a estratégias alimentares de ciclos curtos (3 dias de privação alimentar seguidos de 3 dias de realimentação), embora Favero et al. (2018) tenham relatado maior ganho de peso e taxa de conversão alimentar em apenas 5 dias de realimentação, em pacu sem alimentos por 30 dias. Em matrinxã (*Brycon amazonicus*), houve crescimento total após ciclos curtos de restrição/realimentação (jejum de 2 dias e realimentação de 3 ou 4 dias) (Urbinati et al., 2014). Estudando *Umbrina cirrosa*, Hidalgo et al. (2017) observaram que ciclo de 30 dias de jejum seguidos de 30 dias de realimentação promoveu crescimento compensatório. Utilizando diferentes estratégias alimentares (7 dias de jejum e 21 dias de realimentação; 14 dias de jejum e 21 dias de realimentação), Gune et al. (2018) também observaram crescimento compensatório completo em *Acipenser stellatus*.

2.1.2. Metabolismo energético em peixes

Os efeitos da restrição alimentar são bastante variáveis e dependem da espécie de peixe, fase da vida, temperatura e fotoperíodo, época do ano e estratégia experimental (Furné et al., 2012; Glencross e Bermudes, 2011; Biswas et al., 2002; Jørgensen et al., 2013; Reigh et al., 2006), mas, em todas as condições, o desafio dos peixes durante situações de baixa disponibilidade de alimentos é manter as funções fisiológicas, modulando a mobilização das reservas metabólicas (Navarro; Gutiérrez, 1995; Bar, 2014; Li et. al., 2018).

As reservas energéticas, como glicogênio, lipídios e proteínas, representam a chave da sobrevivência em condições de baixo consumo energético ou jejum completo (Secor e Carey, 2016). O primeiro substrato utilizado na maioria das espécies de peixes é o glicogênio, seguido da mobilização da reserva lipídica no fígado e/ou músculo, como relatado em *Piaractus mesopotamicus* (Souza et al., 2003; Favero et al., 2018), *Rhamdia quelen* (Barcellos et al., 2010), *Prochilodus lineatus* (Rios et al., 2011), *Oncorhynchus mykiss* (Furné et al., 2012), *Acipenser baerii* (Ashouri et al., 2013), *Carassius auratus gibelio* (Li et al., 2018) e *Labeo rohita* (Dar et al., 2018). A glicogenólise, por meio da enzima glicose-6-fosfatase, ajuda a manter a homeostase da glicose no sangue durante os primeiros estágios do jejum (Furné et al., 2012; Nelson; Cox, 2014), da mesma forma que a gliconeogênese,

utilizando lactato, glicerol ou alguns aminoácidos como substrato (Polakof et al., 2012).

A glicose sanguínea é normalmente a variável fisiológica mais utilizada para determinar a dinâmica energética em animais que passam por privação de alimentos (McCue, 2010). Entretanto, as concentrações de glicose podem não apresentar alterações, dependendo de vários fatores. Estudos com diferentes peixes não relataram alterações das concentrações de glicose durante restrição alimentar (Barcellos et al., 2010; Yarmohammadi et al., 2012; Kim et al., 2014). Já Favero et al. (2018) observaram em pacu, redução de glicose no plasma após 15 dias de restrição alimentar e elevação a níveis superiores aos do grupo controle após 5 dias de realimentação. Em *Hoplosternum littorale*, privação alimentar de 7 e 28 dias reduziu os níveis plasmáticos de glicose, além de reduzir proteína no fígado e glicogênio no músculo (Rossi et al., 2015).

Os lipídios representam a principal fonte de energia metabólica para os peixes (Sheridan, 1994; Tocher, 2003). O tecido adiposo tem a função de armazenar energia, na forma de triglicerídeos em seu citoplasma, quando a ingestão de substratos energéticos é maior que o gasto (lipogênese), e liberar energia na forma de ácidos graxos durante o jejum (lipólise) (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Em peixes, os estoques de lipídio são encontrados no mesentério, fígado e músculos (Sheridan, 1994). A gordura mesentérica mostrou-se uma importante fonte de energia em pacu em condições de restrição alimentar por longo período (Souza et al., 2000) e seus níveis foram reduzidos, no mesmo peixe, durante privação de alimento por períodos mais curtos (Takahashi et al., 2010; Fávero et al., 2018). Intensa lipólise no fígado, músculos e vísceras foi observada em peixes submetidos a restrição alimentar, junto com aumento das concentrações de ácidos graxos livres (Takahashi et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2012; Urbinati et al., 2014) e glicerol (Gimbo et al., 2015), ambos produtos de lipólise. Redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, após privação alimentar de 7 dias, foi descrito em *Hoplosternum littorale* (Rossi et al., 2015) enquanto, aos 28 dias, houve redução dos triglicerídeos e colesterol no sangue dos peixes. Em pacu, Favero et al. (2018) observaram redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, após 15 dias de restrição alimentar.

A proteína muscular é a última reserva mobilizada (Navarro e Gutierrez, 1995). Diferentemente, algumas espécies tentam preservar os estoques de glicogênio no fígado, mobilizando a proteína para gliconeogênese e os lipídios como substratos energéticos (Sheridan e Mommsen, 1991). Assim, a dinâmica metabólica de carboidratos, lipídios e proteínas é indicador da homeostase energética nos peixes.

2.1.3. Restrição alimentar e estrutura do epitélio intestinal de peixes

A parede intestinal dos peixes apresenta quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Genten et al., 2009). Os peixes possuem uma monocamada de células epiteliais cilíndricas, na qual a submucosa é constituída de um tecido conjuntivo que sustenta a mucosa, e logo abaixo a muscular tendo uma camada circular interna e longitudinal responsável pelo movimento peristáltico; e a serosa, formada pelo tecido conjuntivo e epitelial (Honorato et al., 2011).

Em peixes, o mecanismo de transporte de macromoléculas pode manter-se funcional até a vida adulta, no entanto pode variar de acordo com cada espécie e no decorrer da fase da vida (Stroband e Van Der Veen, 1981). No epitélio intestinal de peixes, encontram-se os enterócitos (Wilson e Castro, 2011), que são células cilíndricas de revestimento, que participam do processo absorptivo (Galjaard et al., 1970). Na região apical, entre os enterócitos encontram-se as células caliciformes (Barbieri e Hernández-Blazquez, 2008), que têm o papel de produzir muco para proteger e lubrificar o revestimento intestinal (Deplancke e Gaskins, 2001). Este muco é composto por mucinas ácidas ou neutras (Díaz et al., 2008). A mucina ácida tem a capacidade de proteger contra patógenos e também como barreira física (Arellano et al., 2001). Já as mucinas neutras encontram-se no estômago e no intestino preservando o epitélio contra agentes infecciosos (Banan Khojasteh et al., 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que o jejum causa mudanças histológicas e morfológicas na mucosa intestinal dos peixes, como em *Acipenser transmontanus* em que houve diminuição da altura da dobra intestinal (Domeneghini et al., 2002); em *Hyphessobrycon luetkenii* com alterações nos enterócitos e diminuição da altura intestinal (Gaucher et al., 2012); e em *Silurus meridionalis* com danos na superfície das microvilosidades (Zeng et al., 2012). Gaucher et al. (2012) observaram alteração

no número das células caliciformes em peixes submetidos a restrição alimentar, ou seja, aumento em *Hyphessobrycon luetkenii* e redução em *Silurus meridionalis*. No pacu, Castilho (2016) demonstrou, para esta mesma variável, diminuição conforme o período de jejum, dados encontrados também por Zeng et al. (2012), demonstrando que o jejum afeta a densidade das células.

A flexibilidade digestiva é um fenômeno entre os animais que apoia a ideia de que o tamanho do intestino é ajustado às demandas nutricionais (Starck, 1999; Karasov et al., 2011). As vilosidades intestinais são revestidas por epitélio simples colunar formado por enterócitos, cuja integridade e tamanho possibilitam maior absorção dos nutrientes (Junqueira e Carneiro, 2005). A manutenção da integridade epitelial promove proteção e aumento no comprimento das vilosidades o que pode ser relacionado com melhor capacidade de absorção e aproveitamento dos nutrientes. Gaucher et al. (2012) observaram redução na altura das vilosidades em *Hyphessobrycon luetkenii*, resultado semelhante ao descrito em pacu (Castilho, 2016), após ciclos alternados e longos de restrição alimentar.

Outra função importante da mucosa intestinal é servir de barreira imunológica. O intestino não é apenas um órgão de digestão e absorção, mas tem também papel imunológico, na defesa a agressões do meio externo (Guarner, 2006). A migração de leucócitos para a mucosa intestinal (infiltrado leucocitário) é um componente importante do sistema imune inato que integra o tecido linfoide associado ao intestino (GALT) (Picchietti et al., 2007). Em peixes, a estrutura do infiltrado não é organizada, apresenta distribuição difusa sem nódulo linfoide, estruturada por linfócitos intraepiteliais, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Cerezuela et al., 2012). A migração de células imunes do sangue por meio do endotélio vascular para a matriz extracelular dos tecidos é um fato comum no surgimento de inflamações (Cid, 1996). Em vista disso, o infiltrado tecidual por leucócitos depende de interações dinâmicas, que requerem regulação entre leucócitos, células endoteliais e um complexo de receptores na região da matriz extracelular (Butcher et al., 1996).

O perfil do infiltrado leucocitário em peixes submetidos a estratégias alimentares de restrição/realimentação é ainda pouco conhecido. Castilho (2016) observou, em pacus submetidos a estratégias alimentares de ciclos curtos de jejum (6 dias de alimentação e 1 dia de jejum; alimentação por 2 dias e 1 dia de jejum),

diminuição de infiltrado leucocitário em ambos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle. Assim, a presença de leucócitos e macrófagos, presentes entre as células epiteliais do intestino, é considerada como um sinal de que o segmento intestinal tem importância imunológica (Rombout et al., 2011).

2.1.4. Restrição alimentar e sistema imunológico em peixes

O sistema imunológico é composto por componentes celulares e humorais, usados para defender o organismo de uma ampla variedade de agentes, desde vírus, bactérias, parasitas e células tumorais (Rauta et al., 2012; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Urbinati et al., 2020).

Assim como nos demais vertebrados, o sistema imunológico dos peixes é dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo ou de memória. A resposta imune inata é composta por fatores físicos, celulares e humorais incluindo moléculas receptoras celulares que são solúveis no plasma e em outros fluidos corporais (Uribe et al., 2011; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Urbinati et al., 2020), e é tida como a primeira barreira que protege o organismo contra agressões externas. Ela é ativada pela detecção de agentes infecciosos por meio de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), que interagem com estruturas presentes no patógeno denominado “padrão moleculares associados aos patógenos” (PAMPs) (Palm e Medzhitov, 2009; Boltaña et al., 2011). Os PRRs reconhecem o patógeno diretamente, por PRRs de transmembrana ou citoplasmáticos, e, indiretamente, através do reconhecimento de patógenos opsonizados (Calich et al., 2008). A relação PAMPs e PRRs desencadeia sinalização intracelular, facilitando a internalização e fagocitose dos patógenos, que resulta em morte destes agentes (Calich et al., 2008; Kum e Sekkin, 2011).

A superfície do corpo dos peixes apresenta barreiras físicas, como a pele e o muco, que contém lectinas, lisozimas, proteínas do sistema complemento, peptídeos antibacterianos e imunoglobulinas, que têm um papel importante na inibição da entrada de patógenos (Boshra et al., 2006; Saurabh e Sahoo, 2008; Rauta et al., 2012). Se a barreira física não for suficiente para impedir o agente invasor, ocorre a ativação do sistema imune inato, celular e humoral. Os componentes celulares do sistema imune inato são células de defesa ou fagócitos (macrófagos, monócitos,

granulocitos e células “natural killers”), responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose e destruição do patógeno, inicialmente por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a respiração celular ativada pelo micro-organismos, que atuam como bactericidas (Secombes, 1996). Ao mesmo tempo, o sistema imune inato age através de componentes solúveis nos líquidos corporais. Este mecanismo do sistema inato inclui a produção de compostos antibacterianos, proteínas de fase aguda da inflamação, proteínas do sistema complemento da via alternativa e citocinas (Ellis, 1999 e 2001; Tort et al. 2003; Uribe et al., 2011).

O sistema complemento é constituído por um conjunto de 35 proteínas séricas e de membrana, que participam das respostas imunológicas inata e adquirida (Carroll, 2004; Urbinati et al., 2020). Em peixes, assim como nos vertebrados em geral, o sistema complemento pode ser ativado de três maneiras: pela via clássica desencadeada pela ligação de anticorpos à superfície celular (Holland e Lambris, 2002), a via alternativa ativada diretamente por microorganismos, e a via das lectinas, ativada pela ligação de um complexo proteico de manose/lectina as células bacterianas (Sakai, 1992).

A lisozima é uma enzima bacteriolítica distribuída por todo organismo, sendo uma das respostas inatas mais estudadas (Saurabh e Sahoo, 2008). A lisozima está presente no soro, secreções, mucosas e tecidos ricos em leucócitos, principalmente nos rins e intestino (Grinde et al., 1988). Produzida por leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos (Murray e Fletcher, 1976), esta enzima atua na digestão de carboidratos presentes (peptidoglicano) na parede bacteriana, mecanismo de opsonização e atividade antiviral (Ellis, 1999 e 2001; Magnadottir, 2006; Saurabh e Sahoo, 2008).

As células de defesa representadas por fagócitos, neutrófilos e macrófagos são muito importantes devido às suas grandes quantidades de enzimas em lisossomos e espécies reativas de oxigênio produzidas durante a fagocitose (Magnadottir et al., 2011). Além disso, neutrófilos e macrófagos são capazes de produzir ânions superóxidos, atuando como bactericida extracelular que por meio da “explosão oxidativa” (do inglês, *oxidative burst*), formam compostos reativos derivados do oxigênio (Secombes, 1996, Biller-Takahashi et al., 2015; Biller e Takahashi, 2018). No “*burst*” oxidativo ocorre a redução de O_2^- em H_2O_2 , e

posteriormente liberação de radicais $\text{OH}^\cdot$, H_2O e cloraminas, cuja função é agir na destruição de agentes infecciosos (Biller e Takahashi, 2018).

O funcionamento do sistema imune, tanto na ativação da fagocitose como na síntese das inúmeras proteínas que o compõem, exige uma intensa mobilização de energia. Assim, é necessário conhecer se a aplicação de ciclos de restrição alimentar pode afetar a homeostase do sistema imune dos peixes, visto que durante a restrição ocorre intensa mobilização de energia para manutenção dos sistemas biológicos, e desta forma deixar os peixes suscetíveis a desafios do meio aquático.

Os dados disponíveis na literatura são ainda conflitantes. Caruso e Sheridan (2011) submeteram robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Pagellus bogaraveo*) a jejum de 31 dias, e observaram maior atividade da lisozima no robalo. Neste mesmo estudo, a atividade respiratória de leucócitos diminuiu nos peixes sob restrição em ambos os peixes. Em *Paralichthys olivaceus*, as concentrações plasmáticas de lisozima aumentaram depois de 21 dias de privação de alimento (Kim et al., 2014) e os autores do estudo afirmaram que o jejum a curto prazo consiste em um reajuste do metabolismo, e não de uma ativação de uma resposta de estresse e alarme.

A capacidade de adaptação fisiológica ao jejum para manter funções vitais durante esse período foi relatada por Gimbo et al. (2015) que mostraram que pacus (*Piaractus mesopotamicus*), mesmo em balanço energético negativo, após 30 dias de jejum, foram capazes de acionar respostas imunes inatas após uma infecção bacteriana experimental. Estes autores observaram que a atividade respiratória de leucócitos foi menor em peixes sob restrição alimentar, aumentando logo após inoculação bacteriana, quando comparados com peixes continuamente alimentados, e entre os peixes sob privação, a concentração sérica de lisozima não mudou ao longo de todo o experimento.

2.1.5. Restrição alimentar e a interação com o sistema antioxidante em peixes

É conhecido que os peixes têm a capacidade de resistir a longos períodos de jejum, ocorrência que faz parte de seu ciclo de vida (Miller et al., 2009) e a restrição alimentar já é uma forma de manejo alimentar que pode ser útil nos sistemas produtivos (Furné et al., 2012). A privação de alimentos, se aplicada de forma inadequada, sem respeitar os limites bioquímicos do organismo, pode afetar o

crescimento, desenvolvimento, criação e sobrevivência dos peixes (Furné et al., 2009; Bayir et al., 2011), processos altamente dependentes de energia para seu funcionamento, mas se se ajustarem às características biológicas dos peixes, ela pode ser uma ferramenta de importância na otimização do desempenho zootécnico, na redução de custo da atividade de criação e na redução de impactos que a atividade pode ter no ambiente.

Considerando que durante a restrição alimentar e a realimentação, a dinâmica metabólica do organismo passa por alterações profundas em relação à produção de energia, é possível que os mecanismos de oxirredução na cadeia fosforilativa mitocondrial sejam afetados por essas estratégias alimentares. Pouco se sabe sobre a associação de restrição alimentar com estresse oxidativo em peixes, bem como o uso de dietas suplementadas com antioxidantes.

A produção de espécies reativas de oxigênio é um processo natural do metabolismo aeróbico, como ocorre em mitocôndrias, membranas e citoplasma (Sies, 1997; Biller e Takahashi, 2018). A mitocôndria é responsável pela maior parte de geração de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a geração de energia proveniente da glicose e do oxigênio (Gutierrez et al., 2006; Genestra, 2007). Em nível celular, a resposta metabólica de produção de energia está ligada a reações de oxirredução que ocorrem na cadeia fosforilativa mitocondrial, durante a respiração celular, que resultam na formação de diferentes radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). Em condições normais, o organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidante para controlar os níveis intracelulares de EROs e impedir os danos celulares (Sies, 1993). O estresse oxidativo se dá pela produção elevada de EROs, que supera a capacidade antioxidante celular (Schieber et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Halliwell e Gutteridge, 1999), radicais livres e/ou derivados de oxigênio gerados como produtos do metabolismo oxidativo em condições fisiológicas (Winston e Di Giulio, 1991; Matés, 2000). As EROs destroem biomoléculas, como proteínas, carboidratos, DNA e lipídios, causando peroxidação lipídica da membrana (Aschbacher et al., 2013; Biller e Takahashi, 2018) e estão associadas a patologias como aterosclerose, diabetes,

obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (Green et al., 2004; Burneiko et al., 2006), além de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento.

Para a proteção das células contra danos causados pelos radicais livres em excesso ($\text{HO}\cdot$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o organismo desenvolveu um mecanismo de defesa para remoção/neutralização das EROs (Yang e Lee, 2015), que inclui diferentes enzimas antioxidantes que agem de maneira coordenada para garantir a proteção ideal contra o estresse oxidativo (Lushchak, 2011; Yang et al., 2019).

O sistema antioxidante tem dois componentes: enzimático e não enzimático. O sistema de defesa enzimático é o primeiro a agir contra as EROs, e inclui um conjunto de enzimas endógenas - a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e GST – (glutathione S-transferase), que são indicadores dos processos de oxidação/redução (Barbosa et al., 2010; Yang e Lee, 2015; Ighodaro e Akinloye, 2018) e atuam para anular o excesso de EROS (Jeevitha et al., 2014; Halliwell e Gutteridge, 2007). O sistema de defesa antioxidante também inclui antioxidantes não-enzimáticos, com baixo peso molecular, como a glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C) e antioxidantes lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E) (Kling e Olsson, 2000).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que possibilita que duas moléculas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se dismutem para a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Antunes-Neto, 2005). Contudo, o H_2O_2 tem propriedade de permeabilização de membrana podendo unir-se com um elétron derivado de metais de transição como o Fe^{2+} ou Cu^+ , o que possibilita a formação da radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), um dos radicais mais reativos (Jenkins et al., 1993).

A catalase (CAT) tem a função biológica de decompor o H_2O_2 para formação de água e oxigênio (Oliveira e Schoffen, 2010; Vasylykiv et al., 2011). É encontrada em peroxissomas e em baixa concentração nas mitocôndrias (Halliwell et al., 1989), sangue, medula óssea, mucosas, rim, fígado (Mayes et al., 1990), eritrócitos e baço (Oliveira e Schoffen, 2010). Sua atividade é dependente de NADPH (Eaton et al., 1991). A catalase evita danos causados pelo peróxido de hidrogênio e o acúmulo de metahemoglobina (Vasylykiv et al., 2011).

A enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O por meio da conversão da GSH (glutathiona reduzida) a GSSG (glutathiona oxidada) (Oliveira e Schoffen, 2010): $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ (Antunes-Neto, 2005). Tem alta atividade no fígado, moderada no coração, pulmão e cérebro, e baixa nos músculos (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Entre as enzimas detoxificantes estudadas em diferentes organismos está a glutathiona S-transferase (GST), pertencente a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathiona a várias outras moléculas, e possuem um papel fundamental em mecanismos de detoxificação intracelular de compostos endo e xenobióticos (CHELVANAYAGAM et al., 2001). Além disso a GST é um grupo de enzimas que apresentam elevada especificidade pela glutathiona reduzida (GSH) e funciona como um segundo substrato (Torres et al., 2004). Produtos reativos de processos intracelulares, como na peroxidação de lipídios, atuam como substratos para a GST. São encontradas com elevada atividade no intestino, pulmão e fígado; este último um tecido com grande fração das proteínas hepáticas solúveis em peixes (Torres et al., 2004). Dessa forma, através de ligações covalentes com os compostos tóxicos, a GST reduz a capacidade desses compostos se ligarem a macromoléculas celulares, como o DNA (Stegeman et al., 1992). Portanto, como a GST é uma enzima dependente da GSH, alterações nas concentrações de GSH também podem influenciar na redução da atividade de GST (López-López et al., 2011).

A glutathiona reduzida (GSH) é o antioxidante celular não enzimático mais abundante, e está envolvida na proteção de células contra mecanismos ativos de desintoxicação (Van Der Oost et al., 2003, Jiang et al., 2015). A GSH é uma flavoproteína dependente do NADPH, e, portanto, dependente da via das pentoses (Antunes-Neto, 2005). Sob condições de redução da produção de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo na atuação da GSH (Shan et al., 1990).

A catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) interagem para diminuir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de proporcionar danos latentes. O excesso do H_2O_2 permite, a partir das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, a produção da radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), na qual

não existe defesa enzimática. A GPx reduz o H_2O_2 à água, contudo o faz à custa da conversão da glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), sendo que a GSSG proporciona ação oxidante decorrente da ligação dissulfeto que existe em sua estrutura. Desse modo, a ação da glutathiona redutase (GRd) é fundamental e responsável pela recomposição da glutathiona reduzida (GSH), enquanto a glutathiona S-transferase é responsável por reduzir os compostos tóxicos, produzidos por meio de processos intracelulares (Rover et al., 2001). Dessa forma, a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathiona e, conseqüentemente, do equilíbrio entre os sistemas de defesa enzimáticos é fundamental para garantir a funcionalidade de todas as enzimas.

A Figura 1 mostra as vias nas quais atuam as enzimas antioxidantes descritas.

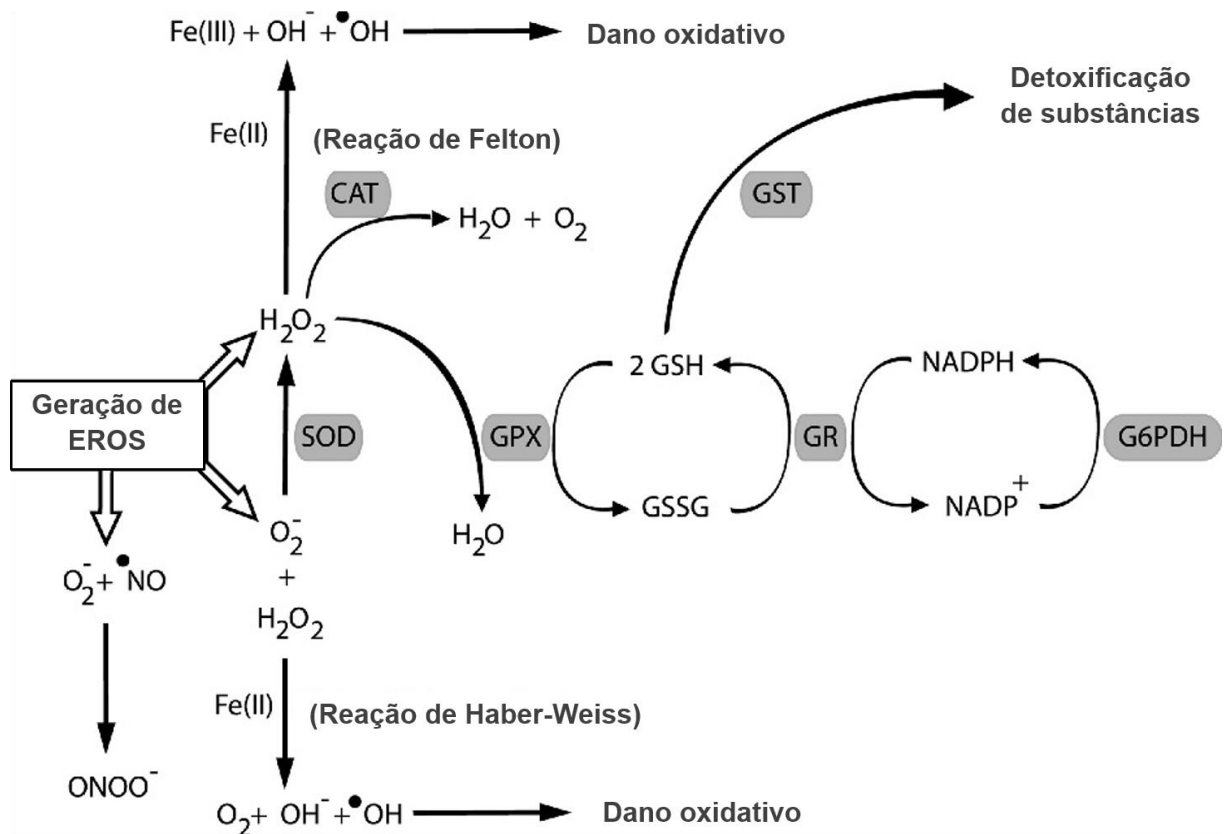


Figura 1. Integração do sistema de defesa antioxidante enzimático. Adaptado de Storey, 2004.

2.1.6. Restrição e sistema antioxidante em peixes

O funcionamento do sistema antioxidante durante estratégias de restrição alimentar seguido de realimentação em peixes é ainda pouco explorado. Efeitos da restrição alimentar podem estar ligados à produção de EROs, conhecidas por causar estresse oxidativo (Robinson et al., 1997). Estudo com truta marrom (*Salmo trutta*) mostrou que o jejum induziu economia de energia no fígado, às custas de aumento da produção mitocondrial de H_2O_2 , uma ERO muito importante e sugeriu a possibilidade de um mecanismo de equilíbrio entre benefícios energéticos agudos do jejum com potenciais custos a longo prazo (Salin et al., 2018).

Os estudos disponíveis mostram diferenças nas respostas do sistema antioxidante ao jejum, mas eles diferem em relação à estratégia experimental, à extensão do período de jejum e realimentação e a espécie. Estudo com truta marrom (*Salmo trutta*) mostrou que a SOD, CAT, GPx no fígado aumentaram durante 49 dias de privação alimentar total ou parcial (0; 0,5 e 1% do peso corporal), porém a GST diminuiu, e após a realimentação de 21 dias seus níveis retornaram a valores basais, enquanto SOD e GPx não se recuperaram (Bayir et al., 2011). Tanto o jejum parcial como o total induziram o estresse oxidativo, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da concentração de malondialdeído, subproduto do estresse oxidativo, nos tecidos hepático e branquiais. Estudo com *Hoplosternum littorale* mostrou que após 28 dias de jejum houve danos nas enzimas antioxidantes (GST, GR, GPx e CAT) (Rossi et al., 2015), enquanto em *Dentex dentex*, jejum de 5 semanas ativou a SOD, CAT e GPx e reduziu a atividade da GR em 53% em comparação com a condição controle. Em outro estudo, Karataş (2018) observou, em *Oncorhynchus mykiss*, após 8 dias de jejum, redução na atividade das enzimas CAT e GPx. Já, Varju et al. (2018) observaram em *Sander lucioperca* L., após 42 dias de privação alimentar, atividade mais baixa de GSH e GPx no fígado, sugerindo prejuízo do sistema da glutatona a longo prazo e consequentemente aumento de peroxidação lipídica. Recentemente, Yang et al. (2019) observaram em *Acipenser dabryanus*, após período de 4 e 8 semanas de restrição alimentar, aumento da atividade da SOD e GPx no soro e fígado e redução da atividade da CAT e sugeriram que os peixes alteraram as defesas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo induzido pela restrição.

Embora a literatura nos forneça algumas informações sobre a utilização de estratégias alimentares de jejum/realimentação e o sistema antioxidante, os dados ainda são insuficientes, permitindo a formulação de hipóteses, visando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos de modo a se estabelecer estratégias para manejos adequados e produção mais eficiente no setor aquícola.

2.2. L-Glutamato

Embora o organismo tenha um sistema antioxidante natural para se proteger, é cada vez mais comum o uso de antioxidantes exógenos como fontes terapêuticas, por exemplo, fármacos com capacidade de limitar a propagação das reações em cadeia e lesões provenientes dos radicais livres (Magwere, 2006). Sementes oleaginosas, ervas e frutas também são antioxidantes exógenos que por sua vez não são produzidos pelo corpo (Osawa, 1995), mas que podem ser adquiridos por uma dieta. É o caso da vitamina E, carotenoides (Schull et al., 2016), além do ácido glutâmico (L-GLU), objeto deste estudo. É possível, ainda, que, em manejo alimentar utilizando restrição alimentar, a dieta oferecida durante a realimentação possa ser suplementada com nutriente com capacidade antioxidante possa ser uma ferramenta de melhoria das respostas do peixe.

Os aminoácidos são classificados como essenciais e não essenciais (Andersen et al., 2016). O L-glutamato ou ácido glutâmico (L-GLU) é um aminoácido não essencial encontrado em proteínas de origem animal e vegetal (Haynes et al., 2009; Li et al., 2011), metabolicamente versátil (Brosnan, 2000) e que afeta a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotideo hidreto (NADH) (Minarik et al., 2002). Atua como facilitador na síntese e na degradação de aminoácidos; modula a desintoxicação da amônia em uréia pela concentração intra-hepática; e a oxidação do glutamato media a secreção de insulina estimulada por aminoácidos (Kelly e Stanley, 2001). Além disso, a descarboxilase do ácido glutâmico é responsável pela conversão do glutamato em GABA, um importante neurotransmissor inibidor (Scriver e Gibson, 1995; Kelly e Stanley, 2001; Li et al., 2009). O glutamato apresenta propriedades funcionais no metabolismo de peixes (Andersen et al., 2016) e está envolvido na regulação da glicólise (Li et al., 2007), podendo prejudicar durante o armazenamento de glicogênio (DiMauro e Tsujino, 1994).

O glutamato desempenha papel variável no metabolismo e função dos leucócitos (Newsholme et al., 2003). Li et al. (2007) sugerem que o glutamato na dieta é necessário para manter um ótimo estado imunológico sob condições de imunossupressão (Li et al., 2007). Desempenha função no metabolismo de leucócitos como substratos energéticos, e são neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso central e periférico, modulando o sistema imunológico (Newsholme et al., 2003).

Além disso, o glutamato atua como precursor imediato da síntese da glutathione, desempenhando um papel importante na remoção de oxidantes (Wu et al., 2004a). Apresenta, ainda, propriedade antioxidante intracelular, além de atuar na regulação do apetite e da digestão (Caballero-Solares, 2015), como substrato oxidativo da mucosa intestinal (Reeds et al., 2000; Blachier et al., 2009), e no metabolismo e sinalização celular (Brosnan e Brosnan, 2013). Larsson et al. (2014) observaram, em *Salmo salar* L., uma melhora no intestino, em relação a função e desenvolvimento, resultante da suplementação de L-Glu que pode estar relacionada à maior proteção contra espécies reativas de oxigênio nos enterócitos.

A utilização de ácido glutâmico na dieta de carpa (*Ctenopharyngodon idella*) mostrou-se eficaz na redução do estresse oxidativo (Zhao et al., 2015). Em suínos, o L-glutamato promoveu aumento nas vilosidades intestinais, sugerindo capacidade antioxidante do produto (Rezaei et al., 2013), e melhorou a integridade intestinal, além de aumentar o número de receptores de aminoácidos e transportadores, beneficiando a detecção e transporte de nutrientes no trato gastrointestinal (Lin et al., 2014).

Parte do glutamato e da glutamina são absorvidos pelo intestino e são transportadas até o fígado (Brosnan, 2003). Do ponto de vista metabólico, o ácido glutâmico promoveu alterações no metabolismo hepático da glicose em *Sparus aurata*, e facilitou a substituição da proteína por carboidratos da dieta (Caballero-Solares et al., 2015). Foi relatado que a suplementação de glutamato aumenta em *Salmo salar* L. (Oehme et al., 2010), diminui em *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva et al., 2010) ou não afeta o desempenho do crescimento em *Oncorhynchus mykiss* (Kirchner et al., 2003).

Assim, as poucas informações na literatura sobre a associação da restrição alimentar com estresse oxidativo em peixes e sobre o uso de antioxidantes na dieta justificam novas investigações, particularmente em espécies nativas sobre as quais nada se conhece.

2.3. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O modelo deste estudo é o pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), da família Characidae, espécie neotropical encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975). É uma espécie de grande importância comercial na América do Sul (Valladão et al., 2018) e está entre as espécies nativas mais produzidas no país (Anuário Peixe Br, 2019). Os estudos sobre a espécie se concentram nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Urbinati et al., 2013). É um peixe que apresenta elevada taxa de crescimento, qualidade da carne, hábito alimentar onívoro, fato que lhe confere uma característica importante que é a alta tolerância a carboidratos na dieta (Takahashi et al., 2018), comparado a outras espécies. Estudos têm mostrado que é um peixe que responde bem ao manejo alimentar que inclui restrição e realimentação (Souza et al., 2000; Souza et al., 2003; Takahashi et al., 2010; Gimbo et al., 2015; Favero et al., 2018).

3. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi investigar como a restrição alimentar, por ciclos curto e longo, e a suplementação dietética com o L-glutamato afetam os sistemas metabólico, imune e antioxidante, e o desempenho em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), considerando que a dinâmica energética que ocorre durante o período de restrição e de realimentação e sua relação com os sistemas metabólico, imunológico e antioxidante, dependem de homeostase energética.

4. Referências bibliográficas

Ali MZ, Nicieza A, Wootton RJ (2003) Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries** 4:147–190.

Antunes-Neto JMF, Silva LP, Macedo DV (2005) Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. **Revista Brasileira de Ciências e Movimento** 13:7-15.

Anuário peixe br da piscicultura 2019. <https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/>.

Arellano JM, Storch V, Sarasquete C (2001) Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Histology and Histopathology** 6:511-521.

Aschbacher K, O'donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epel E (2013) Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. **Psychoneuroendocrinology** 38:1698-1708.

Ashouri G, Yavari V, Bahmani M, Yazdani MA, Kazemi R, Morshedi V, Fatollahi M (2013) The effect of short-term starvation on some physiological and morphological parameters in juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria** 43:145-150.

Banan khojasteh S, Sheikhzadeh F, Mohammadnejad D, Azami A (2009) Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **World Applied Sciences Journal**, Dubai, 6:1525-1531.

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

Barbieri RL, Hernández-Blazquez FJ (2008) Análise ultra-estrutural da absorção intestinal de macromolécula protéica com o uso de peixe como modelo experimental. **Conscientiae Saúde Revista Científica**, São Paulo 1:21-30.

Barbosa K BF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPRE Bressan J (2010) **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição 23:629-643.

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

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

Biller-takahashi JD, Takahashi LS, Mingatto FE, Urbinati EC (2015) The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish and Shellfish Immunology** 47:360-367.

Biller-Takahashi JD, Urbinati EC (2014) Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 86:1483-1495.

Biller JD, Takahashi, LS (2018) Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 90:3403-3414

Biswas AK, Endo M, Takeuchi T (2002). Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed young tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science** 68:465–477.

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

Boltanã S, Rohera N, Goetz FW, Mackenzie AS (2011). PAMPs, PRRs and the genomics of gram-negative bacterial recognition in fish. **Developmental and Comparative Immunology** 35: 1195-1203.

Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish and Shellfish Immunology** 20:239–262.

Brosnan JT, Brosnan ME (2013) Glutamate: a truly functional amino acid. **Amino Acids** 45:413–418.

Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, Padonavi CR, Cicogna AC, Novelli ELB (2006) Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology** 44:1167-1172.

Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. **Science** 272:60-66.

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

Calich VLG, Pina A, Felonoto M, Bernadino S, Costa TA, Loures FV. (2008) Toll-like receptors and fungal infection: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidiosis. **Immunology and Medical Microbiology** 53:1-7.

Carroll MC (2004) The complement system in B cell regulation. **Molecular Immunology** 41:141–146.

Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Mancari F, Genovese L, Maricchiolo G (2011) Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) **Marine Environmental Research** 72:46-52.

Castillo ASC (2015) **Efeito do β -glucano dietético na dinâmica metabólica, na resposta imunológica inata e no desempenho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após ciclos curtos de jejum e realimentação.** 93f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – CAUNESP, Unesp- Jaboticabal.

Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, Mesequer J, Moriñigo MÁ e Esteban MÁ (2012) Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. **Cell and Tissue Research** 350:477-489.

Cid MC (1996) New developments in the pathogenesis of systemic vasculitis. **Current Opinion Rheumatology** 8:1-11.

Crepaldi, DV, Faria PMC, Teixeira EA, Ribeiro LP, Costa AAP, Melo DC, Cintra APR, Prado SA, Costa FAA, Drumond, ML, Lopes VE, Moraes, VE (2007). A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 30:81-85.

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

Deplancke B, Gaskins ER (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **American Journal of Clinical Nutrition** Houston 73:1131-1141.

Derting TL, Compton S (2003) Immune response, not immune maintenance, is energetically costly in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). **Physiological and Biochemical Zoology** 76:744-52.

Díaz AO, García AM, Goldemberg AL (2008) Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study **Acta Histochemica Jena** 110:76-85.

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

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

Eaton JW (1991) Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 118:3-4.

Ellis, AE (1999) Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology** 9:291-308.

Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology** 25:827-839.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2016) The State of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. p. 204.

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

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB (2007) O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática **Jornal de Pediatria** 83:192-203.

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

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

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

Genestra M (2007) Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signalling** 19:1807-1819.

Genten F, Terwinghe E, Danguy A (2009) Atlas of fish histology. Enfield: **Science Publications** 224.

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

Glencross BD, Bermudes M (2011) The effect of high water temperatures on the allometric scaling effects of energy and protein starvation losses in juvenile

barramundi, *Lates calcarifer*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part. A** 159:167–174.

Godoy MP (1975) **Peixes do Brasil**: Subordem Charachioidei, Bacia do Rio Mogi Guaçu. Piracicaba: Franciscana p.216.

Green K, Brand MD, Murphy MP (2004) **Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes**. 53:108-110.

Grinde B, Jollès J e Jollès P (1988) Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Biochemistry** 173: 269-273.

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

Gune IEF, Burcea A, Popa GO, Dudu A, Georgescu SE, Balaş M, Dinescu S, Voicu S, Grecu I, Dediu L, Dinischiotu A, Costache M (2018) Effects of starvation and refeeding on growth performance and stress defense mechanisms of stellate sturgeon *Acipenser stellatus* juveniles from aquaculture. **Acta Biochimica Polonica** 66:47–59.

Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar, A (2006) Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circulation Research** 99:924–932.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, p. 543.

Halliwell, B., Gutteridge, J.C.M. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. **Oxford University Press**.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. **Oxford University Press**.

Haynes TE, Li P, Li X, Shimotori K, Sato H (2009) L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant-or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. **Amino Acids** 37:131–142.

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

Holland MC, Lambris JD (2002) The complement system of teleosts. **Fish and Shellfish Immunology** 12, 399–420.

Honorato CA, Cruz C, Carneiro DJ, Machado MRF (2011) Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta contendo silagem de peixe. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo 48:281-288.

Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine** 54:287-293.

Jeevitha K, Priya K, Samanta S, (2014). In: Drug, J. (Ed.), Antioxidant Activity of Fish Protein Hydrolysates from *Sardinella longiceps*. **Development and Research**.

Jenkins RR, Goldfarb A. (1993) Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise** 25:210-212.

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

Jørgensen EH, Martinsen M, Strøm V, Hansen KER, Ravuri CS, Gong N, Jobling, M (2013) Long-term fasting in the anadromous *Arctic charr* is associated with downregulation of metabolic enzyme activity and upregulation of leptin A1 and SOCS expression in the liver. **Journal of Experimental Biology** 216:3222-3230.

Junqueira, LCL, Carneiro J (2005) **Biologia Celular**. 8a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

Karasov WH, Martínez del Río C, Caviedes-Vidal E (2011). Ecological physiology of diet and digestive systems. **Annual Review of Physiology** 73:69-93.

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

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

Kling PG, Olsson PE (2000) The involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 cells. **Free Radical Biology and Medicine** 28:1628-1637.

Kum C, Sekkin S (2011) **The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs** – In: Recent Advances in Fish Farms (Eds) F. Aral, Z. Dou, InTech, 169-216.

Larsson T, Koppang EO, Espe M, Terjesen BF, Krasnov A, Moreno HM, Rørvik K, Thomassen M, Mørkøre T (2014) Fillet quality and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet supplemented with glutamate. **Aquaculture** 426–427:5288–295.

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

Li X, Rezaei R, Li P, Wu G (2011) Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. **Amino Acids** 40:1159–1168.

Lin M, Zhang B, Yu C, Li J, Zhang L, Sun H, Gao F, Zhou G (2014) L-Glutamate supplementation improves small intestinal architecture and enhances the expressions of jejunal mucosa amino acid receptors and transporters in weaning piglets. **Plos One** 9:1-8.

Lushchak V (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology** 101:13–30.

Magnadottir B (2006) Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology** 20:137-151.

Magnadottir B, Audunsdottir SS, Bragason BTH, Gisladoitiit B, Jonsson Z, Gudmundsdottir S (2011). The acute phase response of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Humoral and cellular responses. **Fish and Shellfish Immunology** 30: 1124-1130.

Magwere T (2006) The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. **Mechanisms of Ageing and Development** 127:356–370.

Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology** 153:83-104.

Mayes PA (1990) Biologic oxydation. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds) Harper's Biochemistry. Appleton & Lange, Beirut, pp 105–111.

McCue MD (2012) **Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation** Springer-Verlag, 421p.

Miller KM, Schulze AD, Ginther N, Li S, Patterson DA, Farrell AP, Hinch SG (2009) Salmon spawning migration: metabolic shifts and environmental triggers. **Comparative Biochemistry and Physiology D Genomics Proteomics** 4:75–89.

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

Murray, CK, Fletcher, TC (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology** 9:329-334.

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

Nelson DL, Cox MM (2014) **Princípios de bioquímica de Lehninger**, Porto Alegre: Artemed, 1328 p.

Oliveira MC, Schoffen JPF (2010) Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53:1333-1342 2010.

Osawa T (1995) Antioxidantes Vegetais: Papel Protetor Contra Espécies Ativas de Oxigênio. **Cosmetics & Toiletries** 7:38-50.

Palm NW, Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity **Immunology Review** 227:221–33.

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

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

Polakof S, Panserat S, Soengas J, Moon T (2012). Glucose metabolism in fish: A review. **Journal of Comparative Physiology** 182, 152–159.

Rauta PR, Nayak B, Das S (2012) Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology Letters** 148:23-33.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F (2000) Intestinal glutamate metabolism. **Journal of Nutrition** 130:978.

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

Rezaei R, Knabe DA, Tekwe CD, Dahanayaka S, Ficken MD, Fielder SE, Eide SJ, Lovering SL, Wu G. (2013) Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs. **Amino Acids** 44:911–923.

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

Robinson MK, Rustum RR, Chambers EA, Rounds JD, Wilmore DW, Jacobs DO (1997) Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. **Journal of Surgical Research** 69:325–330.

Rombout JHWM, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V (2011) Teleost intestinal immunology. **Fish and Shellfish Immunology** 31:616-626.

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

Rover Jr L, Hoehr NF, Vellasco AP (2001) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova** 24:112-9.

Rueda FM, Martinez FJ, Zamora S, Kenturi IM, Divanach P (1998) Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture Research** 29:447-452.

Sakai DK (1992) Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Disease** 2:223–247.

Salin K, Villasevil EM, Anderson GJ, Auer SK, Selman C, Hartley RC, Mullen W, Chinopoulos C, Metcalfe NB (2018) Decreased mitochondrial metabolic requirements in fasting animals carry an oxidative cost. **Functional Ecology** 32:2149–2157.

Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research** 39:223–239.

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

Schull Q, Viblanc VA, Stier A, Saadaoui H, Lefol Criscuolo F, Bize P, Robin JP (2016) The oxidative debt of fasting: evidence for short- to medium-term costs of advanced fasting in adult king penguins. **Journal of Experimental Biology** 219:3284-3293.

Secombes CJ (1996) **The nonspecific immune system: cellular defences**. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press 63-103.

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

Sies H (1993) Strategies of antioxidant defence. **Review European Journal of Biochemistry** 215:213-219.

Sies H (1997) Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiology** 82:291-295.

Shan X, Aw TY, Jones DP (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics** 47:61-71.

Sheridan MA, Mommsen, TP (1991) Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **General and Comparative Endocrinology** 8:1473-483.

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

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

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

Staples JF (2016) Metabolic flexibility: hibernation, torpor, and estivation. **Comprehensive Physiology** 6:737-771.

Starck JM (1999b) Structural flexibility of the gastro-intestinal tract of vertebrates-Implications for evolutionary morphology. **Zoologischer Anzeiger** 238:87-101.

Stegeman JJ, Brouwer M, Di Giulio RT, Forlin L, Fowler BA, Sanders BM, Van Veld PA (1992) Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget RJ, Kimerle RA, Mehrle JRPM.; Bergman HL. **Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, Lewis Publishers, 347 p.

Storey KB (2004) Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. 594 p.

Stroband HWJ, Van Der Veen FH (1981) Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (VAL.). **Journal of Experimental Zoology, New York** 218:149-56.

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

Takahashi LS, Ha N, Pereira MM, Biller-Takahashi JD, Urbinati EC (2018) Carbohydrate tolerance in the fruit-eating fish *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture Research** 49:1182-1188.

Tocher DR (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science** 11:107-184.

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

Tort L, Balasch JC, Mackenzie S (2003) Fish Immune System. A Crossroads between Innate and Adaptive Responses. **Immunology** 22:277-286.

Turano MJ, Borski RJ, Daniels HV (2008) 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** 39:1514-1523.

Urbinati EC, Biller-Takahashi JD, Zanuzzo FS (2020) Stress and immune system in fish, in *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, Baldisserotto, B, Urbinati EC, Cyrino JEP (Eds), **Elsevier, Academic Press**, p. 93-114, 2020.

Urbinati EC, Carneiro PCF (2004) **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. In: CYRINO, J.E.P. et al. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 171-194.

Urbinati EC, Goncalves FD, Takahashi LS (2013) Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisserotto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2ª edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, capítulo 8, p.1-606.

Urbinati EC, Sarmiento S J, Takahashi LS (2014). Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Aquaculture** 433:430–433.

Uribe C, Folch H, Enriquez R. Moran G (2011) Innate and Adaptive Immunity in Teleost Fish: A Review. **Veterinarni Medicina** 56:486-503.

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2018) South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture** 10:351-369.

Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 13:57-149.

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

Vasylyuk OY, Kubrak OI, Storey KB, Lushchak VI (2011) Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 101:1-5.

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

Winston GW Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology** 19:137-161.

Won ET, Borski RJ (2013) Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Frontiers in Endocrinology** 4:1-13.

Xiao JX, Zhou F, Yin N, Zhou J, Gao S, Li H, Shao QJ, Xu J (2013) Compensatory growth of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* with cyclical feed deprivation and refeeding. **Aquaculture Research** 44:1045-1057.

Yang HY, Lee TH (2015) Antioxidant enzymes as redox based biomarkers: a brief review. **BMB Reports** 48:200–208.

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

Yarmohammadi M, Shabani A, Pourkazemi M, Soltanloo H, Imanpour MR (2012) Effect of starvation and refeeding on growth performance and content of plasma lipids, glucose and insulin in cultured juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). **Journal of Applied Ichthyology** 28:692-696.

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

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

CAPÍTULO 2

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

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

RESUMO Este trabalho está dividido em três ensaios que avaliaram o efeito de diferentes estratégias alimentares (C e CS – alimentação contínua controle e glutamato (L-GLU); 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação de 2 dias e restrição de 1 dia – controle e L-GLU; R15 – restrição de 15 dias; R30C e R30S – restrição de 30 dias; R30/8C e R30/8S – restrição de 30 dias e 8 dias de realimentação controle e L-GLU), efeito do L-GLU por 15 dias e efeito de diferentes ciclos de restrição e realimentação e do L-GLU. O objetivo do estudo foi investigar como a restrição alimentar, por ciclos curto e longo, e a suplementação com L-GLU afetam os sistemas metabólico, imune e antioxidante, e o desempenho em juvenis de pacu. Foram avaliados indicadores do metabolismo energético no sangue (glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol) e teciduais (glicogênio hepático, lipídio hepático e muscular); índices corporais (índice gordura visceral somática (IGVS), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenessomático (IES); imunidade (atividade respiratória de leucócitos (ARL) e lisozima sérica (LIS); sistema antioxidante hepático e intestinal (SOD - superóxido dismutase, CAT – catalase, GST - glutathione S-transferase e GSH - glutathione reduzida; histologia do intestino (infiltração leucocitária (ILI), altura total de vilos e células caliciformes) e desempenho zootécnico (peso final, consumo relativo de dieta e conversão alimentar). A ARL foi maior entre as estratégias e dietas aos 30 dias e diminuiu após realimentação. A atividade antioxidante hepática foi menor na estratégia 2C/R1 para SOD aos 15 dias, enquanto que a CAT foi maior em 2C/R1. No intestino, a SOD foi menor na estratégia 2C/R1 e a maior na GSH. Quanto ao IHS, o menor valor foi encontrado na estratégia R15 e maior após realimentação. Houve maior ILI na estratégia 2C/R1 e R15. Houve perda de peso aos 15 dias e ganho compensatório após realimentação aos 38 dias. Houve redução da glicemia e triglicerídeos aos 30 dias de jejum, e recuperação após realimentação. O colesterol aumentou aos 30 dias de jejum (C e S) e diminuiu após realimentação. O glicogênio hepático diminuiu aos 30 dias na estratégia R30 (C e S) com recuperação após realimentação. O lipídio hepático aumentou na estratégia R30/8C, após realimentação, e o lipídio muscular foi elevado aos 30 dias na estratégia 30 (C e S) e diminuição aos 38 dias. No fígado, a CAT diminuiu R30 (C e S) e aumentou após realimentação. A GST diminuiu aos 38 dias nos grupos 2C/R1 e R30/8S, e a GSH aumentou em ambos os grupos (R30/8C e R30/8S) aos 38 dias. No intestino, houve diminuição aos 38 dias na estratégia R30/8S, e redução da CAT nas estratégias de restrição com L-Glu. A GSH foi maior no grupo R30/8C. Houve redução do IGVS aos 38 dias no grupo R30/8C e R30/8R. A altura total dos vilos aumentaram nas estratégias 2/1 (C e S) e R30C, aos 30 dias, e diminuiu aos 38 dias. Nas células caliciformes houve redução aos 38 dias na estratégia R30 (C e S), e aos 38 dias na estratégia 30/8 (C e S). No geral, os resultados sugerem que houve mobilização de energia durante as estratégias testadas e os sistemas imune e antioxidante se ajustaram às mudanças metabólicas, além de não haver prejuízo para o crescimento dos peixes.

Palavras-chave: crescimento, estresse oxidativo, imunidade, restrição nutricional, metabolismo energético

EFFECTS OF FOOD RESTRICTION ON METABOLIC, IMMUNOLOGICAL AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN PACU *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT This work is divided in three trials that evaluated the effect of different dietary strategies (C and CS - continuous feeding control and glutamate (L-GLU); 2C/R1 and 2S/R1 - 2 days feeding and 1 day restriction - control and L-GLU; R15 - 15 day restriction; R30C and R30S - 30 day restriction; R30/8C and R30/8S - 30 day restriction and 8 days of refeeding control and L-GLU), effect of L-GLU for 15 days and effect of different restriction and refeeding cycles and L-GLU. The aim of the study was to investigate how food restriction, for short and long-term cycles, and L-GLU supplementation affect the metabolic, immune and antioxidant systems, and performance in pacu juveniles. Blood energy metabolism (glucose, triglycerides, cholesterol and glycerol) and tissue indicators (liver glycogen, liver and muscle lipid) were evaluated; body indices (somatic-visceral fat index (SVFI), hepatosomatic index (HSI) and spleenosomatic index (SSI); immunity (respiratory activity leukocyte (RAL) and serum lysozyme (LYS); hepatic and intestinal antioxidant system (SOD - superoxide dismutase, CAT - catalase, GST- glutathione S-transferase and GSH - reduced glutathione; histology of the intestine (leukocyte infiltration (LI), total height of villi and goblet cells) and zootechnical performance (final weight, relative diet consumption and feed conversion). RAL was higher among strategies and diets at 30 days and decreased after refeeding. The hepatic antioxidant activity was lower in the 2C/R1 strategy for SOD at 15 days, while the CAT was greater in 2C/R1. In the intestine, SOD was lower in the 2C/R1 strategy and the highest in GSH. As for the HSI, the lowest value was found in the R15 strategy and the highest after refeeding. There was a higher LI in strategy 2C/R1 and R15. There was weight loss at 15 days and compensatory growth after refeeding at 38 days. There was a reduction in blood glucose and triglycerides after 30 days of fasting, and recovery after refeeding. Cholesterol increased after 30 days of fasting (C and S) and decreased after refeeding. Hepatic glycogen decreased at 30 days in the R30 strategy (C and S) with recovery after refeeding. The hepatic lipid increased in the R30/8C strategy, after refeeding, and the muscle lipid was increased at 30 days in strategy 30 (C and S) and decreased at 38 days. In the liver, CAT decreased R30 (C and S) and increased after refeeding. GST decreased at 38 days in groups 2C/R1 and R30/8S, and GSH increased in both groups (R30/8C and R30/8S) at 38 days. In the intestine, there was a decrease at 38 days in the R30/8S strategy, and a reduction in CAT in the restriction strategies with L-Glu. GSH was higher in the R30/8C group. There was a reduction in SVFI at 38 days in the R30/8C and R30/8S group. The total height of the villi increased in the 2/1 (C and S) and R30C strategies, at 30 days, and decreased at 38 days. In goblet cells there were a reduction at 38 days in strategy R30 (C and S), and at 38 days in strategy 30/8 (C and S). Overall, the results suggest that there was mobilization of energy during the tested strategies and the immune and antioxidant systems adjusted to metabolic changes, in addition to there being no impairment to fish growth.

Keywords: growth, oxidative stress, immunity, nutritional restriction, energy metabolism

1. Introdução

Os peixes podem sobreviver a longos períodos sem alimento e, para muitas espécies, o jejum faz parte do ciclo de vida natural. Assim, algumas espécies são bem adaptadas para mobilizar suas reservas metabólicas para sobreviver a privação alimentar e recuperá-las quando o alimento se torna novamente disponível (Navarro e Gutiérrez, 1995; Urbinati et al., 2014).

Efeitos do jejum no metabolismo dependem de múltiplas variáveis, incluindo a espécie. No caso do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), modelo de nosso estudo, a espécie responde bem ao manejo alimentar que inclui restrição e realimentação (Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2010; Gimbo et al., 2015; Favero et al., 2018). A aplicação destas estratégias alimentares vem sendo pesquisada em diferentes espécies de peixes como ferramenta importante na aquicultura (Souza et al., 2003, Reigh et al., 2006). Como resposta à ausência ou restrição de alimentos, os peixes usam reservas energéticas e podem apresentar crescimento compensatório quando a realimentação é retomada (Ali et al., 2003; Takahashi et al., 2010, Urbinati et al., 2014). Além das alterações bioquímicas e metabólicas induzidas durante a restrição alimentar em peixes (Guderley et al., 2003; Secor e Carey, 2016), alterações em sistemas biológicos com alta demanda energética podem ocorrer, tais como em parâmetros hematológicos, imunológicos, e no mecanismo de defesa do sistema antioxidante (Pascual et al., 2003, Bayir et al., 2011). Entretanto, os dados disponíveis na literatura são ainda escassos e conflitantes. Diferentes tempos de jejum e realimentação promoveram ativação ou redução de indicadores do sistema imune inato em robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Pagellus bogaraveo*) (Caruso et al., 2011) e em *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2014) sugerindo que as respostas indicam ajuste do metabolismo. Em pacu, Gimbo et al. (2015) relataram que mesmo em balanço energético negativo, após 30 dias de jejum, os peixes foram capazes de acionar respostas imunes inatas após uma infecção bacteriana experimental.

Considerando que durante períodos de privação alimentar e realimentação, a dinâmica metabólica se altera, as reações de oxirredução na cadeia fosforilativa mitocondrial, durante a respiração celular, que resultam na formação de diferentes radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Schieber et al., 2014) podem ser

produzidas em maior quantidade e o sistema antioxidante que atua para garantir proteção contra o estresse oxidativo (Yang et al., 2019) pode ser desequilibrado. Na literatura, a associação da restrição alimentar com estresse oxidativo em peixes ainda é pouco investigada. Os estudos disponíveis mostram diferenças nas respostas do sistema antioxidante ao jejum, mas eles diferem em relação à estratégia experimental, à extensão do período de jejum e realimentação e a espécie e, tanto ativação quanto redução da atividade das enzimas antioxidantes foram descritas (Bayir et al., 2011; Rossi et al., 2015; Varju et al., 2018; Yang et al., 2019).

A restrição alimentar, por sua vez, causa mudanças morfológicas e funcionais na mucosa intestinal, estrutura com funções fisiológicas importantes que vão desde a digestão de alimentos à absorção de nutrientes (Caballero et al., 2003), proteção às vilosidades (Dimitroglou et al., 2010) e integridade de células caliciformes (Zeng et al., 2012), além de importante papel imunológico na defesa contra agressões do meio externo (Guarner, 2006; Picchietti et al., 2007).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi investigar se a restrição alimentar e a suplementação dietética com o L-glutamato afetam os sistemas antioxidante, imune, metabólico e desempenho produtivo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e delineamento experimental

O procedimento experimental desta pesquisa 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 014881/17) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal – SP.

Um total de 288 juvenis de pacu ($91,4 \pm 14,7$ g), fornecido pelo Centro de Aquicultura da UNESP, foi distribuído aleatoriamente em 24 unidades experimentais (caixas de fibrocimento), com capacidade de 150 L, com 12 peixes por unidade, em sistema com fluxo de água constante e aeração suplementar. Os peixes foram aclimatados durante duas semanas, sendo alimentados com dieta comercial granulada (35% de PB e 4.100 kcal EB/kg) até saciedade aparente.

A temperatura da água ($28,55 \pm 0,72^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($6,59 \pm 0,97$ mg/L), potencial hidrogeniônico da água ($7,75 \pm 0,15$) e amônia total ($0,10 \pm 0,05$ mg/L) foram avaliados uma vez na semana, ao longo de todo o experimento. O fotoperíodo foi de 12 horas claro: 12 horas escuro.

O experimento foi dividido em três ensaios distintos, como explicado a seguir:

Ensaio 1: Efeito de diferentes estratégias alimentares, aplicadas por 15 dias, nas respostas metabólicas, imunes, antioxidantes e de crescimento.

- C: Peixes alimentados diariamente com ração comercial (controle C), durante 15 dias
- 2C/R1: Alimentação com ração comercial por 2 dias / restrição de 1 dia, durante 15 dias
- R15: Restrição alimentar de 15 dias

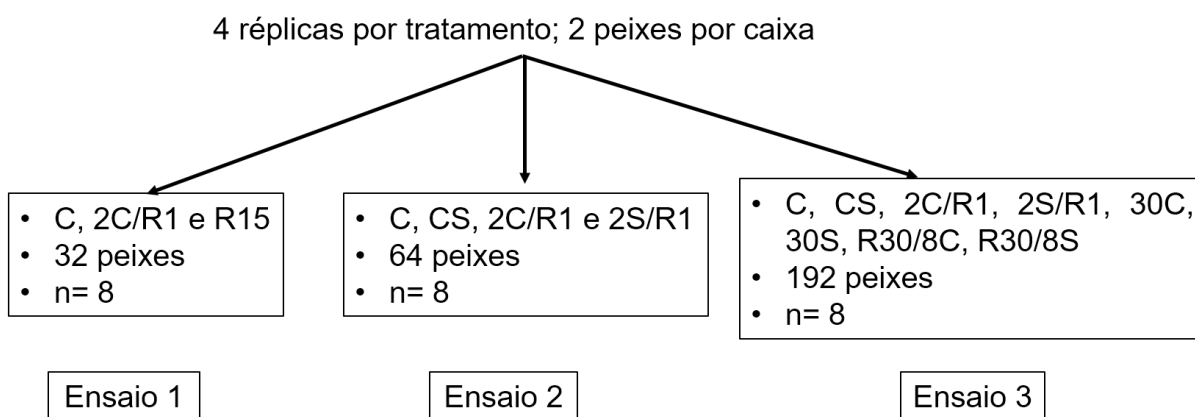
Ensaio 2: Efeito da suplementação dietária com L-GLUT em respostas fisiológicas em pacus submetidos a diferentes estratégias alimentares por 15 dias.

- C: Peixes alimentados diariamente com ração comercial (controle C), durante 15 dias
- CS: Peixes alimentados com ração comercial suplementada com ácido L-glutâmico (L-GLU) (8g/kg ração), diariamente (controle suplementado CS), durante 15 dias
- 2C/R1: Alimentação com ração comercial por 2 dias / restrição de 1 dia, durante 15 dias
- 2S/R1: Alimentação com ração comercial + L-GLU, por 2 dias / restrição de 1 dia, durante 15 dias

Ensaio 3: Efeito de diferentes ciclos de restrição alimentar e realimentação e da suplementação dietária com L-GLU em respostas fisiológicas por 30 e 8 dias de realimentação.

- C: Peixes alimentados diariamente com ração comercial (controle C), durante 30 dias
- CS: Peixes alimentados com ração comercial suplementada com ácido L-glutâmico (L-GLU) (8g/kg ração), diariamente (controle suplementado CS), durante 30 dias
- 2C/R1: Alimentação com ração comercial por 2 dias / restrição de 1 dia, durante 30 dias
- 2S/R1: Alimentação com ração comercial + L-GLU, por 2 dias / restrição de 1 dia, durante 30 dias
- 30C: Restrição alimentar de 30 dias; R30/8C: realimentação de 8 dias (ração comercial)
- 30S: Restrição alimentar de 30 dias; R30/8S: realimentação de 8 dias (ração comercial + L-GLU)

Esquema experimental



No ensaio 1, os animais foram amostrados aos 15 dias, no ensaio 2 aos 30 dias, e, por último, no ensaio 3 aos 38 dias (após 8 dias de realimentação).

2.2. Preparo da ração

A dieta experimental foi produzida no Centro de Aquicultura da Unesp, a partir de uma ração comercial moída contendo 35% de PB e 4.100 kcal EB/kg, que foi triturada em partículas menores que 0,8 mm, e misturada com ácido L-glutâmico (Sigma-Aldrich, código G1251) na proporção de 8 g/kg. A escolha da concentração utilizada baseou-se em Faria (2017). A mistura foi homogeneizada em misturador manual, umedecida e submetida ao processo de granulação, utilizando uma máquina moedora de carne. Uma ração controle passou pelo mesmo processo, sem adição do ácido glutâmico. Após secagem, as rações foram armazenadas a -20°C até a utilização.

2.3. Amostragem

Dois peixes de cada unidade experimental, de cada tratamento (n=8) foram anestesiados com benzocaína (30 mg/L, Sigma-Aldrich, código E1501) para retirada do sangue por punção dos vasos caudais e posteriormente os animais foram pesados. As alíquotas de sangue foram adicionadas em microtubos com anticoagulante (Glistab, Labtest, código 29, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) para obtenção de plasma para análise de cortisol e glicose. Em microtubos contendo heparina sódica (Hepamax-S®, Blau Farmacêutica S.A.) o sangue total foi separado para análise da atividade respiratória de leucócitos.

O sangue total sem anticoagulante, em tubos de vidro, foi mantido em repouso, em ambiente refrigerado por três horas e posteriormente as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 1623 g) para separação de soro análise de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento. Após a retirada do sangue, os animais foram eutanasiados por seccionamento medular para remoção de fragmentos de intestino anterior (histologia e atividade do sistema antioxidante); fígado (lipídio total e atividade do sistema antioxidante); músculo branco (lipídio total e glicogênio) e gordura visceral (índice de gordura víscerosomático). Cada órgão foi pesado e armazenado a -80° C até a análise.

2.4. Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais

A concentração de glicose foi mensurada através de kit comercial Labtest® – Glicose Liquiform, Ref. 133-2/500, Minas Gerais, Brasil), método enzimático que consiste na catálise da oxidação da glicose por meio da glicose oxidase, gerando peróxido de hidrogênio, resultando em uma coloração vermelha. A densidade óptica da análise foi determinada em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, em 505 nm. A concentração é dada em mg/dL.

As amostras do soro foram centrifugadas a 2885 g por 10 min, a 4°C, e em seguida armazenadas em microtubos, a -20°C para posterior análise.

Uma alíquota do soro foi utilizada para análise da concentração de colesterol, por método enzimático (Labtest® – Colesterol Liquiform, Ref.76, Minas Gerais, Brasil). Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado e na presença de peroxidase o peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol contido na amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro da Thermo Scientific Genesys 10S UV – Vis, em 500 nm. A concentração é dada em mg/dL.

Outra alíquota do soro foi utilizada para análise da concentração de triglicerídeos por método enzimático (Labtest® – Triglicérides Liquiform, Ref.87, Minas Gerais, Brasil). A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, aminoantipirina e clorofenol, catalisada pela peroxidase. A intensidade da cor vermelha produzida na reação é proporcional à quantidade de triglicerídeos na amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro da Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, em comprimento de onda de 505nm. A concentração é dada em mg/dL.

Outra alíquota de soro foi utilizada para determinar a concentração de glicerol (Bioclin/Quibasa - Glicerol, Ref. K117, Belo Horizonte, Brasil). O método é realizado por teste enzimático colorimétrico, no qual, na presença de peroxidase, de um

aceptor de oxigênio e da 4-aminoantipirina, são formados a água e um composto colorido, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicerol. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Epoch™ Biotek) em 500 nm. A concentração é dada em mg/dL.

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

Os teores de lipídios totais de fígado e músculo foram determinados com base no método de Frings et al. (1972). Os tecidos foram extraídos por homogeneização no Turrax MA 102/B, com uma solução de clorofórmio-metanol-água (2: 1: 0,5). O homogenato foi centrifugado a 180 g por 5 min, e três fases foram identificadas pela técnica da dupla pipeta. As amostras de lipídios foram retiradas e armazenadas em outro tubo, repetindo o processo por três vezes, acrescentando 1 mL de clorofórmio a cada repetição. Os tubos foram mantidos em estufa a 60°C, para secagem do solvente. O resíduo lipídico seco, extraído dos tecidos de fígado e músculo, foi ressuspendido com 1 mL de clorofórmio, retirando 100 µL dessa mistura e foram solubilizadas com 200 µL de ácido sulfúrico concentrado, a 100°C, por 10 min. Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL do reagente de fosfovanilina (vanilina 0,6%, ácido sulfúrico concentrado e água destilada, na proporção de 7:12:1 (v/v/v) e os tubos foram mantidos em banho a 37°C, por 15 min. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV -Vis a 540 nm. A concentração de lipídios totais nos tecidos foi calculada a partir da curva padrão de

ésteres metílicos de óleo de fígado de bacalhau (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e foi expressa em mg/g.

2.5. Indicadores imunológicos

O sangue total contendo heparina foi utilizado para a análise da atividade respiratória de leucócitos (ARL) seguindo o método de Anderson e Siwicki (1995), modificado para o pacu (Biller-Takahashi et al., 2013). O método colorimétrico determina a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o “burst” oxidativo, pela redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT), formando precipitados de material insolúvel, de coloração azul escuro no interior do fagócito (grânulos de formazan) (Klein, 1990). O método foi determinado em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV -Vis, em 540nm. A atividade é dada em absorbância (DO).

Uma alíquota de sangue, sem anticoagulante, foi mantida a temperatura ambiente por quatro horas para separação do soro, e posteriormente centrifugada durante 10 min a 2885 g à 4 °C (centrífuga ALC International, modelo PK121 R). O método para analisar a lisozima segue os princípios de Demers e Bayne (1997), modificado por Zanuzzo et al. (2015), e se baseia na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*, com leitura em 450 nm, a cada cinco minutos, durante dez minutos, em um leitor de microplacas ThermoPlate Reader MN. A concentração é dada por ng/μL.

2.6. Indicadores do sistema antioxidante hepático e intestinal

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com McCord e Fridovich (1969). A SOD presente nas amostras inibe a redução do citocromo C (Sigma-Aldrich, Ref. C2037, St Louis, MO, USA), proveniente do radical superóxido oriundo do sistema xantina/xantina oxidase. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Thermo Plate Reader MN, em 550 nm, e temperatura ambiente. A atividade da SOD é expressa em U de SOD mg de proteína⁻¹, na qual uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que promove inibição de 50% da taxa de redução do citocromo C.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com Beutler (1975), com base no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela catalase, gerando água e oxigênio. A decomposição do H_2O_2 pela CAT é monitorada pelo decaimento da absorbância ao longo do tempo em um espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis), em 240 nm, a cada 15 segundos, por 5 minutos, e expressa em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}$ de proteína⁻¹.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com Keen et al. (1976). O substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reduz a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione-2,4-nitrobenzeno. A leitura da GST foi feita em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan Ascent 354), em 340 nm. A atividade da GST é expressa em nmol de CNDB mg de proteína⁻¹.

A concentração de glutathione reduzida (GSH) foi determinada pelo método de Beutler et al. (1963), usando o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB 2,5 mM – Reagente de Ellman (Sigma-Aldrich, Ref. D21820-5G, St Louis, MO, USA). A reação da GSH com DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela, mensurado pela absorbância em 405 nm, em um leitor de microplacas (Thermo Plate Reader MN). A concentração é dada em μg de GSH mg de proteína⁻¹.

A concentração de proteína tecidual foi determinada pelo método de Bradford (1976), que consiste na associação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Ref. 27815, St Louis, MO, USA) à proteína, utilizando albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Ref. 4919-5G, St Louis, MO, USA) como padrão. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Epoch™ Biotek) em 595 nm. A concentração é dada em mg mL⁻¹.

2.7. Indicadores morfométricos

A gordura visceral, o fígado e o baço foram pesados para cálculo dos índices de gordura víscerosomático, hepatossomático e esplenossomático [(peso do órgão / peso corporal)*100, respectivamente].

2.8. Análise histológica

Fragmentos do intestino anterior foram abertos longitudinalmente, presos em papel cartonado, lavados com solução salina 0,6% e fixados em formalina

tamponada 10% (pH 7,2) durante 24 horas e, em seguida, conservados em álcool 70%. Em cada lâmina, foram fotografados cinco campos com o auxílio de câmera fotográfica digital (Leica DFC 24 295) 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 análise do infiltrado leucocitário e vilosidades foram selecionadas três fotomicrografias por lâmina por meio de tabela de randomização. Foram determinadas a altura de cinco vilosidades conforme Mello et al. (2013). Para contagem das células caliciformes e infiltrado leucocitário foram elaborados cinco quadrantes de 50 x 50 μm , compostos por linhas pontilhadas e contínuas, sobreposto a cada uma das fotos para aleatorizar o campo de contagem (Gundersen et al., 1977). Para análise do infiltrado, foi padronizada uma distância de 100 enterócitos por área do quadrante. Ambas as contagens, células caliciformes e infiltrado leucocitário, foram feitas a partir da média dos números de células das amostragens (Ferguson et al., 2010). Para determinar altura das vilosidades e contagem do infiltrado leucocitário as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). E as lâminas para contagem de células caliciformes foram confeccionadas e coradas com Hematoxilina, Eosina e PAS – Alcian Blue.

2.9. Desempenho zootécnico

O cálculo de peso final foi obtido pela pesagem dos animais ao final de cada amostragem. Para cálculo do consumo relativo de alimentos, foi registrada a quantidade de ração que os animais consumiam ao longo de cada amostragem. Por fim, o cálculo da conversão alimentar foi avaliado por: $CA = \text{consumo de alimentos} / \text{peso final}$.

2.10. Análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) para os três ensaios. No ensaio um foi realizada uma análise simples – Oneway, correspondendo a uma dieta (controle) e três estratégias alimentares (alimentação diária, ciclo curto de restrição alimentar e ciclo de restrição longo) por quinze dias. No ensaio dois foi realizada em análise composta 2x2 – TwoWay,

sendo duas dietas (controle e 8 g de L-Glutâmico/kg de ração) e duas estratégias alimentares (alimentação diária e ciclo curto de restrição alimentar) por quinze dias. O ensaio três foi analisado em esquema fatorial 2x3x2 correspondendo a duas dietas (controle e 8 g de L-Glutâmico/kg de ração) x três estratégias alimentares (alimentação diária, ciclo curto de restrição alimentar e ciclo longo de restrição alimentar com oito dias de realimentação) x dois tempos de coleta (30 dias e 38 dias). Os dados foram submetidos a testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe). Quando necessário, os dados foram transformados para atender as premissas, e então submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas pelo software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc) versão 9.0. Os gráficos foram elaborados pelo programa de software *GraphPad Prism 5*.

3. Resultados

3.1. Ensaio 1. Efeito de diferentes estratégias alimentares, aplicadas por 15 dias, nas respostas metabólicas, imunes, antioxidantes e de crescimento.

3.1.1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol

Aos 15 dias, as concentrações plasmáticas de glicose (Figura 2A) dos peixes em restrição contínua foram mais baixas que dos peixes das outras estratégias (C e 2C/R1) ($F=7,40$, $p=0,003$).

As concentrações de triglicerídeos (Figura 2B) diminuíram ($F=14,07$, $p=0,002$) nos peixes 2C/R1 e restritos por 15 dias, em relação ao grupo C, sendo os valores mais baixos observados nos peixes em restrição alimentar contínua ($F=16,8$, $p=0,001$).

Em relação ao colesterol sérico (Figura 2C) e a concentração de glicerol (Figura 2D), não observamos diferença entre as estratégias alimentares ($p > 0,05$).

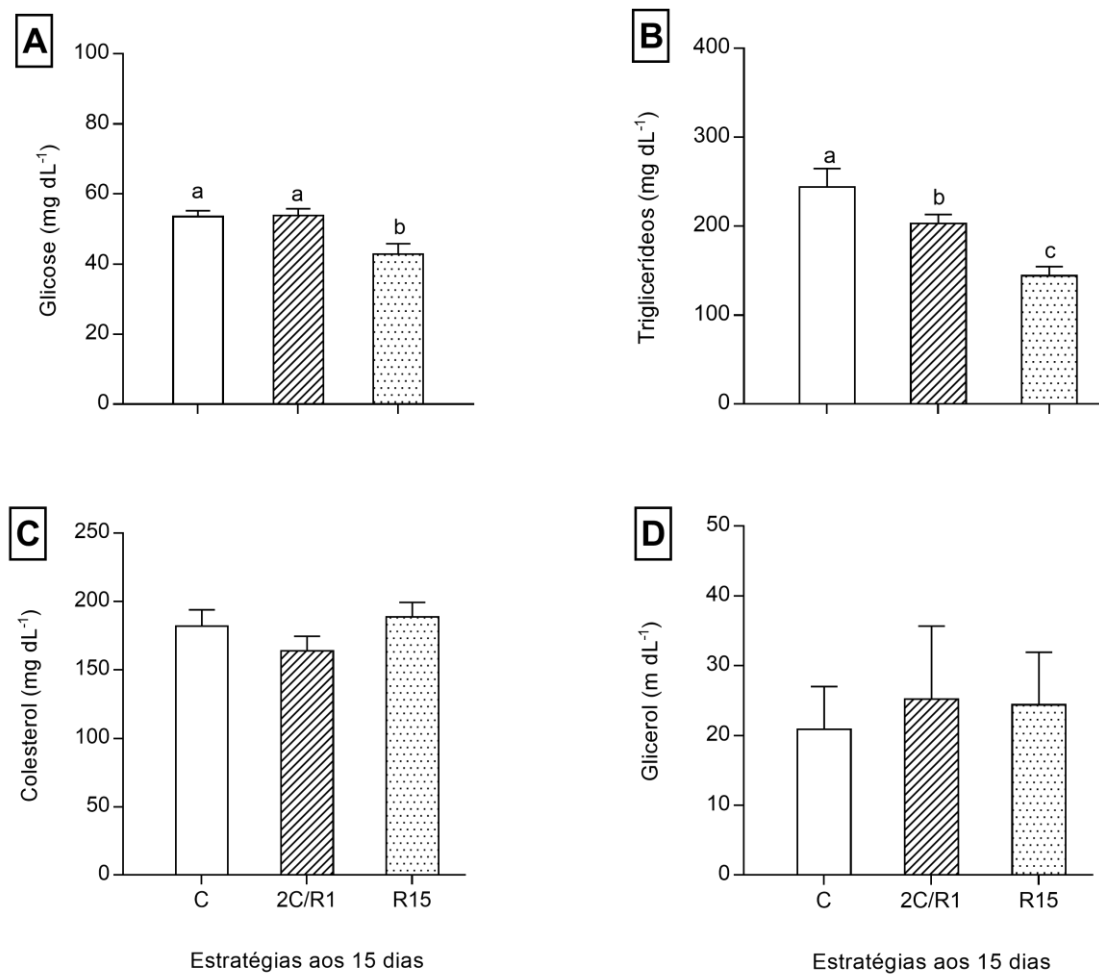


Figura 2. (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL⁻¹); (C) colesterol (mg dL⁻¹) e (D) glicerol (mg dL⁻¹) em pacus submetidos a diferentes estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão

3.1.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular

Aos 15 dias, a concentração de glicogênio hepático (Figura 3A) dos peixes da estratégia 2C/R1 aumentou e a dos peixes sob restrição contínua (R15) diminuiu em relação aos peixes da estratégia C.

Já as concentrações de lipídio hepático (Figura 3B) e de lipídio muscular (Figura 3C) em 2C/R1 e R15 não se alteraram em relação aos peixes controle, aos 15 dias de observação ($p > 0,05$).

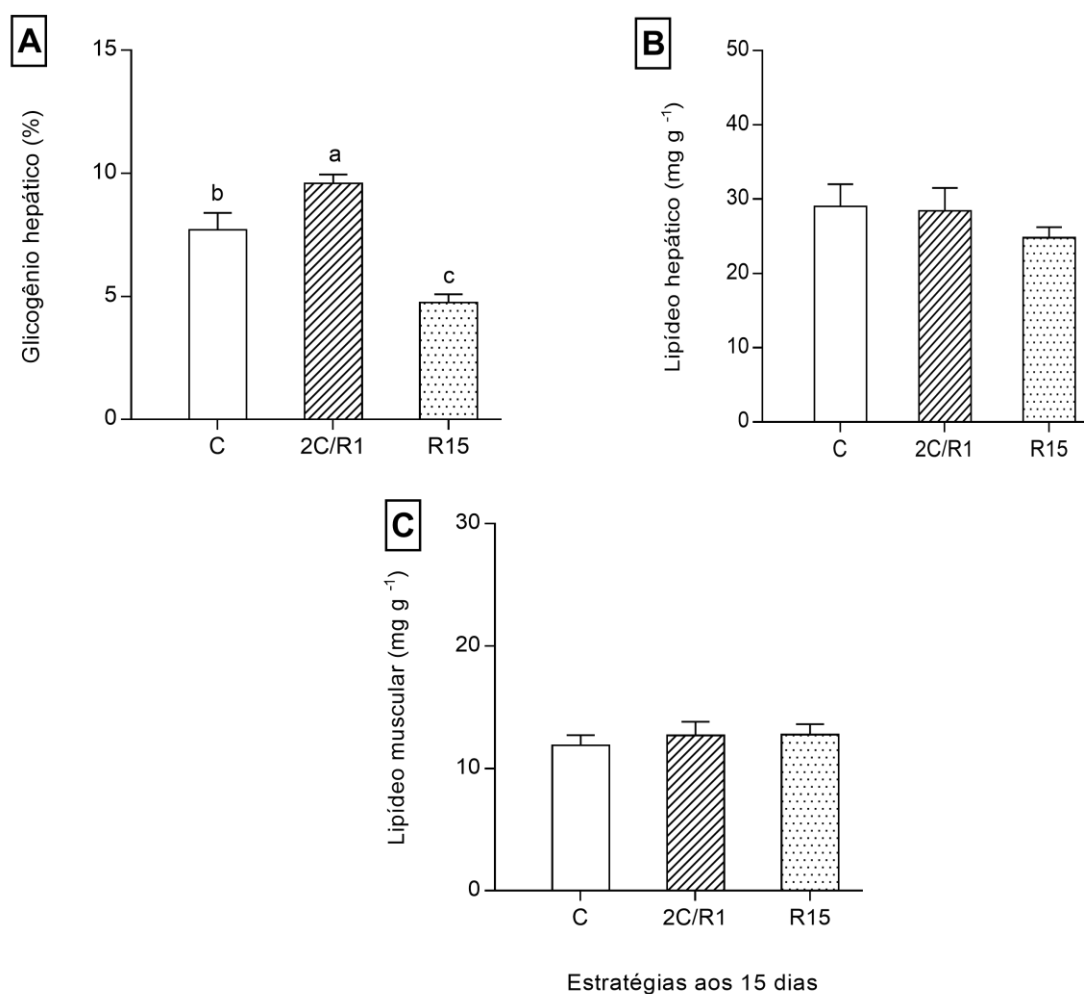


Figura 3. (A) Concentrações de glicogênio (%), (B) lipídio hepático (mg g⁻¹) e (C) lipídio muscular (mg g⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

3.1.3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima

Observamos uma redução gradual da atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Figura 4A) entre as estratégias, sendo a menor nos peixes R15, e de valor intermediário na estratégia 2C/R1, em relação aos peixes controle (F= 6,46, p= 0,01).

As concentrações séricas de lisozima (Figura 4B) não diferiram entre as estratégias analisadas aos 15 dias de observação (p>0,05).

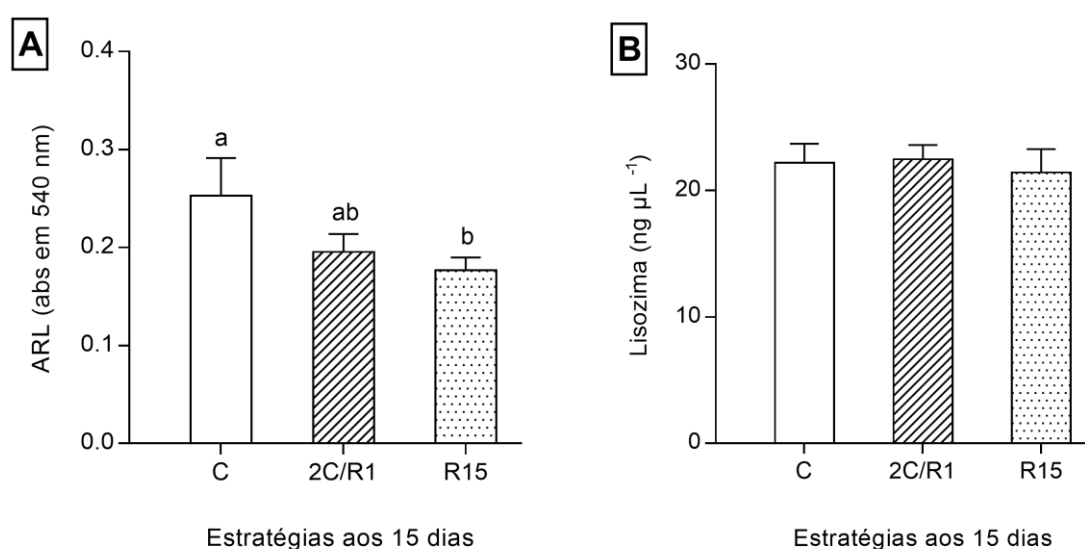


Figura 4. (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540nm) e (B) concentrações séricas de lisozima (ng µL⁻¹) (B) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão.

3.1.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado

A atividade hepática da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 5A) foi a menor na estratégia 2C/R1 (F=4,52, p= 0,02), aos 15 dias, enquanto a atividade da catalase (CAT) (Figura 5B) teve comportamento contrário, com valor mais elevado nos peixes 2C/R1, diferindo dos peixes sob restrição contínua por 15 dias (F= 3,30, p= 0,05).

A atividade hepática da glutathiona S-transferase (GST) (Figura 5C) teve comportamento semelhante ao observado na CAT, mas sem significância. Já, a concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) (Figura 5D) não diferiram entre as estratégias, aos 15 dias de observação ($p>0,05$).

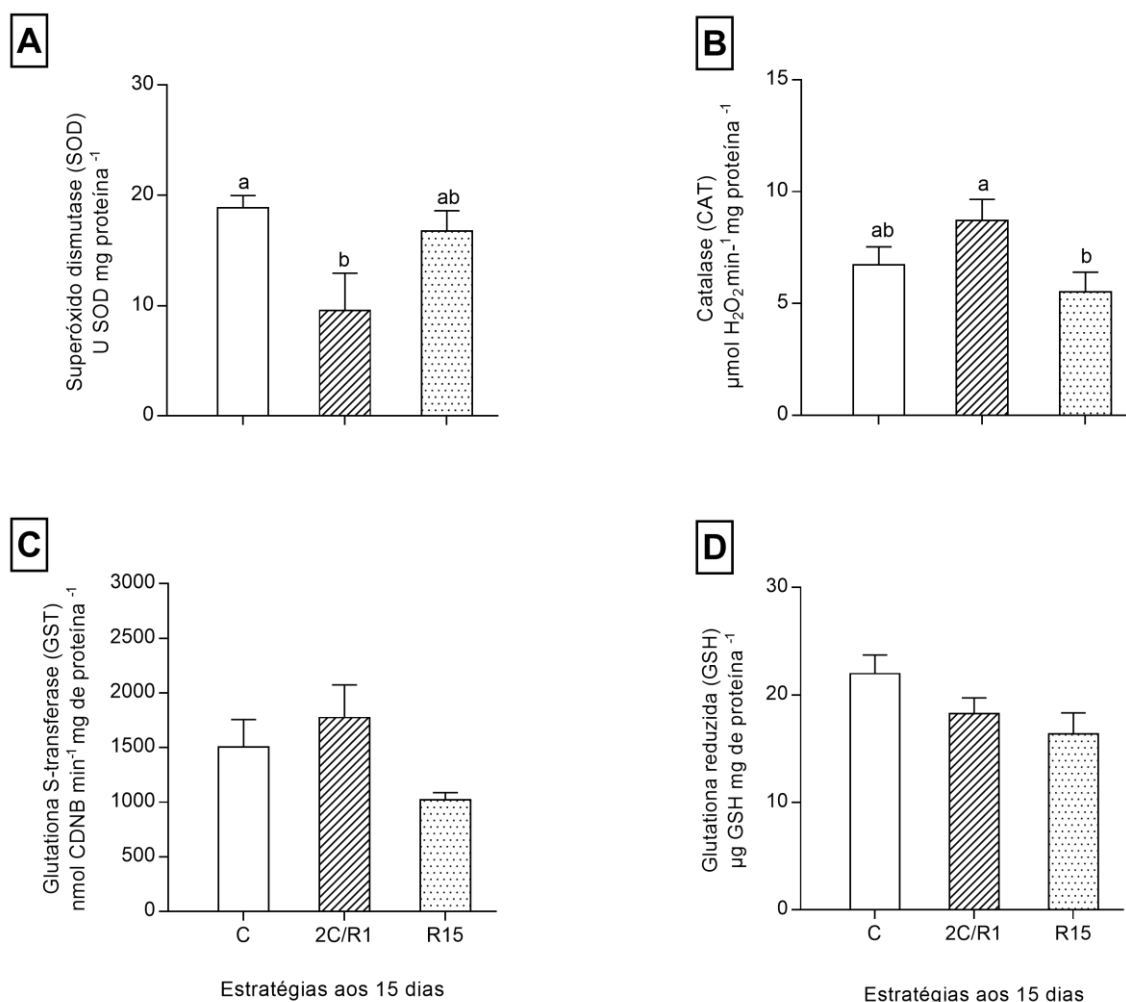


Figura 5. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathiona S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathiona reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) em fígado de pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p<0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

3.1.4. Indicadores do sistema antioxidante no intestino

Aos 15 dias, a atividade intestinal da superóxido dismutase (SOD) (Figura 6A) diminuiu nos peixes da estratégia 2C/R1 quando comparados aos peixes das outras estratégias C ($F= 3,46$, $p= 0,05$).

A atividade intestinal da catalase (CAT) (Figura 6B) e da glutathione S-transferase (GST) (Figura 6C) não diferiram entre as estratégias ($p>0,05$), aos 15 dias de observação.

A concentração intestinal de glutathione reduzida (GSH) (Figura 6D) foi mais elevada nos peixes da estratégia 2C/R1, e diferiram das concentrações dos peixes sob restrição contínua por 15 dias, as quais foram as menores de todas as estratégias ($F= 4,44$, $p= 0,02$), aos 15 dias de observação.

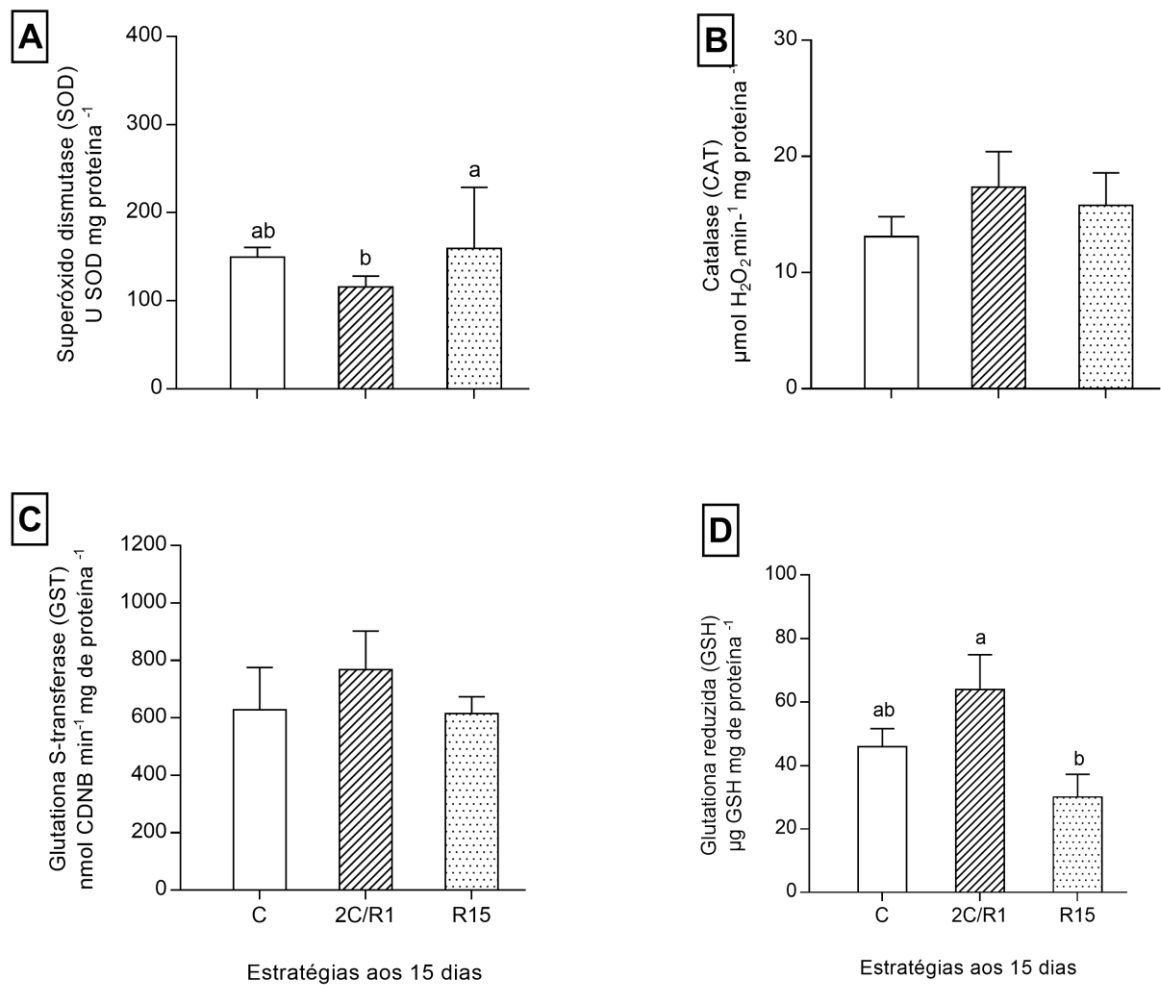


Figura 6. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{ min}^{-1}\text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutaciona S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutaciona reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) em intestino de pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

3.1.5. Índices gordura víscerosomático (IGVS), hepatossomático (IHS) e esplenossomático (IES)

O índice gordura víscerosomático (IGVS) (Figura 7A) não diferiu entre as estratégias alimentares ($p>0,05$), aos 15 dias de observação.

O menor valor de índice hepatossomático (IHS) (Figura 7B) foi observado nos peixes que permaneceram em restrição por 15 dias em relação às estratégias C e 2C/R1 ($F=37,12$, $p<0,001$).

O índice esplenossomático (IES) (Figura 7C) não diferiu entre as estratégias avaliadas ($p>0,05$).

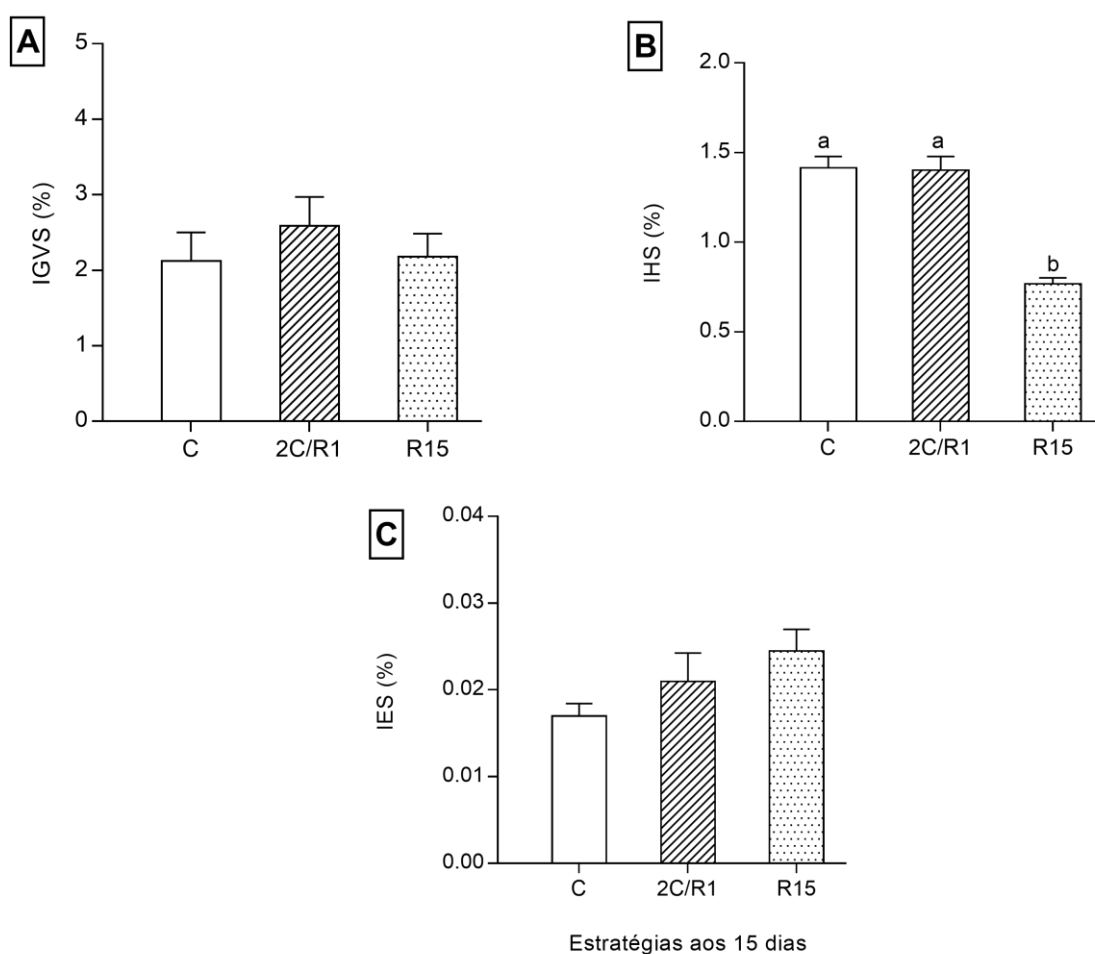


Figura 7. (A) Índice gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%) e (C) índice esplenossomático (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p<0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

3.1.6. Indicadores histológicos do intestino

Na porção anterior do intestino, observamos maior infiltração leucocitária (ILI) (Figura 8A) nos peixes das estratégias 2C/R1 e 15, em relação à estratégia C ($F=12,64$, $p=0,0006$).

A altura das vilosidades intestinais (Figura 8B) e a porcentagem de células caliciformes não diferiram entre as estratégias, aos 15 dias de observação ($p>0,05$).

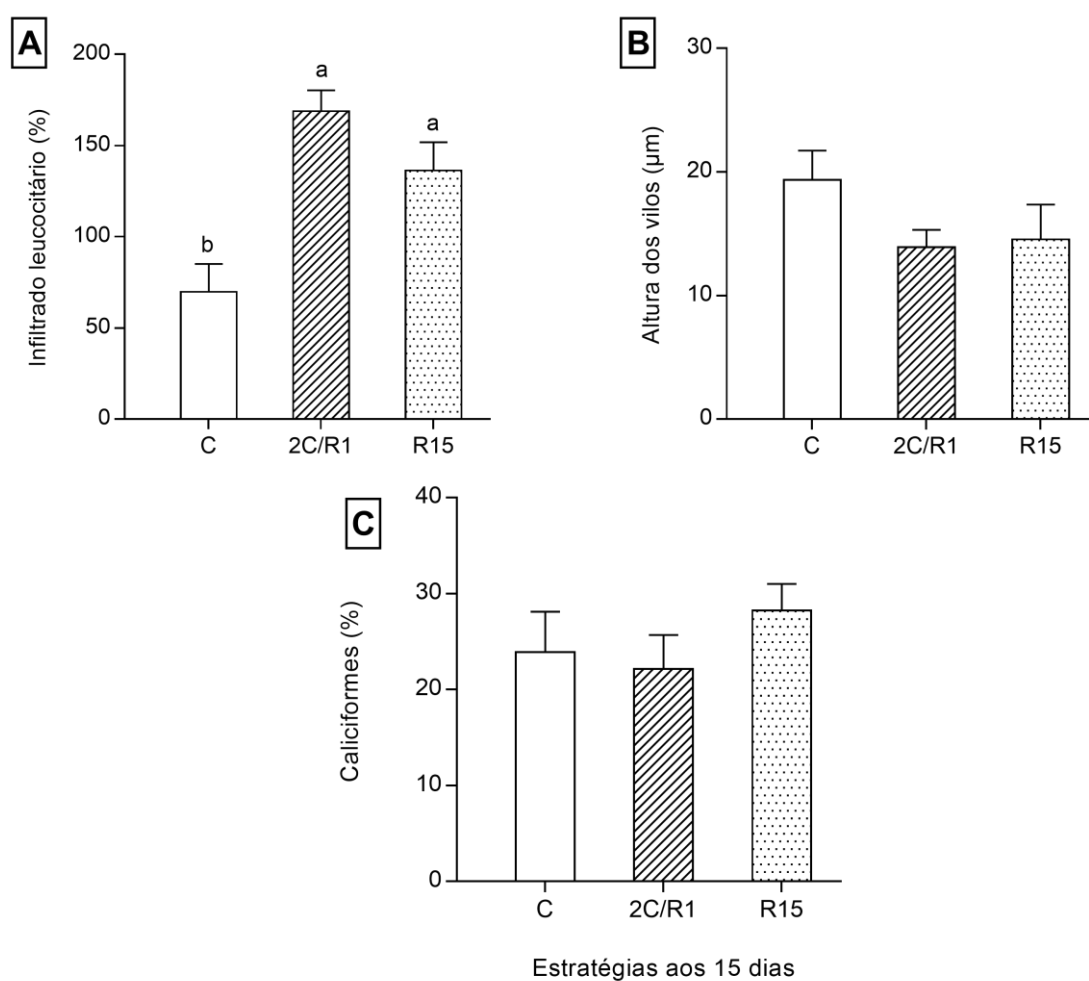


Figura 8. (A) Infiltrado leucocitário (%), (B) altura total dos vilos (μm) e (C) células caliciformes (%) na porção anterior em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação 2 dias/jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença entre as estratégias ($p<0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

Na Figura 9, observamos a presença de infiltrado leucocitário na porção (A) e em B observamos a presença de células caliciformes na porção anterior do intestino que estão presentes nas vilosidades.

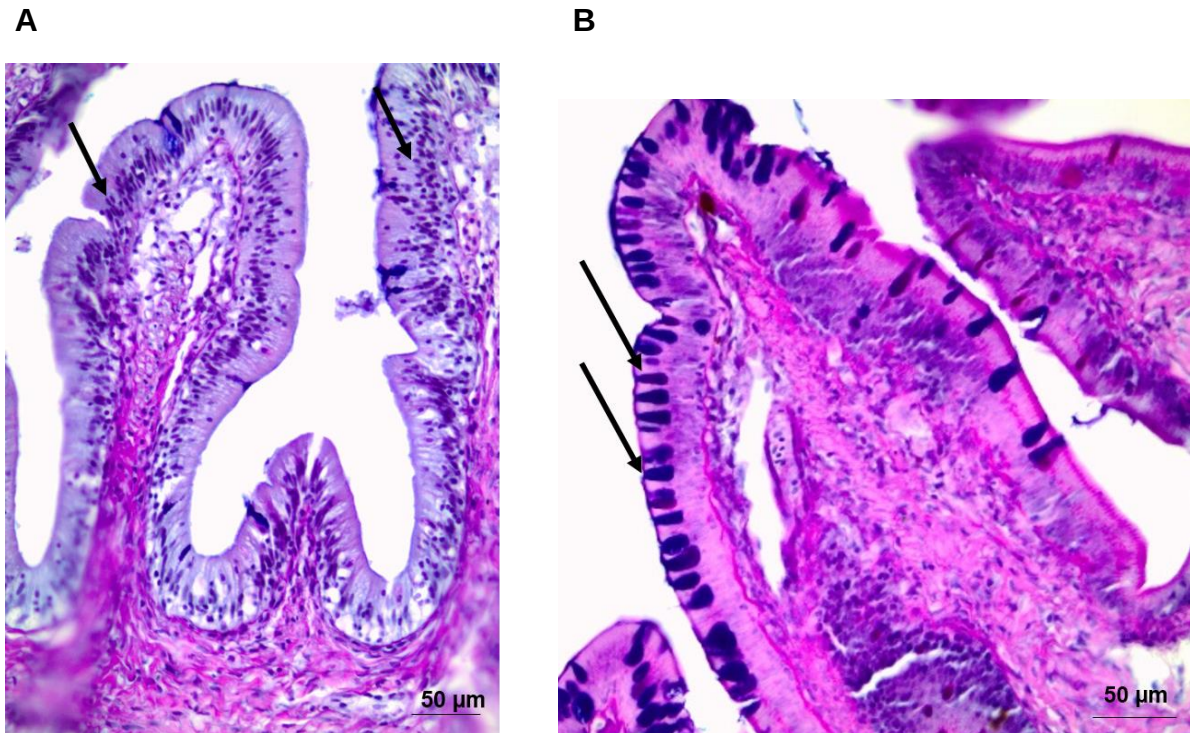


Figura 9. Fotomicrografia mostrando a infiltração leucocitária (A) indicada por setas (HE - 50x), e células caliciformes (B) indicadas por setas (PAS- Alcian Blue 50x).

3.1.7. Desempenho zootécnico

Os peixes da estratégia 2C/R1 apresentaram ganho de peso menor que os peixes controle, enquanto os peixes sob restrição alimentar contínua perderam peso (Figura 10A), aos 15 dias de observação ($F=448,08$, $p<0,001$).

Em relação ao consumo relativo de dieta (Figura 10B), os peixes das estratégias C e 2C/R1 apresentaram consumo semelhante, até os 15 dias de observação ($F= 2,84$, $p<0,01$).

Aos 15 dias, a conversão alimentar aparente (Figura 10C) foi melhor nos peixes controle, com alimentação contínua, em relação aos peixes da estratégia 2C/R1 ($F= 1,82$, $p<0,01$).

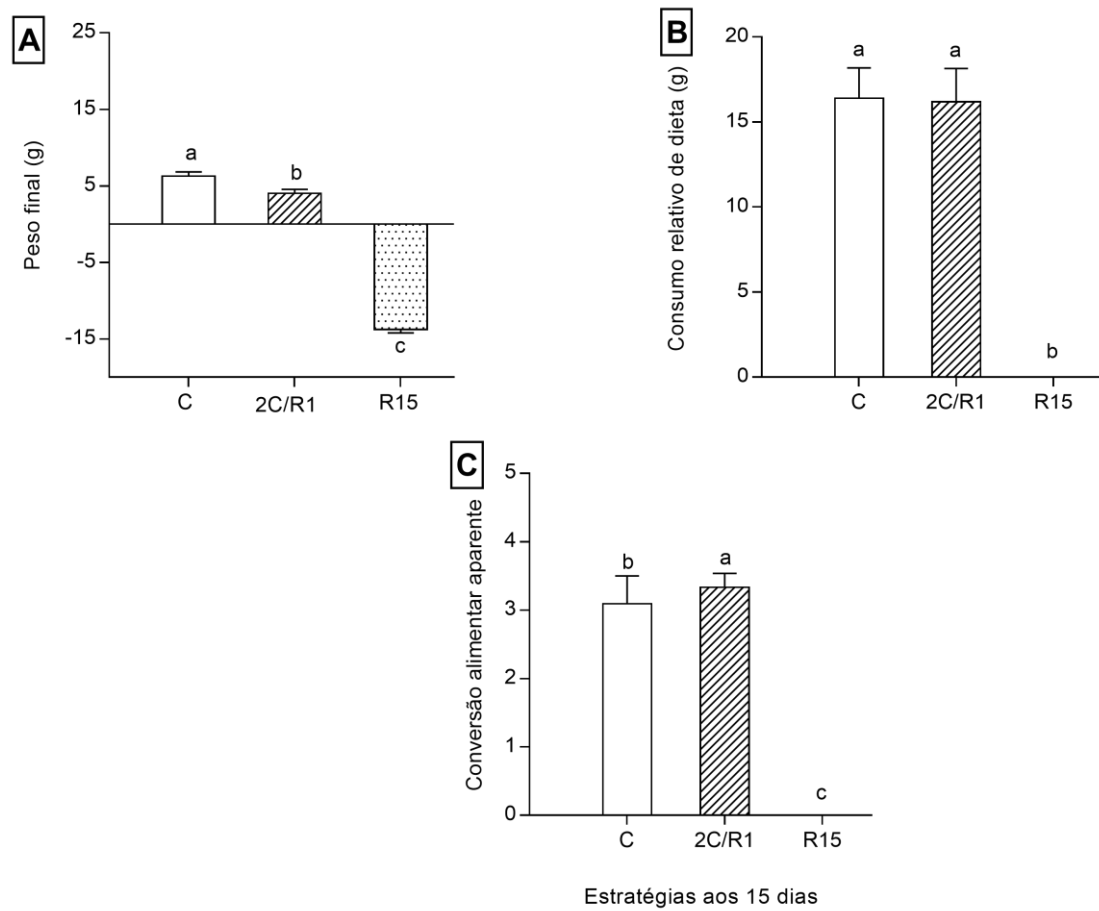


Figura 10. (A) Peso final (g), (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar aparente em pacus submetidos a estratégias alimentares: C – alimentação contínua, 2C/R1 – alimentação por 2 dias e jejum de 1 dia e R15 - restrição alimentar contínua. Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferença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

3.2 Ensaio 2. Efeito da suplementação dietária com L-GLUT em respostas fisiológicas em pacus submetidos a diferentes estratégias alimentares aos 15 dias

3.2.1. Concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol

As concentrações plasmáticas de glicose (Figura 11A) não diferiram independente da estratégia alimentar e dieta ($p>0,05$).

As concentrações de triglicerídeos (Figura 11B) diminuíram na estratégia 2C/R1 em comparação a C ($F=12,08$ $p= 0,02$).

Em relação as concentrações de colesterol sérico (Figura 11C), observamos redução na estratégia 2S/R1 em comparação a CS ($F=13,04$, $p= 0,02$).

As concentrações de glicerol não diferiram, independente da estratégia alimentar e dieta ($p>0,05$).

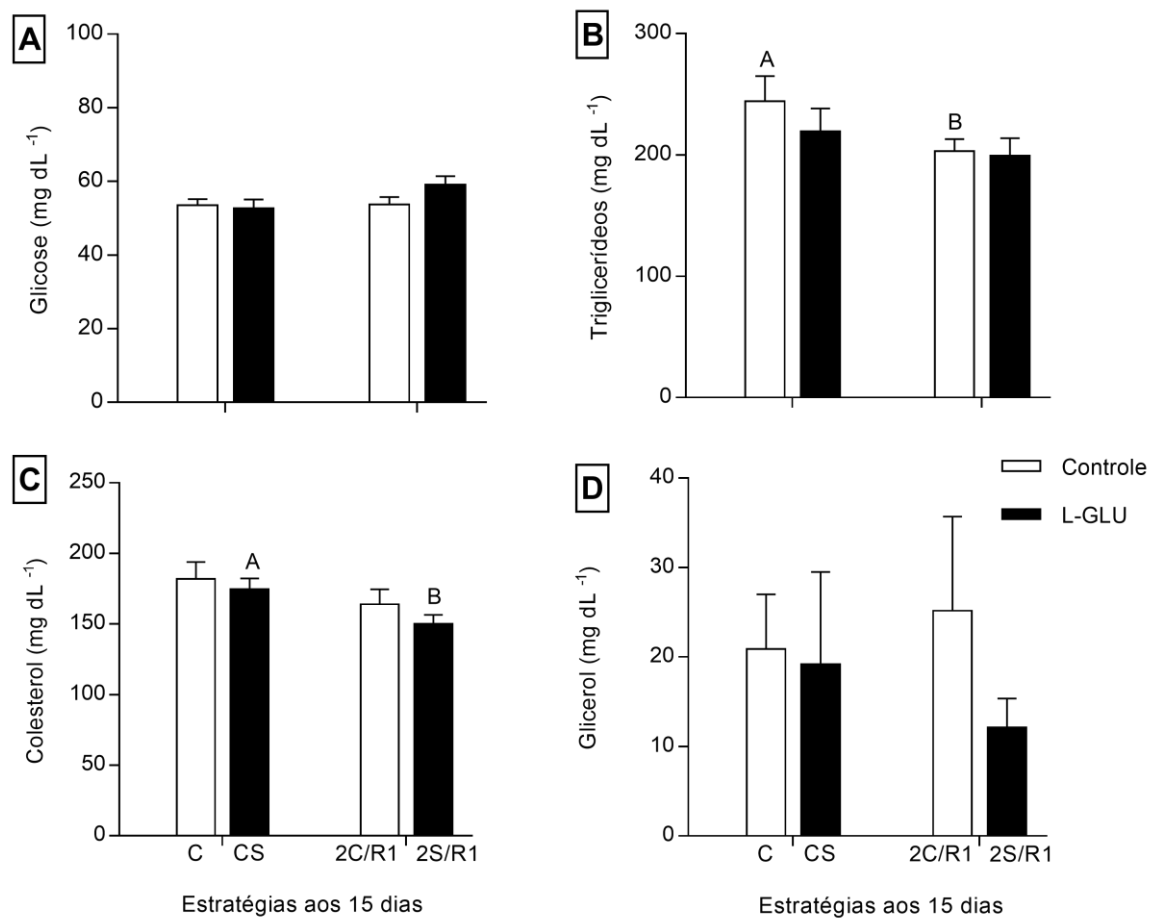


Figura 11. (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL⁻¹); (C) colesterol (mg dL⁻¹) e (D) glicerol (mg dL⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU,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

3.2.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular

As concentrações de glicogênio hepático (Figura 12A) dos peixes da estratégia 2C/R1 e 2S/R1 aumentaram em relação aos grupos C e CS ($F= 14,08$, $p= 0,02$; $F= 18,07$, $p= 0,02$). Entre as estratégias, no grupo 2S/R1 as concentrações diminuíram em relação ao grupo 2C/R1 ($F= 12,08$, $p= 0,02$).

As concentrações de lipídio hepático (Figura 12B) e lipídio muscular (Figura 12C) não diferiram independente da estratégia alimentar e dieta ($p>0,05$).

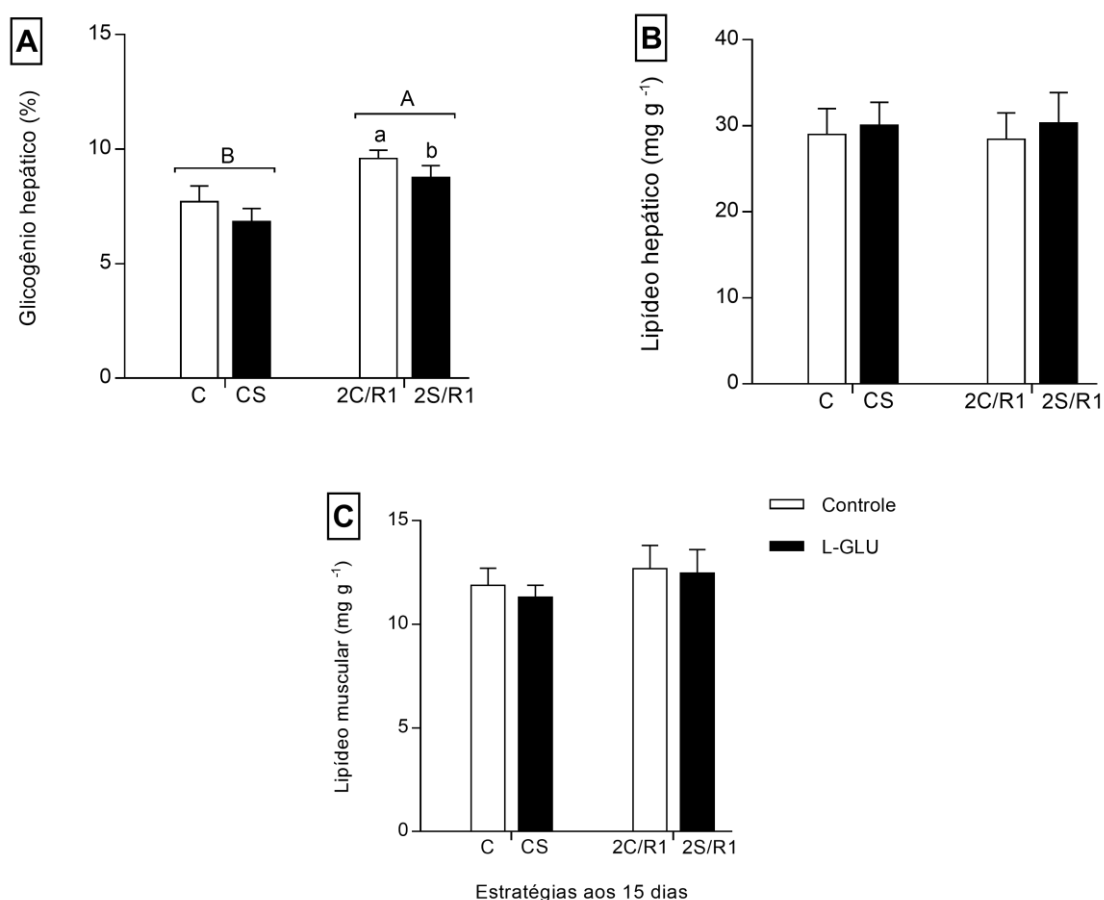


Figura 12. (A) Glicogênio hepático (%), (B) lipídio hepático (mg g⁻¹) e (C) lipídio muscular (mg g⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle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

3.2.3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima (CLS)

A atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Figura 13A) e a concentração sérica de lisozima (Figura 13B) não diferiram independente das estratégias alimentares e dietas ($p>0,05$).

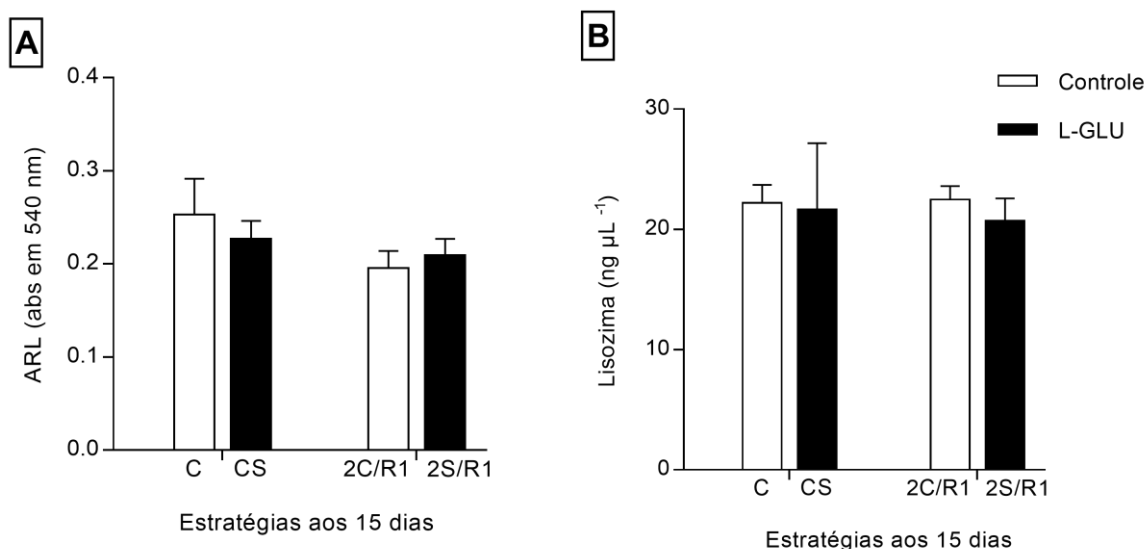


Figura 13. (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540 nm); (B) concentração sérica de lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU,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

3.2.4. Indicadores do sistema antioxidante no fígado

A atividade hepática da superóxido dismutase (Figura 14A) apresentou redução na estratégia 2C/R1 em relação a estratégia C ($F= 9,84$, $p= 0,01$).

Em relação a atividade hepática da catalase (Figura 14B), atividade hepática da glutathione S-transferase (Figura 14C) e da concentração de glutathione reduzida (Figura 14C), não diferiram independente da estratégia alimentar e dieta ($p>0,05$).

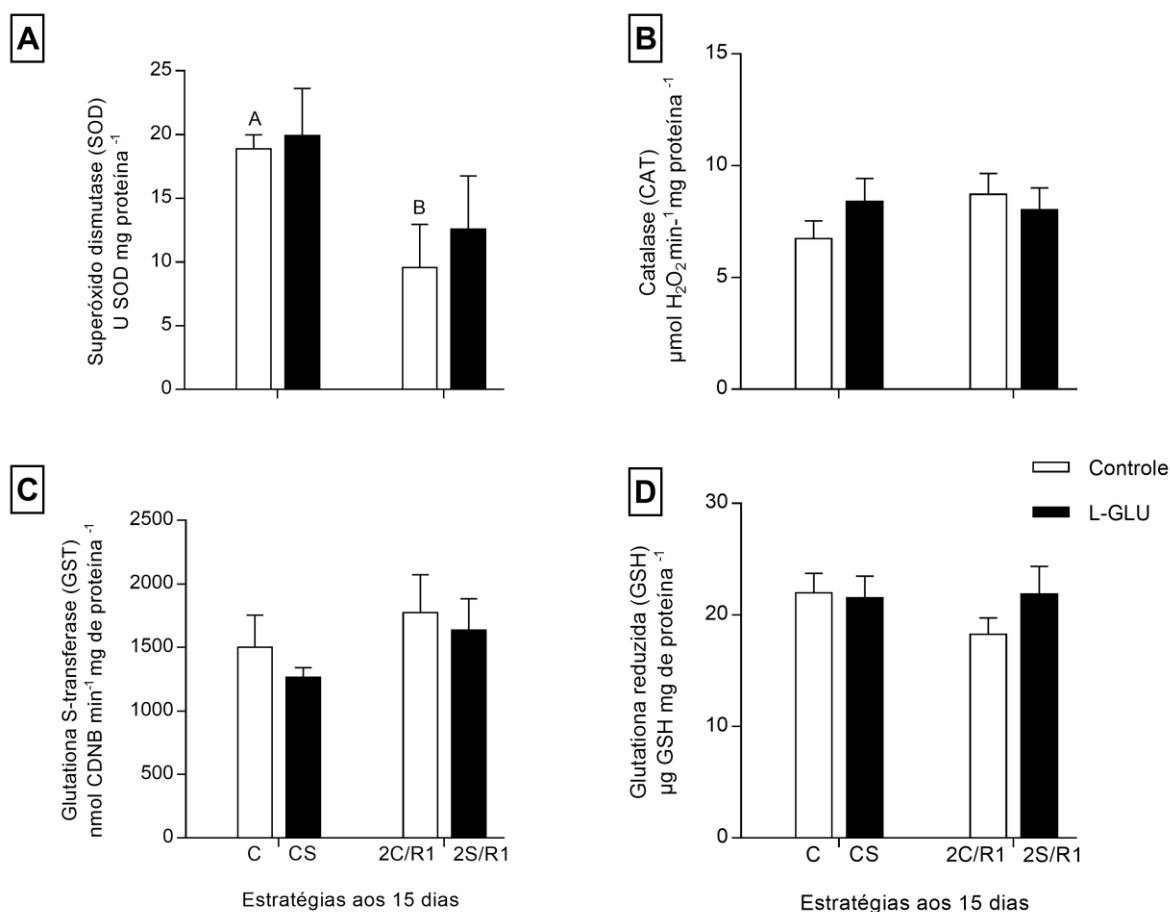


Figura 14. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) em fígado de pacus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

3.2.5. Indicadores do sistema antioxidante no intestino

A atividade da superóxido dismutase (Figura 15A) apresentou redução na estratégia 2C/R1 em relação a estratégia C ($F = 36,80$, $p = 0,0001$). Em relação as estratégias, o grupo CS foi menor que o grupo C ($F = 9,57$, $p = 0,01$).

Em relação a atividade da catalase (Figura 15B), atividade da glutathione S-transferase (Figura 15C) e da concentração de glutathione reduzida (Figura 15C), não houve diferença entre tratamentos e estratégias ($p > 0,05$).

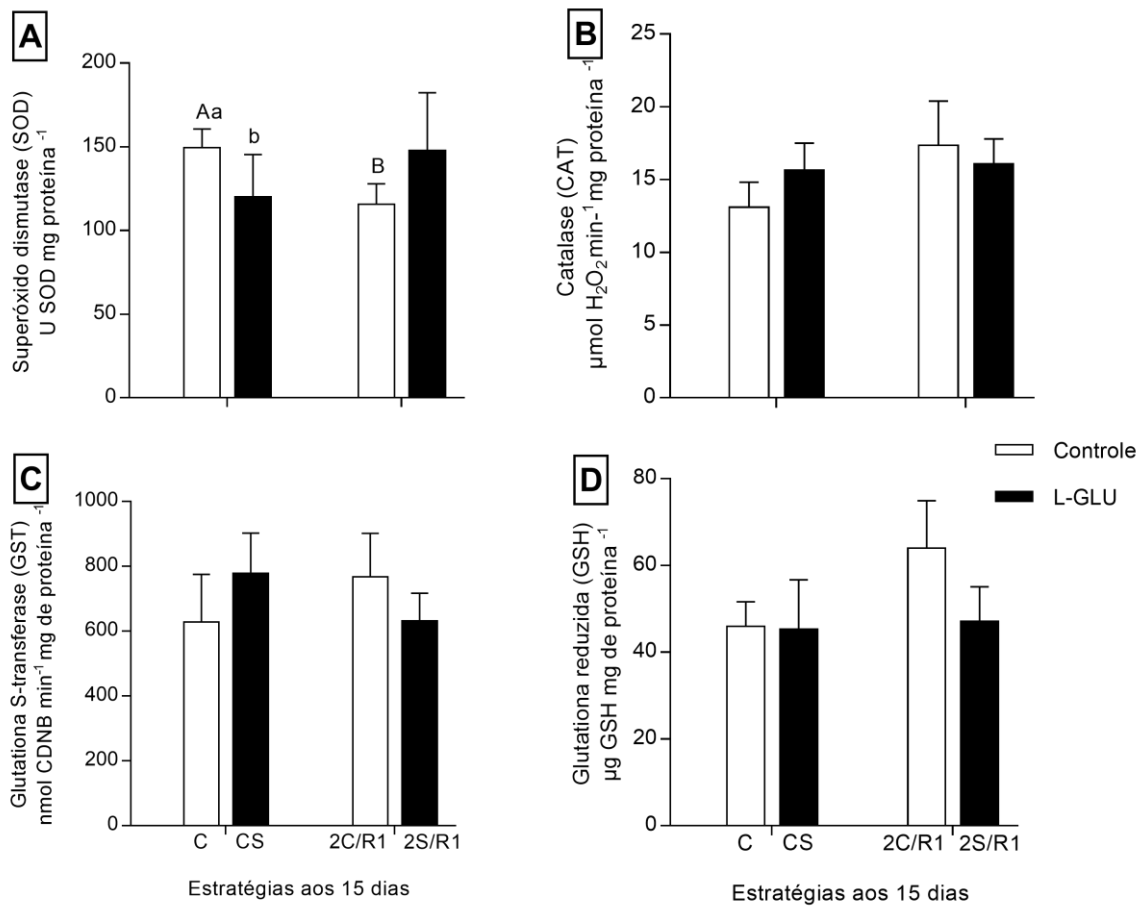


Figura 15. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase (μmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida (μg GSH mg de proteína⁻¹) em intestino de pacu submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação controle e com L-GLU, por 2 dias/jejum de 1 dia. Letras maiúscula (A,B) indicam diferença entre dietas (controle e L-GLU) (p<0,05). Letras minúsculas (a,b) indicam diferença entre as estratégias (p<0,05). Os dados representam médias e erro padrão.

3.2.6. Índices gordura víscerosomático (IGVS), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenossomático (IES)

O índice hepatossomático (Figura 16B) apresentou os maiores valores na estratégia 2S/R1 quando comparados a estratégia CS ($F = 15,07$, $p = 0,004$).

O índice gordura víscerosomático (Figura 16A) e o índice esplenossomático (Figura 16C) não diferiram independente das estratégias alimentares e dietas ($p > 0,05$).

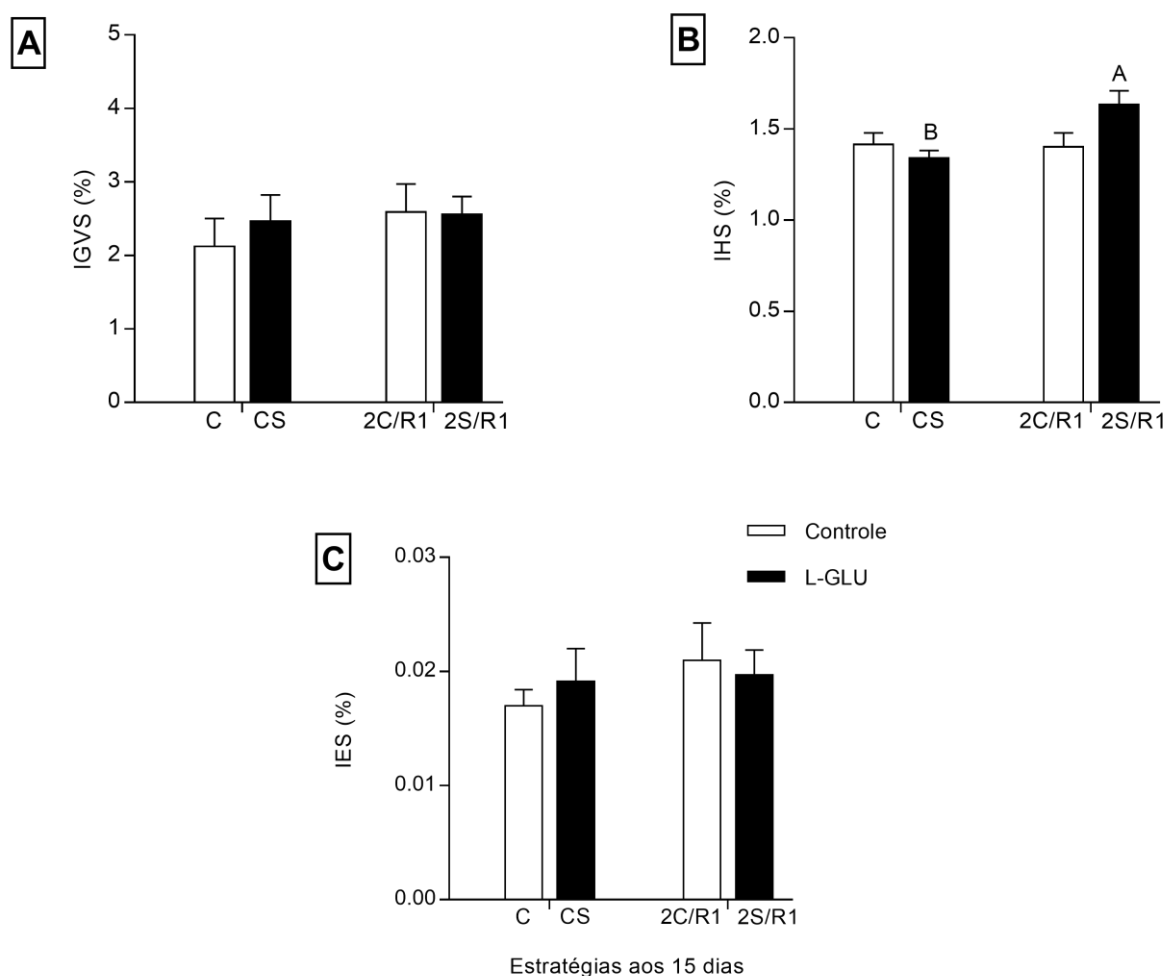


Figura 16. (A) Índice de gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%) e (C) índice esplenossomático (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1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

3.2.7. Indicadores histológicos do intestino

Na porção anterior do intestino, observamos aumento da infiltração leucocitária intraperitoneal (Figura 17A) na estratégia 2C/R1 e 2S/R1 em comparação com a estratégia C e CS ($F= 26,73$, $p= 0,0004$). Contudo, nos peixes da estratégia 2S/R1 observamos redução de infiltrado em comparação ao grupo 2C/R1 ($F= 132,23$, $p<0,001$).

Em relação à média da altura das vilosidades (Figura 17B) não houve diferença independente das estratégias alimentares e dietas ($p>0,05$).

Para média da porcentagem de células calciformes (Figura 17C) a estratégia 2S/R1 foi menor que a 2C/R1 ($F=8,97$, $p= 0,012$).

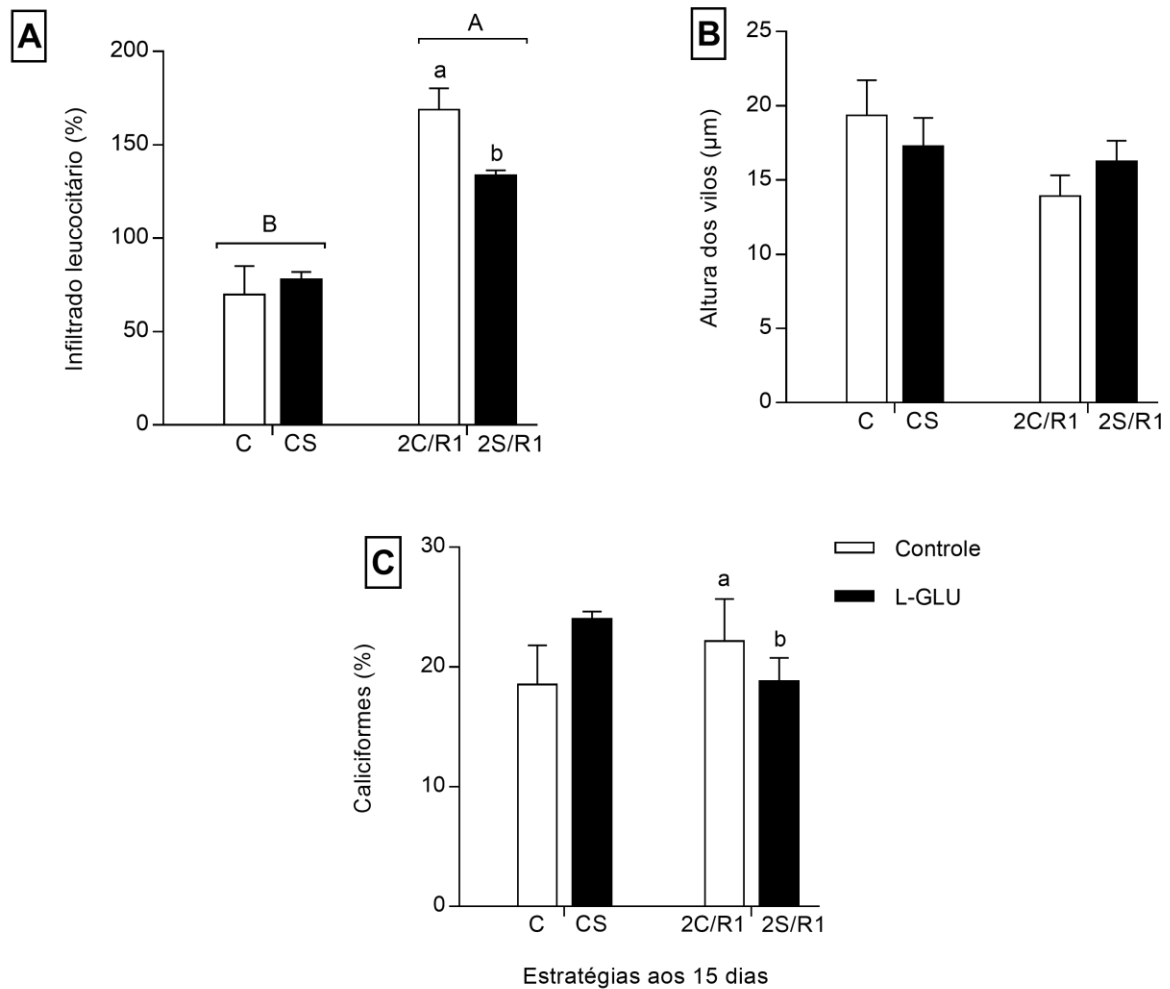


Figura 17. (A) Infiltrado leucocitário (%), (B) altura total das vilosidades (μm) e (C) células caliciformes em pacus submetidos a estratégias alimentares por 15 dias sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C – alimentação contínua, CS – alimentação contínua com L-GLU, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação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

3.2.8. Desempenho zootécnico

Os peixes da estratégia 2C/R1 apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos do grupo C ($F= 8,46$, $p= 0,01$) (Figura 18A).

O consumo de alimento (Figura 19B) e conversão alimentar aparente (Figura 20C) não diferiram em relação às estratégias e dietas ($p>0,05$).

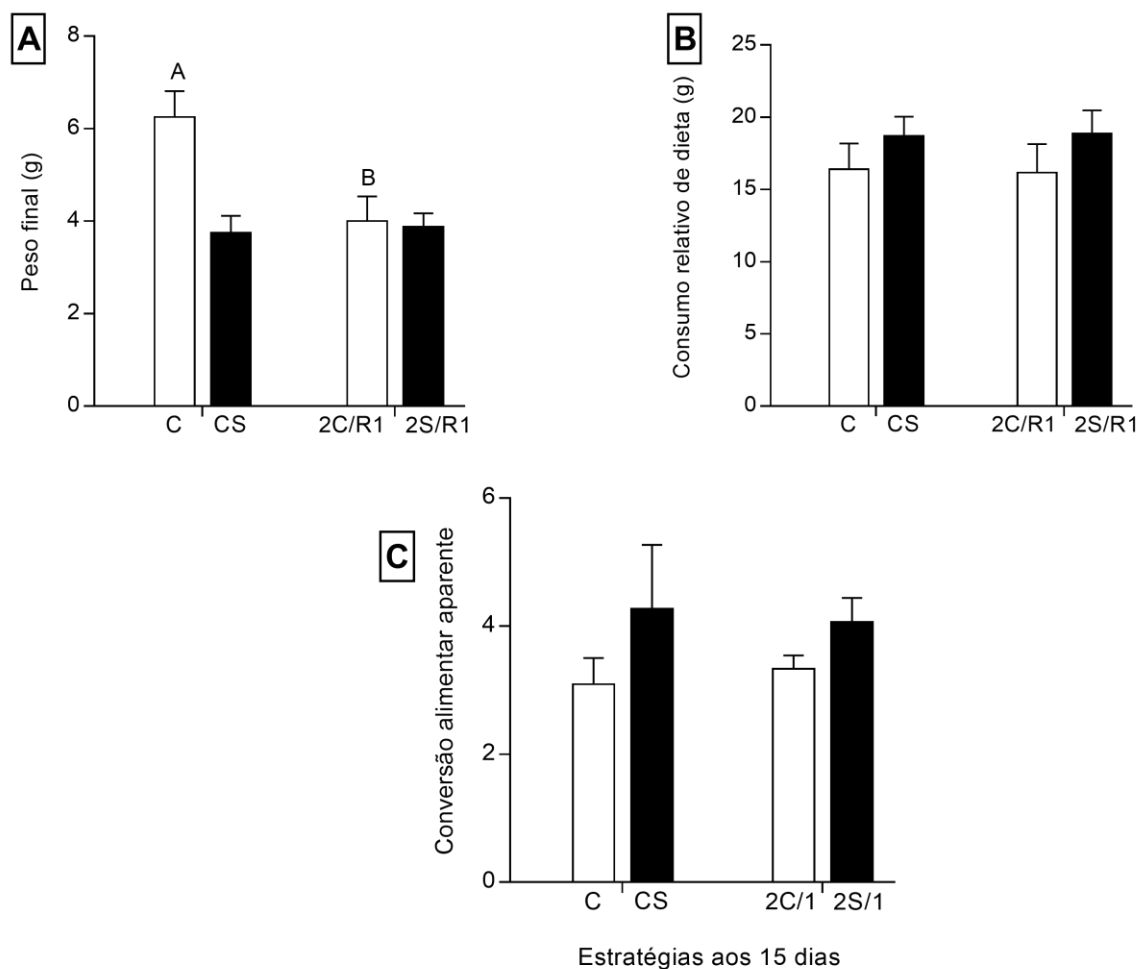


Figura 18. (A) Peso final, (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg ração. C e CS – alimentação contínua e suplementada, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia controle e suplementada.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

3.3. Ensaio 3. Efeito de diferentes ciclos de restrição alimentar e realimentação e da suplementação dietária com L-GLU em respostas fisiológicas aos 30 e 38 dias.

3.3.1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicerídeos, colesterol e glicerol

Após 30 dias de restrição alimentar, as concentrações plasmáticas de glicose (Figura 19A) dos peixes da estratégia alimentar 30 (C e S) apresentaram redução da glicemia ($F=7,40$, $p=0,003$; $F=5,33$ $p=0,01$) em relação aos peixes alimentados diariamente (C e S) e submetidos a restrição alternada com alimentação (2C/R1 e 2S/R1). Essa redução não foi observada nos peixes que receberam o L-Glu. Após 8 dias de realimentação, observamos aumento das concentrações nos dois grupos R30 (C/8 e S/8) até os valores observados nos grupos de peixes C ($F=9,65$, $p=0,007$). O L-GLU elevou a glicemia apenas no grupo 2S/R1 em relação ao respectivo controle (2C/R1), aos 38 dias ($F=4,53$, $p=0,02$).

Aos 30 dias, observamos redução da concentração de triglicerídeos (Figura 19B) nos peixes das estratégias 2C/R1 e 30 em relação a estratégia controle (C). Após realimentação, as concentrações se elevaram nos 2 grupos de peixes (2C/R1 e 30), embora apenas os peixes de 2C/R1 tenham se igualado aos peixes controle ($F=6,38$, $p=0,006$; $F=270,3$, $p<0,001$).

Em relação ao colesterol sérico (Figura 19C), aos 30 dias, observamos aumento das concentrações nos peixes da estratégia 30 (C e S) em relação às outras estratégias (C e 2C/R1) ($F=39,8$, $p<0,001$; $F=26,7$, $p<0,001$). Após realimentação, as concentrações de colesterol observadas nos peixes da estratégia 30 (C e S) diminuíram e se igualaram aos valores dos outros grupos ($F=37,5$, $p<0,001$).

Após 30 dias, as concentrações de glicerol (Figura 19D) não diferiram entre os grupos, e diminuíram após realimentação, exceto nos peixes das estratégias C e 2C/R1 ($F=13,26$, $p=0,02$).

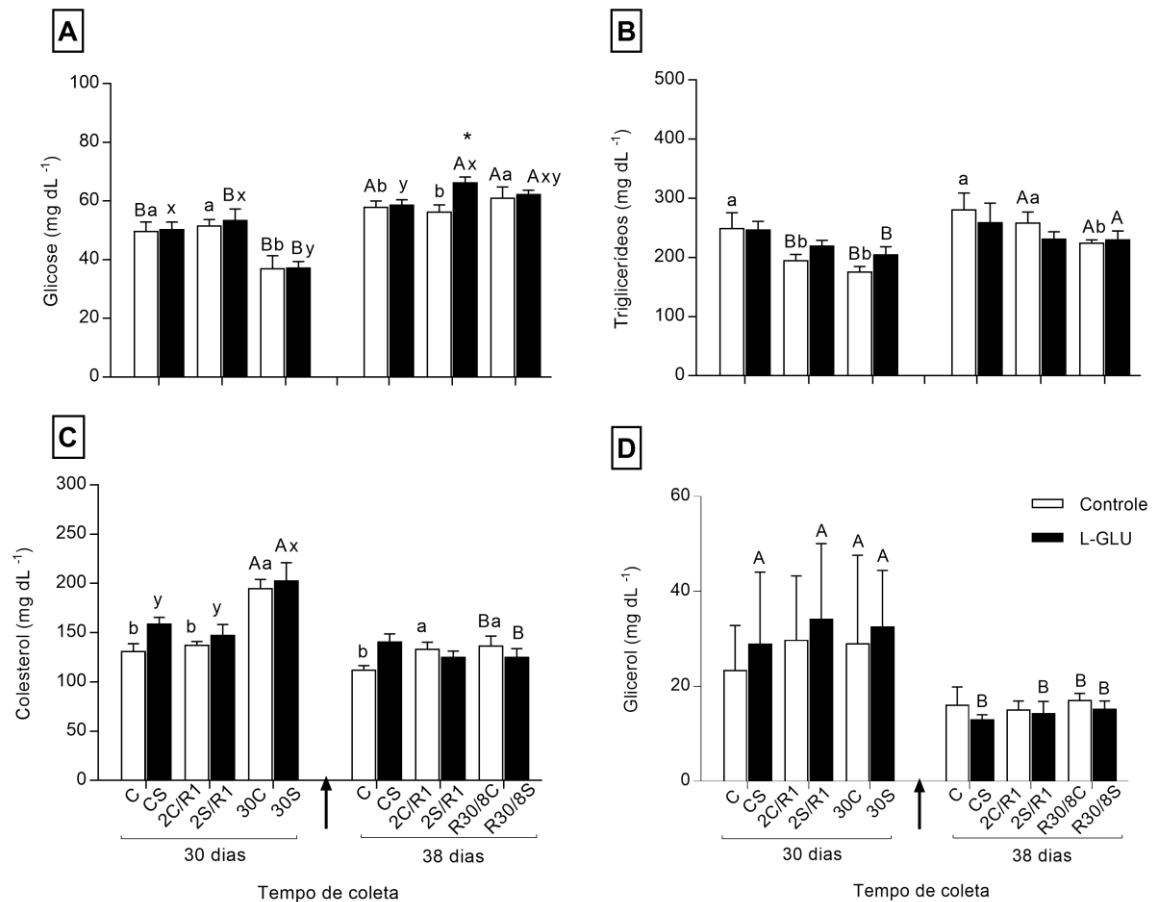


Figura 19. (A) Concentrações sanguíneas de glicose, (B) triglicerídeos (mg dL⁻¹) (C) colesterol (mg dL⁻¹) e (D) glicerol (mg dL⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum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

3.3.2. Concentrações de glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular

Aos 30 dias, as concentrações de glicogênio (Figura 20A) dos peixes da estratégia 30 (C e S) reduziram em relação aos outros grupos ($F= 71,37$, $p<0,0001$; $F= 100,34$, $p<0,0001$). Ainda, nesta amostragem, observamos, nos peixes 2C/R1, valores superiores em relação aos peixes C ($F=65,7$, $p<0,001$). Nos peixes 2S/R1, o aumento é apenas numérico, mas segue o mesmo comportamento do grupo 2C/1. Aos 38 dias, após realimentação, as concentrações nos dois grupos R30/8 (C e S) aumentam em relação aos valores observados aos 30 dias ($F= 19,28$, $p<0,0001$; $F= 2,91$, $p=0,04$). No grupo 2S/R1, continuaram a aumentar em relação ao valor observado aos 30 dias. No grupo 2C/R1, a resposta seguiu o mesmo perfil, mas com diferença apenas numérica.

Em relação às concentrações de lipídeo hepático (Figura 20B), observamos mudanças apenas no grupo R30C que apresentou valores menores ($F= 16,8$, $p= 0,02$) aos 30 dias, com aumento após realimentação (R30/8C) ($F= 13,6$, $p= 0,01$).

Os níveis de lipídio muscular (Figura 20C), as diferenças apareceram apenas nos grupos R30 (C e S). Os valores foram mais elevados aos 30 dias, em relação a 38 dias ($F=20,70$, $p=0,001$), e, nesta amostragem, os valores dos grupos R30/8C e R30/8S foram mais baixos do dos outros grupos ($F=22,71$, $p<0,0001$).

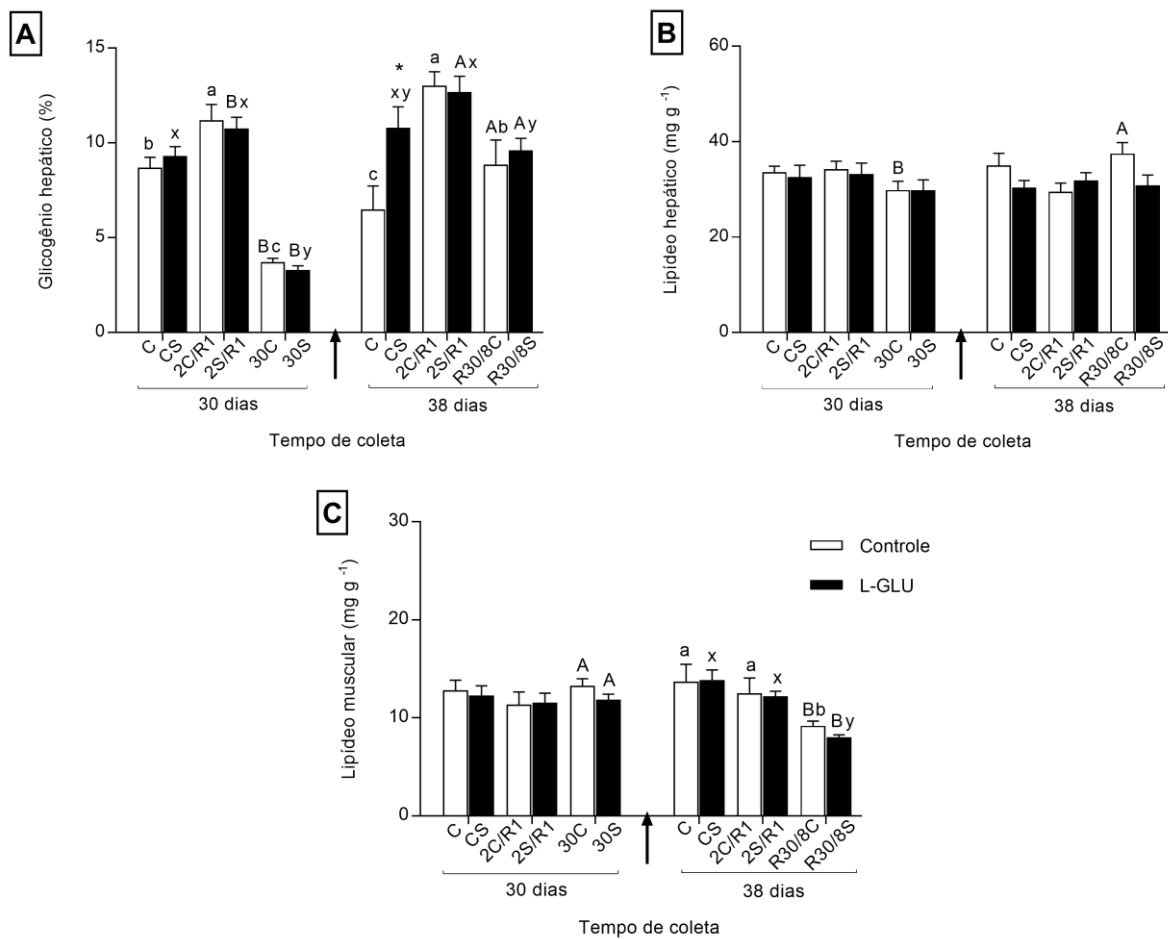


Figura 20. Concentrações de (A) glicogênio hepático (%) e (B) lipídeo hepático (mg g⁻¹), (C) e lipídeo muscular (mg g⁻¹) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de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

3.3.3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima

A atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Figura 21A) diminuiu aos 38 dias ($F= 42,07$, $p<0,001$), independente das estratégias alimentares e dietas. A concentração sérica de lisozima (Figura 21B) não diferiram independente das estratégias e dietas ($p>0,05$)

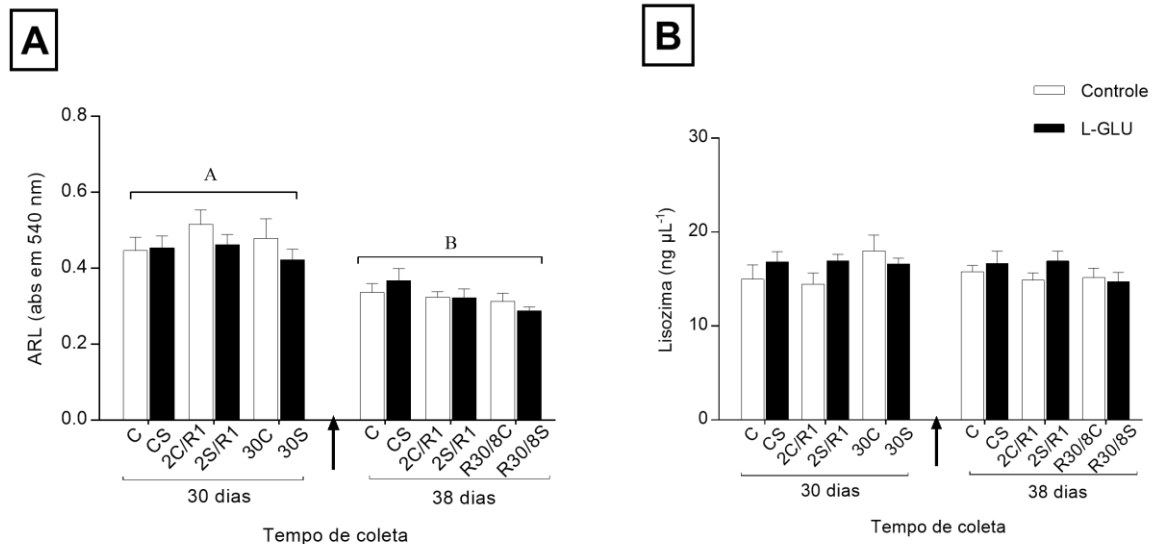


Figura 21. (A) Atividade respiratória de leucócitos (abs em 540 nm); (B) concentração sérica de lisozima ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por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

3.3.4. Indicadores do sistema antioxidante no fígado

A atividade hepática da superóxido dismutase (Figura 22A) não diferiu independente das estratégias alimentares e dietas ($p>0,05$).

Aos 30 dias, a atividade hepática da catalase (Figura 22B) diminuiu nos peixes do grupo 30 (C e S) ($F=6,84$, $p=0,005$; $F=21,5$, $p<0,001$) e, após realimentação, aumentou até valores observados nos outros grupos de peixes (C, CS, 2C/R1, 2S/R1) ($F=9,6$, $p=0,003$; $F=11,50$, $p=0,0006$). Aos 30 dias, a atividade dos peixes do grupo 2S/R1 foi superior à dos peixes CS ($F=8,87$, $p<0,001$).

Aos 30 dias, não observamos diferença na atividade hepática da glutathione S-transferase (Figura 22C), independente das estratégias alimentares e dietas, mas, aos 38 dias, a atividade diminuiu nos grupos 2C/R1 e R30/8S ($F=5,80$, $p=0,01$; $F=6,74$, $p=0,006$) em relação ao observado aos 30 dias nestes grupos.

Aos 30 dias, a concentração hepática da glutathione reduzida (GSH) (Figura 22D) diminuiu nos peixes R30C e R30S ($F=8,16$, $p=0,002$; $F=6,74$, $p=0,006$), mas não se alterou nos peixes de todas as estratégias que receberam L-Glu. Aos 38 dias, as concentrações aumentaram em ambos os grupos (R30/8C e R30/8S) ($F=11,98$, $p=0,002$).

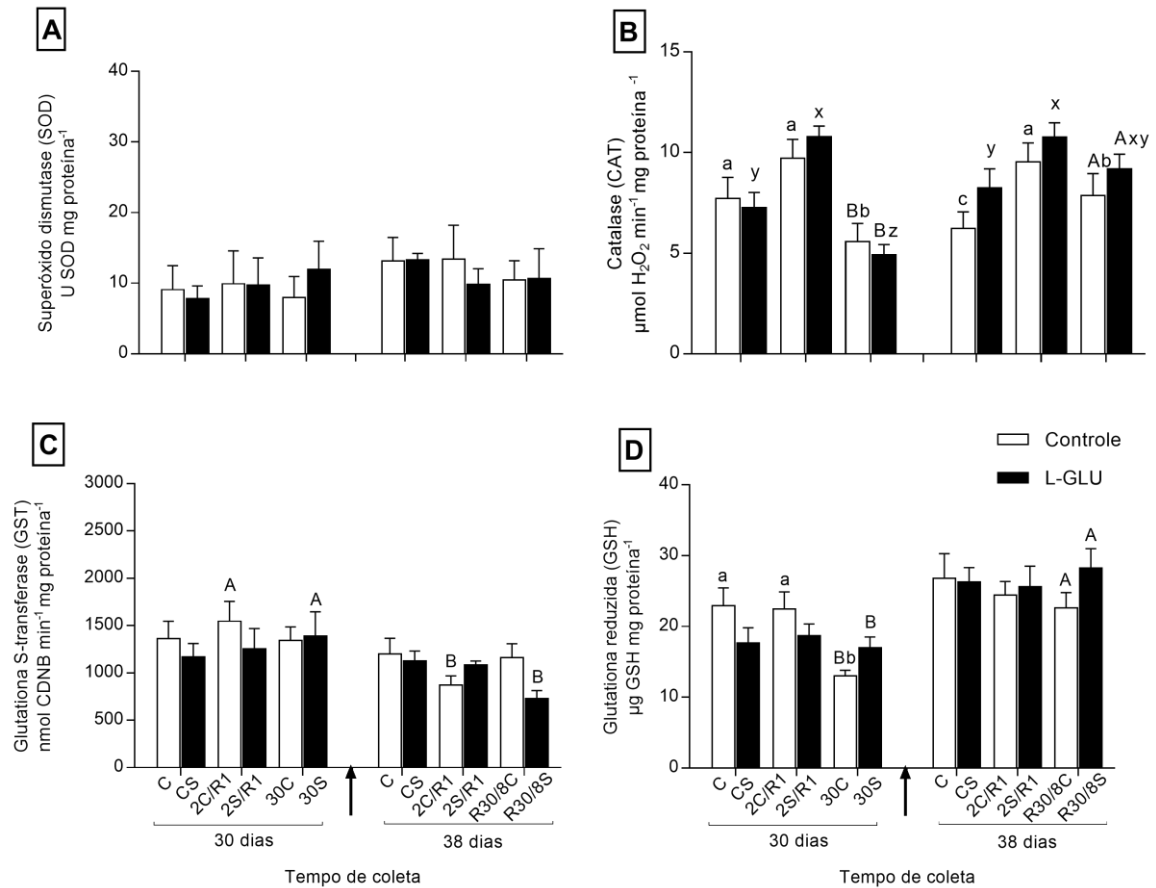


Figura 22. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) no fígado de pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias; R30/8C e R30/8S - restrição alimentar de 30 dias e realimentação de 8 dias. Seta indica o início da realimentação (8 dias) para os grupos R30/8C e R30/8S. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças nas estratégias alimentares ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas (a,b,c – Controle; x,y,z – L-GLU) entre as estratégias alimentares dentro do tempo ($p < 0,05$). Os dados representam médias e erro padrão.

3.3.5. Indicadores do sistema antioxidante no intestino

Aos 30 dias, a atividade intestinal da superóxido dismutase (SOD) (Figura 23A) não diferiu ($p>0,05$), independente das estratégias alimentares e dietas. Aos 38 dias, observamos diminuição da atividade nos peixes do grupo 30S/8 ($F= 6,97$, $p=0,005$) em relação ao observado no mesmo grupo aos 30 dias, e valores mais baixos quando comparados aos grupos CS e 2S/R1 ($F= 3,89$, $p= 0,04$). Nesta amostragem o grupo suplementado apresentou atividade da SOD mais baixa ($F=14,49$, $p=0,003$) que a amostragem aos 30 dias.

Aos 30 dias, a atividade intestinal da catalase não diferiu, independente das estratégias alimentares e dietas ($p>0,05$). Aos 38 dias, observamos redução da atividade da catalase (Figura 24B) nas estratégias de restrição que utilizaram L-Glu (2S/R1 e R30/8S) ($F= 4,23$, $p=0,03$; $F=7,11$, $p=0,005$).

A atividade intestinal da glutathione S-transferase no intestino (Figura 23C) não diferiu entre os tempos de amostragem, estratégias alimentares e dietas ($p>0,05$).

A concentração intestinal da GSH não apresentou um perfil de alterações definido (Figura 23D). Aos 30 dias, observamos redução no grupo 30S ($F=2,71$, $p=0,05$) em relação aos outros grupos, enquanto, aos 38 dias, a concentração é maior no grupo R30/8C ($F=3,00$, $p=0,05$) em relação a 2C/R1.

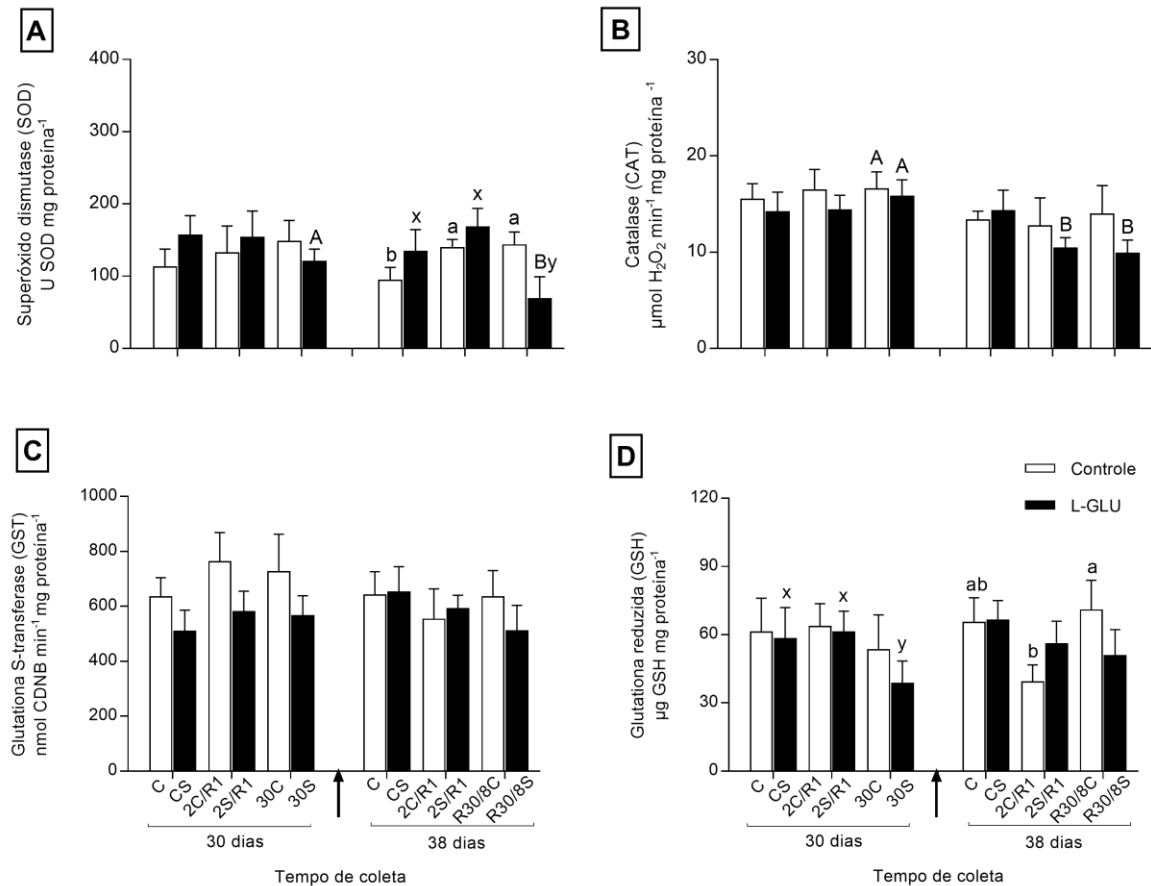


Figura 23. (A) Superóxido dismutase (U SOD mg de proteína⁻¹), (B) catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), (C) glutathione S-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) e (D) glutathione reduzida ($\mu\text{g GSH mg de proteína}^{-1}$) no intestino de pacus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

3.3.6. Índices gordura víscerosomático (IGVS), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenossomático (IES)

O índice de gordura víscerosomático (IGVS) (Figura 24A) não diferiu aos 30 dias, independente das estratégias alimentares e dietas, mas diminuiu aos 38 dias no grupo R30/8S ($F=3,25$, $p=0,05$), em relação ao dia 30. Aos 38 dias, houve redução nos grupos R30/8C e R30/8S em relação aos outros grupos ($F=5,2$, $p=0,02$). Em relação aos tratamentos, houve um aumento, aos 38 dias, na estratégia R30/8C ($F=13,24$, $p=0,002$).

Aos 30 dias, o índice hepatossomático (IHS) (Figura 24B) diminuiu nos peixes do grupo 30 (C e S), com aumento após realimentação ($F=153,3$, $p<0,0001$; $F=134,71$, $p<0,0001$) aos valores observados nos outros grupos. Em relação aos tratamentos, houve um aumento, aos 38 dias, na estratégia R30/8S ($F=11,24$, $p=0,004$).

Aos 30 dias, o índice esplenossomático (IES) (Figura 24C) aumentou ($F=3,94$, $p=0,003$), nos peixes da estratégia 30 (C e S), com redução após realimentação ($F=12,83$, $p<0,0001$; $F=7,20$, $p=0,004$), aos valores observados nos outros grupos.

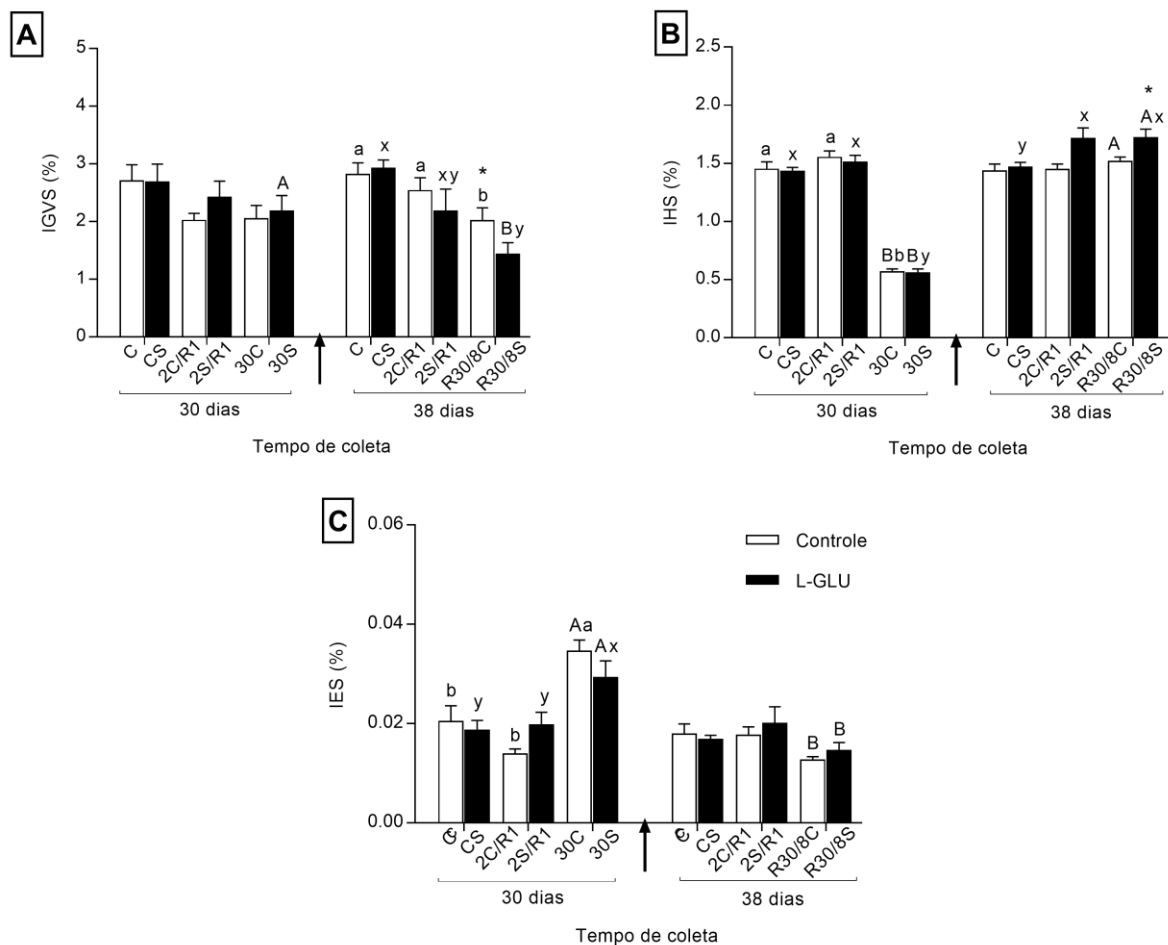


Figura 24. (A) índice de gordura víscerosomático (%), (B) índice hepatossomático (%), índice esplenossomático (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante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

3.3.7. Indicadores histológicos do intestino

Aos 30 dias, observamos, na porção anterior do intestino (Figura 25A) aumento do infiltrado leucocitário (ILI) nas duas estratégias de restrição alimentar (2C/R1, 2S/R1, 30C e 30S) ($F=10,78$, $p=0,001$; $F=53,45$, $p<0,0001$), com redução aos valores dos grupos diariamente alimentados (C e S), aos 38 dias, exceto no grupo 2C/R1 ($F=5,07$, $p=0,02$; $F=53,45$, $p<0,0001$).

A altura total das vilosidades intestinais (Figura 25B) aumentou nas estratégias 2/1 (C e S) ($F=9,64$, $p=0,001$; $F=4,62$, $p=0,02$) e 30C ($F=7,87$, $p=0,005$), aos 30 dias, e diminuiu aos 38 dias. Ainda aos 38 dias, nos peixes da estratégia R30/8S, observamos aumento da altura total dos vilos ($F=8,18$, $p=0,003$) em comparação com 30 dias. Aos 38 dias, nos grupos 2C/R1 e 2S/R1, os peixes apresentaram alturas totais de vilos menores ($F=14,70$, $p=0,0002$,) quando comparados a 30 dias.

A porcentagem de células caliciformes (Figura 25C) reduziu aos 30 dias ($F=4,37$, $p=0,02$) na estratégia 30 (C e S), e, aos 38 dias, na estratégia 30/8 (C e S) ($F=35,16$, $p<0,001$), em relação às outras estratégias. O L-GLU aumentou as células caliciformes apenas no grupo 2S/R1 em relação ao respectivo controle (2C/R1), aos 38 dias ($F=6,43$, $p=0,03$).

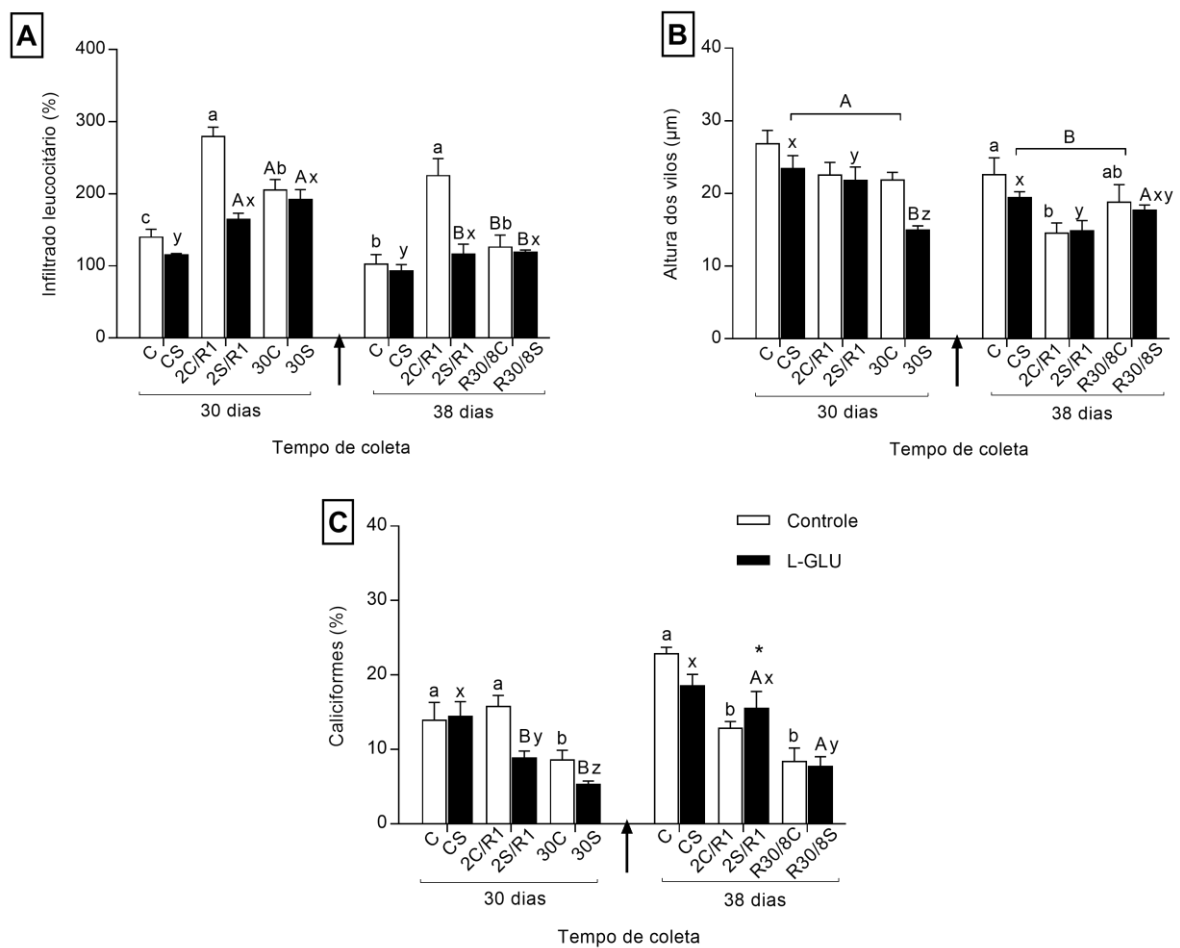


Figura 25. (A) infiltrado leucocitário (%), (B) altura das vilosidades (cm) e (C) células caliciformes (%) em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante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

3.3.8. Desempenho zootécnico

Aos 30 dias, os peixes da estratégia 2C/R1 e 2S/R1 ganharam mais peso que os continuamente alimentados (C e CS) ($F= 200,5$, $p= 0,002$), mas os peixes sob restrição alimentar mais severa (30C e 30S) perderam peso ($F=448,08$, $p<0,001$; $F= 692,43$, $p<0,001$) (Figura 26A). Após realimentação, os peixes 30C e 30S apresentaram ganho compensatório ($F=880,28$; $p<0,001$; $F=609,21$; $p<0,0001$), com ganho de peso superior ao dos outros grupos, exceto do grupo C. Aos 38 dias, os peixes dos grupos C e CS apresentaram ganho de peso, porém no grupo CS este aumento foi observado a partir de 30 dias ($F=110,88$, $p<0,001$).

Em relação ao consumo relativo de dieta (Figura 26B), aos 30 dias, os peixes dos grupos 2C/R1 e 2S/R1 apresentaram valores mais elevados que os dos grupos C e S ($F= 15,6$, $p= 0,002$). Aos 38 dias, o grupo 2C/R1 apresentou aumento do consumo ($F= 13,98$, $p= 0,001$), enquanto que no grupo 2S/1 o consumo diminuiu ($F= 15,34$, $p= 0,02$), comparados ao observado no dia 30. No grupo R30/8 (C e S), aos 38 dias, o consumo registrado não se igualou ao observado nos outros grupos ($F= 14,9$, $p= 0,001$; $F= 17,4$, $p= 0,002$).

Aos 30 dias, os peixes das estratégias C e 2C/R1 apresentaram uma pior conversão alimentar ($F=59,6$, $p<0,001$; $F=43,62$, $p<0,001$) (Figura 26C), e melhor aos 38 dias ($F=28,3$, $p<0,001$; $F=19,23$, $p<0,001$). Aos 30 dias, a estratégia 2S/R1 apresentou melhor conversão ($F=26,59$, $p<0,001$) e pior aos 38 dias ($F= 35,61$, $p<0,001$). Aos 38 dias, a CA dos grupos R30/8 (C e S) apresentaram melhor conversão alimentar ($F=13,32$, $p<0,001$, $F=42,79$, $p<0,001$), independente das dietas (controle e suplementada, quando comparadas a outras estratégias).

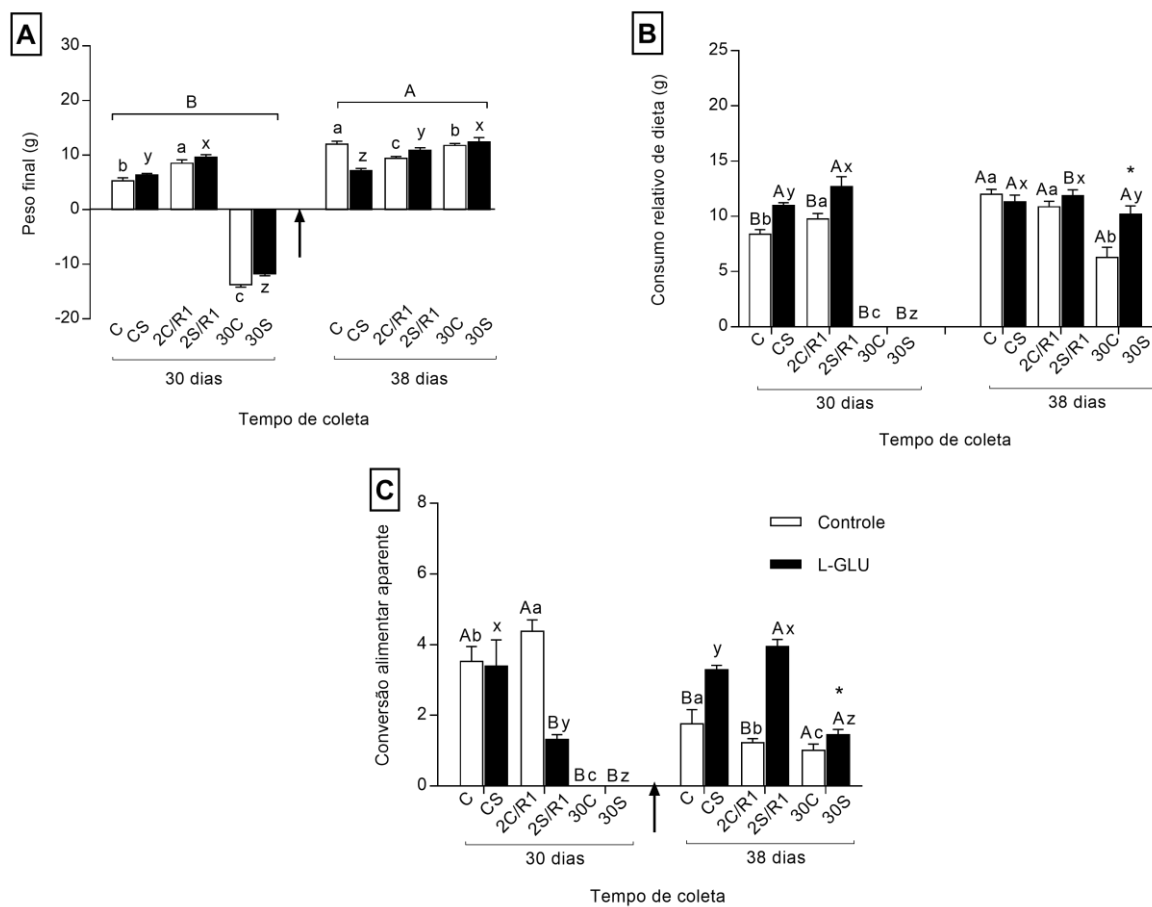


Figura 26. (A) Peso final (g); (B) consumo relativo de dieta (g) e (C) conversão alimentar aparente em pacus submetidos a estratégias alimentares sem e com ácido L-glutâmico (L-GLU) 8g/Kg. C e CS – alimentação contínua por 38 dias, 2C/R1 e 2S/R1 – alimentação por 2 dias/jejum de 1 dia durante 38 dias;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

4. Discussão

Este estudo mostrou que houve mobilização de energia frente as estratégias de restrição alimentar analisadas, e a dinâmica do sistema imune e antioxidante se ajustaram as alterações metabólicas, além de não haver danos para o desempenho e crescimento dos peixes. Entretanto, a dinâmica de alguns sistemas fisiológicos que são afetados pela mobilização e utilização energética ainda é pouco conhecida, com resultados ainda controversos, como é o caso dos sistemas imune e antioxidante, ambos de alto custo energético. Estes sistemas são destacados tendo em vista que, durante a restrição de alimentos, a sobrevivência dos peixes depende de intensa mobilização de energia a partir de reservas endógenas.

O modelo experimental de nosso estudo é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie de grande interesse por ser capaz de mobilizar suas reservas endógenas para sobreviver a períodos de privação de alimentos, sem perder a capacidade de recuperação do crescimento ao final das estratégias testadas (Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2010; Gimbo et al., 2015; Fávero et al., 2018). Em nosso estudo, observamos que, tanto em restrição alimentar por períodos curtos (1 dia alternado com dois dias de alimentação) quanto em período mais longo (15 e 30 dias), os peixes cresceram menos ou perderam peso, mas não perderam a capacidade de crescimento compensatório, após oito dias de realimentação, que no caso dos peixes que receberam suplementação de L-Glu foi maior. Ao longo de 30 dias, o consumo de alimentos foi maior nos peixes em restrição alternada em relação aos controles, enquanto a conversão alimentar foi significativamente melhor naqueles realimentados com L-Glu. A realimentação modificou este perfil, e os peixes que receberam o suplemento apresentaram valores mais altos de conversão. Estudos mostram que a utilização de diferentes estratégias alimentares pode aumentar a eficiência do aproveitamento do alimento, além de promover crescimento compensatório, como foi observado em diferentes espécies de peixes e diferentes estratégias. Pacus apresentaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar após 30 dias sem alimento e 5 dias de realimentação (Favero et al., 2018) e crescimento compensatório foi relatado em *Umbrina cirrosa* após 30 dias de jejum seguidos de 30 dias de realimentação (Hidalgo et al., 2017). Entretanto, Takahashi et al. (2010) não observaram crescimento compensatório total no pacu submetido a

ciclos de 3 dias de restrição alimentar seguidos de 3 dias de realimentação. Já, em matrinxã (*Brycon amazonicus*), houve crescimento compensatório total após ciclos de 2 dias de restrição e 3 dias de realimentação (Urbinati et al., 2014). Outros ciclos também promoveram crescimento compensatório em *Acanthopagrus latus* (2 dias restrição/ 8 dias de alimentação, 4 dias restrição/16 dias de realimentação e 8 dias restrição/32 dias de realimentação), e em *Acipenser stellatus* (7 dias de restrição/21 dias de realimentação) (Gune et al., 2019). Melhor conversão alimentar foi relatada por Adakli e Tasbozan (2015) em *Dicentrarchus labrax* que passou por 2 dias de restrição seguidos de 8 dias de alimentação. A suplementação diária com L-Glu aumentou o estoque de glicogênio nos peixes. Há poucas informações na literatura sobre o efeito do L-Glutamato em dietas de peixes. Contudo, Caballero-Solares et al. (2015) observaram que o ácido glutâmico promoveu melhoras na concentração de glicose em *Sparus aurata*, e facilitou a substituição da proteína por carboidratos da dieta.

Em relação ao perfil metabólico, o desafio dos peixes durante situações de baixa disponibilidade de alimentos é manter as funções fisiológicas, modulando a mobilização das reservas metabólicas (Bar, 2014; Li et. al., 2018). No nosso estudo, a restrição total de alimentos por 15 ou 30 dias causou redução nos níveis de glicose plasmática e a realimentação por 8 dias foi suficiente para recuperar e até mesmo superar os valores daqueles que se alimentaram diariamente. A glicose sanguínea é normalmente a variável fisiológica mais aferida em animais que passam por privação de alimentos (McCue, 2010) e reflete a capacidade homeostática do organismo em manter o fornecimento de energia para os tecidos. A redução durante a restrição é descrita em muitos estudos, com diferentes peixes e estratégias [15 dias, *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2018); 7 dias, *Hoplosternum littorale* (Rossi et al., 2015) e *Labeo rohita* (Dar et al., 2018)], embora Costas et al. (2011) e Caruso et al. (2012) não tenham encontrado diferenças nas concentrações de glicose em *Pagrus pagrus* e *Senegalese sole* alimentados todos os dias ou sob condições de jejum, respectivamente.

O glicogênio hepático foi uma das fontes de energia utilizadas nas condições mais severas de restrição, enquanto em ciclos alternados houve maior estoque desta reserva que nos peixes alimentados diariamente, sugerindo que a condição já

foi capaz de promover síntese compensatória e homeostase da glicemia neste grupo de peixes. Na maior parte das espécies, para manter a homeostase da glicose durante a primeira fase do jejum, o glicogênio é o primeiro substrato a ser mobilizado (Furné et al., 2012). Redução do glicogênio hepático também foi descrita em “gibel carp” (7, 14 e 21 dias) (Li et al., 2018), pacu (15 dias - Favero et al., 2018, e 60 dias – Souza et al., 2000) e *Dicentrarchus labrax* (14 dias) (Peres et al., 2014). Resultado semelhante ao que observamos nos peixes alternadamente alimentados também foi descrito por Takahashi et al. (2010) em pacus submetidos a ciclos de 3 dias de restrição e 3 dias de realimentação.

Em relação ao uso de lipídios como fonte de energia durante a escassez de alimentos, ele é dependente de cada espécie, da reserva presente no tecido e da estratégia que cada animal utiliza para mobilizar energia (Furné et al., 2012). Em peixes, os estoques de lipídios são encontrados no mesentério, fígado e músculos (Sheridan, 1994). Em nosso estudo, observamos redução dos níveis circulantes de triglicerídeos indicando o uso desta reserva proporcional à severidade da restrição e recuperação após realimentação. A concentração baixa de triglicerídeos indica a falta de lipídios que provém do alimento (Hung et al., 1997) e eles funcionam como substrato energético para compensar a queda nas concentrações de glicose (Perez-Jiménez et al., 2007). Segundo Peres et al. (2014), os triglicerídeos são mobilizados no início do jejum, e funcionam como marcadores da condição nutricional do animal. Alguns estudos mostram que a suplementação de glutamato aumentou o consumo alimentar e o peso corporal em *Salmo salar* L. (Oehme et al., 2010), aumentou o ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar em *Ctenopharyngodon idella* (Zhao et al., 2015), entretanto, diminuiu o crescimento em *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva et al., 2010). Em *Oncorhynchus mykiss* (Kirchner et al., 2003) não afetou o desempenho do crescimento. Nossos resultados mostram que peixes alimentados diariamente o L-Glu aumentou a ingestão de alimentos. Redução dos níveis de triglicerídeos também foi descrita em *Piaractus mesopotamicus* após 15 dias (Favero et al., 2018), 30 dias (Gimbo et al., 2015) de restrição alimentar e ciclos de restrição a cada 3 dias (Takahashi et al., 2010).

As reservas lipídicas hepáticas se mantiveram estáveis ao longo do experimento e as reservas musculares só apresentaram uma redução nos peixes

R30/8C e R30/8S, que pode ser entendido como mobilização de energia num momento em que há maior demanda para o processo de crescimento compensatório observado nesse grupo de peixes. Os peixes utilizam lipídios como principal fonte de energia para apoiar processos fisiológicos. Ao contrário dos mamíferos, eles armazenam lipídios em vários tecidos, incluindo tecido adiposo mesentérico, fígado e músculo vermelho (Sheridan, 1988). A gordura visceral acompanhou este perfil e só foi reduzida nos mesmos grupos, na realimentação, reforçando o direcionamento da energia dos lipídios musculares e viscerais para sustentar o crescimento desses peixes. Nossos dados mostram redução do lipídio visceral nos peixes que receberam o L-Glu, após realimentação, porém Caballero-Solares et al. (2015) relatam aumento de deposição da gordura visceral com a utilização do glutamato, enquanto que Zhao et al. (2015) não observaram diferenças em *Ctenopharyngodon idella*. Peres et al. (2014) também não encontraram alteração dos níveis de lipídios hepáticos, viscerais e na carcaça de *Dicentrarchus labrax*. Diferentemente, Souza et al. (2000) relataram redução das reservas de lipídios nas mesmas reservas, em pacu, após 15, 30 e 60 dias de restrição alimentar. Também em pacu, Gimbo et al. (2015) encontraram redução do lipídeo no fígado e músculo após 30 dias de restrição. Já, segundo Takahashi et al. (2010) houve aumento do lipídeo hepático e redução de lipídeo muscular e visceral após ciclos alternados de restrição e realimentação em pacu. Davis e Gaylord (2011) encontraram redução da gordura intraperitoneal após duas semanas de jejum, sem recuperação após uma semana de realimentação, em “sunshine bass”.

Caballero-Solares et al. (2015) observaram que a suplementação de glutamato para juvenis de *Sparus aurata* promoveu a síntese e retenção de lipídios, e descreveram níveis elevados na expressão gênica da acetil-CoA carboxilase, alto conteúdo de gordura corporal e aumento dos níveis de triglicerídeos sérico e hepático. Estes autores relataram, pela primeira vez, efeito significativo da suplementação de glutamato na atividade e expressão das enzimas glicolíticas em peixes. Em humanos, a suplementação de glutamato melhora o metabolismo da glicose (Di Sebastiano et al., 2013). Segundo Newsholme et al. (2003), o glutamato regula a glicólise e a lipogênese através da mediação de diferentes vias de sinalização celular. A insulina é um hormônio que desempenha um papel

fundamental na regulação do crescimento somático, na diferenciação celular durante o desenvolvimento e no metabolismo de todos os vertebrados (Hernandez-Sanchez et al., 2006). A insulina atua na síntese de lipídios, absorção de glicose, captação de aminoácidos (Caruso e Sheridan, 2011). Em nosso estudo, não medimos os níveis de insulina, entretanto glicólise aumentada, glicogênese e lipogênese em peixes alimentados com glutamato, apoiam achados associados aos efeitos da insulina descritos em peixes (Caruso e Sheridan, 2011). Geralmente, a insulina promove a absorção de ácidos graxos livres e colesterol, reduz a lipólise e aumenta a lipogênese em peixes (Perez et al., 1989).

O índice hepatossomático (IHS) indica a razão entre a massa hepática e o peso corporal, e está relacionado com o armazenamento de lipídios e glicogênio como fonte de energia no fígado (Germam e Kozlovskaya, 2001). O IHS refletiu as mudanças observadas nos níveis de glicogênio nesta pesquisa. Reduções no IHS podem estar associadas à utilização de reservas energéticas, necessários para a manutenção da homeostasia (Ranzani-paiva e tavares-dias, 2002). Observamos ação do L-Glu neste indicador, com aumento do índice aos 15 dias em peixes alternadamente restritos e após realimentação no grupo de peixes que passou pela restrição total de alimentos por 30 dias. Em carpa, Zhao et al. (2015) observaram aumento do IHS após administração do L-GLU, como em nosso trabalho. Os autores associaram o aumento à maior síntese e atividade de enzimas digestivas intestinais. Do ponto de vista metabólico, o ácido glutâmico promoveu melhoras no metabolismo hepático da glicose em *Sparus aurata* e facilitou a substituição da proteína por carboidratos da dieta (Caballero-Solares et al., 2015). Oehme et al. (2010) observaram em *Salmo salar* L. que dietas suplementadas com glutamato (0,75%), sob condições de alimentação normal, aumentaram o IHS.

O colesterol circulante apresentou valores mais elevados após 30 dias de restrição e após realimentação estes valores retornam aos valores observados nos outros grupos, e que não sofreram alterações.

De acordo com Furné et al. (2012), os níveis de colesterol plasmático de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) podem se restabelecer após a alimentação. Souza e Silva et al. (2019) observaram em *Lophiosilurus alexandri*, um peixe neotropical carnívoro, que o colesterol foi maior em estratégias de ciclos curtos de restrição

alimentar. Em juvenil de *Acipenser baerii* (esturção siberiano), o colesterol não foi afetado por diferentes estratégias (Jafari et al., 2018). A dieta suplementada com L-Glu reduziu os níveis de colesterol nos peixes que foram ciclicamente restritos, mas esse efeito só apareceu após 15 dias. Favero et al. (2018) observaram aumento das concentrações de colesterol aos 15 dias de restrição alimentar, e redução após realimentação, enquanto nenhuma alteração tenha sido observada por Li et al. (2018), em carpa, após 7 dias de restrição. Em contrapartida, Pérez-Jiménez et al. (2012) observaram em *Dentex dentex*, sob ciclos longos de restrição e realimentação, permanência de níveis baixos de colesterol mesmo após realimentação. O efeito do jejum nas concentrações de colesterol é divergente, e estudos com peixes tem apresentado diferentes respostas como aumento ou redução do colesterol ao longo da privação (Kim et al., 2014).

Em relação ao sistema imune, a imunocompetência, tanto do ponto de vista agudo quanto crônico, é um processo dinâmico e o funcionamento do sistema, tanto durante a ativação da fagocitose como na constante produção de inúmeras células e na síntese das inúmeras proteínas que o compõem, exige uma intensa mobilização de energia (Lochmiller e Deerenberg, 2000; Gimbo et al., 2015). Em nosso estudo, a atividade respiratória de leucócitos (ARL) diminuiu aos 15 dias de restrição total e tendeu ao mesmo perfil na alimentação alternada com restrição, sem efeito do L-Glu. Segundo Newsholme et al. (2003), o glutamato desempenha papel na modulação do sistema imunológico. Aos 30 dias, essa diferença desapareceu, e a ARL nos grupos citados se recuperou para valores controle. Após a realimentação, a ARL em todos os grupos continuou igual com valores inferiores aos observados aos 30 dias. Por esse indicador, observamos redução temporária na ARL (aos 15 dias) e uma resposta compensatória de recuperação aos 30 dias. A redução aos 15 dias é, provavelmente, uma estratégia de economia de energia já que nesse período os peixes perderam peso e as reservas de glicogênio estavam reduzidas. Aos 30 dias, esse quadro não se modifica, mas a recuperação compensatória pode representar uma resposta de proteção. Li et al. (2007) sugerem que o glutamato na dieta é necessário para manter um ótimo estado imunológico sob condições de imunossupressão. A redução observada aos 38 dias é possivelmente devido a outro fator que afetou todos os grupos de peixes, independente das estratégias

alimentares testadas e a suplementação com o L-Glu. Restrição de 30 dias, em pacu, causou redução na ARL, mas não impediu que os peixes aumentassem a atividade quando desafiados por *Aeromonas hydrophila* (Gimbo et al., 2015). Estudo com robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Pagellus bogaraveo*) mostrou redução da ARL em ambos os peixes, aos 31 dias de restrição alimentar (Caruso et al., 2011) diferentemente do que observamos em nosso estudo.

As estratégias alimentares e as dietas não afetaram a atividade da lisozima durante o experimento. Os dados disponíveis na literatura são ainda conflitantes quando se trata de restrição alimentar. Caruso et al. (2011) relataram maior atividade da lisozima em robalo, após 31 dias de restrição. Em *Paralichthys olivaceus*, as concentrações plasmáticas de lisozima aumentaram depois de 21 dias de privação de alimentos (Kim et al., 2014). Aumento de lisozima sérica também foi descrita por Gimbo et al. (2015) em pacu depois de 30 dias sem receber alimento. A capacidade de ajuste fisiológico à restrição alimentar para manter funções vitais durante esse período foi relatada por Gimbo et al. (2015) que mostraram que o pacu, mesmo em balanço energético negativo, após 30 dias sem alimento, foi capaz de acionar respostas imunes inatas após uma infecção bacteriana experimental.

O índice esplenossomático (IES) aumentou aos 30 dias nos peixes sob restrição total de alimento, sem efeito do L-Glu, e esse aumento pode ser associado à recuperação da ARL. Esses achados indicam ativação da produção das células neste órgão hematopoiético. Segundo Fishelson (2006), o baço de peixes teleósteos é similar ao de vertebrados, com uma separação bastante marcante entre uma polpa branca, constituída de tecido linfático, e uma polpa vermelha que contém uma rede de cordões celulares enrolados, rico em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos.

Para observar as respostas à restrição alimentar usamos também indicadores intestinais, já que este órgão agrega estruturas relacionadas ao sistema imune e digestivo, importantes para o foco de nosso estudo. Em relação ao sistema imune, o epitélio intestinal está entre os importantes órgãos de defesa imunológica (Gomez et al., 2013) e contém populações de leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos (Georgopoulou e Vernier, 1986). Destacamos, ainda, espalhadas no epitélio intestinal, as células caliciformes produtoras de muco, que contém elementos do sistema imune inato e atua como uma barreira física (Dash et

al., 2018), e lubrifica a superfície do intestino. Ainda, no epitélio intestinal, em peixes, encontram-se os enterócitos (Wilson e Castro, 2011), que participam desde a digestão de alimentos à absorção de nutrientes (Caballero et al., 2003).

Neste estudo, observamos maior infiltração leucocitária nos peixes dos grupos de ciclo curto e sob restrição total por 15 dias e nesta estratégia o L-Glu reduziu a infiltração. Aos 30 dias, esse perfil se manteve (aumento nos grupos 2C/R1 e 2S/R1 e R30C e R30S, efeito redutor do L-Glu). A realimentação igualou os valores nos grupos, em geral. Os aumentos observados indicam uma defesa imunológica neste tecido que foi provavelmente sinalizado pela ausência do alimento. O aumento no número de células inflamatórias durante restrição alimentar foi considerado uma função defensiva em outros estudos (Baeverfjord e Kroghdahl, 1996; Domeneghini et al., 2002). Em outro estudo com pacu, Castilho (2016) observou, em estratégias alimentares de ciclos curtos de restrição (6 dias de alimentação e 1 dia de jejum; alimentação por 2 dias e 1 dia de jejum), diminuição de infiltrado leucocitário em ambos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle.

A altura total das vilosidades diferiu entre estratégias, embora sem um perfil muito claro. Um dos grupos que sofreu restrição de 30 dias apresentou redução das vilosidades (R30S), mas o outro grupo semelhante não, embora os dois estivessem nas mesmas condições (sem alimento). Após 38 dias, há uma redução nos dois grupos submetidos a restrição alternada (com e sem L-Glu). Em geral, estudos com restrição alimentar em peixes relatam redução na altura das vilosidades. O jejum causou diminuição da altura da dobra intestinal em *Acipenser transmontanus* (Domeneghini et al., 2002), alterações nos enterócitos e diminuição da altura total intestinal em *Hyphessobrycon luetkenii* (Gaucher et al., 2012) e prejuízos na área superficial das vilosidades em *Silurus meridionalis* (Zeng et al., 2012).

O número de células caliciformes diminuiu, aos 15 dias, nos peixes alternadamente restritos que receberam L-Glu e aos 30 dias, no mesmo grupo e nos peixes submetidos a restrição total. A realimentação restaurou a quantidade de células nos peixes 2S/R1, mas não nos que passaram por 30 dias sem alimento, sugerindo um dano maior ao epitélio na ausência de alimento. No pacu, Castilho (2016) demonstrou que o número de células caliciformes diminuiu conforme o

período de jejum, dados encontrados também por Zeng et al. (2012) no bagre *Silurus meridionalis* demonstrando que a restrição alimentar afeta negativamente a densidade das células caliciformes. No estudo de Zeng et al. (2012), os autores comentam que a restrição alimentar prejudica as funções digestivas e absorptivas do trato gastrointestinal dos peixes.

Finalmente, o último sistema abordado em nosso estudo, que é altamente relacionado ao processo de produção de energia, é o sistema antioxidante. O funcionamento do sistema antioxidante durante estratégias de restrição alimentar em peixes é ainda pouco explorado e os dados são divergentes, mas as estratégias e os peixes modelo são bastante distintos. Efeitos da restrição alimentar podem estar ligados à produção de EROs, conhecidas por causar estresse oxidativo (Robinson et al., 1997).

As estratégias alimentares e dietas de nosso estudo causaram respostas diferenciadas nos indicadores do sistema antioxidante dos diferentes tecidos analisados. Aos 15 dias, no fígado e intestino, a atividade da superóxido dismutase (SOD) estava mais baixa nos peixes que receberam alimento alternadamente em relação ao grupo controle. Já, a atividade da catalase (CAT) hepática aumentou nos mesmos peixes, mas não se modificou no intestino. No intestino, o L-Glu reduziu a SOD no grupo CS em relação ao grupo C. Yang et al. (2019) relataram aumento da atividade da SOD e redução da atividade da CAT no fígado de *Acipenser dabryanus*, em período de até 8 semanas de restrição alimentar e afirmaram que os peixes alteraram as defesas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo induzido pela restrição. Em tempos mais curtos de restrição (8 dias), Karatas (2018) relatou redução da CAT em fígado de *Oncorhynchus mykiss*. Entretanto, aumento da atividade da CAT no mesmo tecido foi observado em *Acanthopagrus latus*, em restrição em ciclos mais curtos – F2R8 (2 dias de restrição e 8 dias de realimentação) após 80 dias (Tamadoni et al., 2020). Antonopoulou et al. (2013) mostraram em robalo sob restrição de dois meses, aumento de CAT e SOD no tecido intestinal. Em condições de restrição por 5 semanas, *Dentex dentex* apresentaram aumento da atividade da SOD e CAT hepáticas, além de aumento nos indicadores de estresse oxidativo (Morales et al., 2004). Essas diferenças sugerem a

necessidade do gasto de energia no combate ao estresse induzido pelo jejum em ciclos curtos.

Aos 30 dias, as atividades da SOD hepática e intestinal não mudaram em nenhum grupo, enquanto que a catalase (CAT) hepática diminuiu na restrição mais severa, independente da dieta. As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) seguiram o perfil da CAT, estando mais baixas nos peixes submetidos a restrição mais severa (R30C) e se elevaram após a realimentação (R30/8C e R30/8S). Atividade de enzimas antioxidantes foi avaliada durante restrição de alimento no *Sparus aurata* de 46 dias (Pascual et al., 2003) e os autores observaram, no fígado, aumento da SOD e redução da CAT em paralelo com a restrição e estresse oxidativo, indicadores que se recuperaram após realimentação. No intestino, não observamos efeito da restrição alimentar nas enzimas, mas o L-Glu reduziu as concentrações de GSH nos peixes R30S. A GSH é dependente do NADPH (Antunes-Neto, 2005) e sob condições de redução da produção de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo na atuação da GSH (Shan et al., 1990). Rossi et al. (2015) descreveram em fígado de *Hoplosternum littorale*, após 28 dias de restrição, redução na concentração de GSH e aumento da atividade da GST. Como o GST é uma enzima dependente de GSH, as mudanças no nível de GSH podem diminuir a atividade de GST (López-López et al., 2011).

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) hepática não foi afetada pela restrição, mas a realimentação reduziu a atividade nos peixes R30/8S. A realimentação elevou a atividade da SOD intestinal nos dois grupos sob restrição (2C/R1 e R30/8C) em relação ao controle, reduziu a CAT nos dois grupos de peixes sob restrição que receberam L-Glu e reduziu as concentrações de GSH no grupo alternadamente alimentado (2C/R1) em relação ao controle C. Tamadoni et al. (2019) observaram em *Acanthopagrus latus* aumento da atividade da CAT e GST no fígado, em peixes que passaram por oito dias de restrição e trinta e dois dias de realimentação. Já Pascual et al. (2003) encontraram diminuição na atividade de GST e CAT em *Sparus aurata*, sob condição de ciclos alternados e longos de restrição aos 28 dias.

Analisando os dados, observamos mudanças na resposta das enzimas dependente da intensidade da restrição alimentar e do tempo de restrição. A SOD, por exemplo, diminuiu nos dois tecidos, após 15 dias, quando a restrição foi moderada, em ciclos alternados de restrição e realimentação, mas não se alterou aos 30 dias. A CAT, ao contrário da SOD, aos 15 dias, aumentou no fígado em 2C/R1, mas não mudou no intestino. Interessantemente, a alteração da CAT foi acompanhada por alteração semelhante das concentrações de GSH. Por outro lado, a ação do L-Glu foi bastante moderada, tendo diminuído a atividade da SOD aos 15 dias nos peixes sempre alimentados.

5. Conclusões

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

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

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

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

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

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

6. Referências Bibliográficas

- Adakli A, Taşbozan O (2015). The Effects of Different Cycles of Starvation and Refeeding on Growth and Body Composition on European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 15:419-427.
- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries* 4, 147-190.
- Anderson DP, Siwicki AK (1995) **Basic haematology and serology for fish health programs**. In Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health Section. Manila: Asian Fisheries Society. p. 185-202.
- Antonopoulou E, Kentepozidou E, Feidantsis K, Rofidou C, Despoti D, Chatzifotis S (2013) Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry Physiology Part A** 165:79–88.
- Baeverfjord G, Krogdahl A (1996) Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. **Journal of Fish Diseases** 19:375–387.
- Bar N (2014). Physiological and hormonal changes during prolonged starvation in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 71:1-12.
- Barcellos LJG, Marquezzine A, Trapp M, Quevedo RM, Ferreira, D (2010) The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture** 300:23-236.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.
- Bayir A, Sirkecioglu AN, Bayir M, Haliloglu HI, Kocaman EM, Aras NM (2011) Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: oxidative stress and antioxidant defenses. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 159:191–196.
- Beutler E, Duran O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. p. 861-882.
- Beutler E (1975) **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Straton.
- Biller-Takahashi JD, Takahashi, LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology** 73:425-429.

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

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

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

Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Mancari F, Genovese L, Maricchiolo G (2011) Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) **Marine Environmental Research** 72:46-52.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

290

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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