

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado**

**Wiolene Montanari Nordi**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba  
2015**

**Wiolene Montanari Nordi**  
**Zootecnista**

**Desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **RAUL MACHADO NETO**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba**  
**2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Nordi, Wiolene Montanari

Desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado / Wiolene Montanari Nordi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.  
125 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Carnívoros 2. Onívoros 3. Proteína animal 4. Desenvolvimento tecidual  
5. Atividade enzimática 6. Morfologia intestinal I. Título

CDD 639.375  
N832d

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e admiráveis pais

*Alzira Wiolene Montanari Melo Nordi e Edson Nordi*

e ao meu irmão e família

*Cristofer Montanari Nordi*

minha base sólida, meu apoio, grande parte do meu mundo, pessoas importantíssimas que com muito carinho, amor e compreensão, apesar de sentirem muito a dor da separação, me apoiaram e continuam apoiando para que continue perseverando em meus anseios e concretize meus mais valiosos sonhos,

Ao meu admirável companheiro,

*Daniel Luiz Paulino*

pelo imenso amor, amizade, união, carinho, companheirismo, atenção, dedicação...

*Dedico*



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à **Deus** ... que me iluminou através da vida e continua me iluminando diariamente, para superar os limites impostos e buscar o crescimento.

À **minha mãe Alzira, pai Edson e irmão Cristofer** ... base sólida, grande parte do meu mundo, pessoas importantíssimas que com muito carinho, amor e compreensão, apesar de sentirem a dor da separação, me apoiaram e continuam apoiando para que eu concretize meus mais valiosos sonhos,

À **minha avó Branca, tios, primos, parentes**, que acreditam no meu sucesso,

Ao meu orientador Prof. Dr. **Raul Machado Neto**, primeiramente pela oportunidade, por acreditar e confiar em mim, pelo aprendizado, apoio irrestrito, compreensão e principalmente pelo excelente exemplo como profissional, meu sincero reconhecimento e admiração,

À **Débora Botéquio Moretti**, pela amizade, paciência, compreensão, ensinamentos, inestimável apoio e companheirismo,

À **Thaline Maíra Pachelli da Cruz**, pelos momentos de estudo, amizade, discussões e descontração,

Às estagiárias do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal – LAFA, **Maíra Maniero Rodrigues** e **Jessica Pampolini**, pelo estudo, amizade e momentos de descontração,

Ao Prof. **José Eurico Possebon Cyrino**, responsável pelo setor de Piscicultura da ESALQ/USP, pela oportunidade de trabalho em conjunto possibilitando a realização do experimento a campo e aprendizado,

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos e atenção durante o curso de doutorado,

Aos funcionários do departamento de Zootecnia, **José Luiz F. Piedade** (Zé) pela atenção e apoio, e em especial ao Júnir e Sérgio, do setor de piscicultura pelo insubstituível auxílio durante o experimento a campo,

**Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa à Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), ESALQ/USP, pelo apoio e pelo consentimento para a realização das análises de microscopia eletrônica,**

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro,**

E, finalmente, à todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

**DE CORAÇÃO,  
OS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Características do pacu e dourado.....	21
2.2 Anatomia e histologia do intestino de peixes.....	23
2.3 Processo digestivo no intestino de peixes.....	25
2.4 Colostro como suplementação protéica.....	27
2.5 IGF-I e suas ações.....	29
2.6 Indicadores de atividade celular.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Condições, tratamentos e dietas experimentais.....	37
3.2 Avaliação dos parâmetros de desempenho .....	40
3.3 Coleta de amostras.....	41
3.3.1 Amostragem de sangue.....	41
3.3.2 Tecido intestinal para microscopia eletrônica de varredura .....	41
3.3.3 Tecidos para análise enzimática, proteína total e ácidos nucleicos.....	43
3.4 Análises laboratoriais.....	44
3.4.1 Quantificação do IGF-I sérico.....	44
3.4.2 Morfologia do epitélio intestinal de juvenis de pacu.....	45
3.4.3 Atividade enzimática no tecido intestinal.....	45
3.4.3.1 Peptidases.....	45
3.4.3.2 Dissacaridases.....	46
3.4.4 Quantificação de proteína total nos tecidos entérico, hepático e muscular....	47
3.4.5 Quantificação de DNA total nos tecidos entérico, hepático e muscular.....	48
3.4.6 Quantificação de RNA total nos tecidos entérico, hepático e muscular.....	49
3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PACU.....	51
4.1 Parâmetros de desempenho do pacu.....	51
4.2 IGF-I sérico no pacu.....	54



4.3 Morfologia do epitélio intestinal de juvenis de pacu.....	57
4.4 Atividade enzimática no tecido intestinal do pacu.....	69
4.5 Concentração de proteína total, DNA e RNA total nos tecidos intestinal, hepático e muscular do pacu.....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – DOURADO.....	81
5.1 Parâmetros zootécnicos do dourado.....	81
5.2 IGF-I sérico no dourado.....	82
5.3 Morfologia do epitélio intestinal de juvenis de dourado.....	84
5.4 Atividade enzimática no tecido intestinal do dourado.....	93
5.5 Concentração de proteína total, DNA e RNA total nos tecidos intestinal, hepático e muscular do dourado.....	95
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
7 CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	107

## RESUMO

### **Desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado**

O fornecimento de colostro bovino liofilizado (CBL), fonte alternativa de proteína, foi avaliado como um ingrediente inovador na nutrição de peixes. A influência desta secreção láctea foi estudada sobre o desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) juvenis, utilizando-se análises da concentração sérica de IGF-I, o estudo da estrutura morfológica e atividade enzimática no intestino e, os indicadores de atividade celular nos tecidos entérico, hepático e muscular. Os pacus ( $8,5 \pm 0,7\text{g}$ ;  $7,7 \pm 0,3\text{cm}$ ) e dourados ( $13,3 \pm 0,9\text{g}$ ;  $10,8 \pm 0,3\text{cm}$ ), foram distribuídos num delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2, constituindo-se de três dietas com inclusão de CBL (0%, 10% e 20%) e dois períodos experimentais (30 e 60 dias). Para os indicadores de desempenho no pacu, houve interação para ganho de peso (GP) e conversão alimentar aparente (CAA) ( $P < 0,05$ ). Os valores de GP, para 10 e 20% de CBL, não diferiram do 0% de CBL, indicando que as dietas foram adequadas e atenderam as necessidades nutricionais dos juvenis. Maior índice de conversão alimentar foi encontrado com 10% de CBL, aos 60 dias. A concentração de IGF-I não diferiu entre as dietas nas duas espécies, contudo, foi maior no dourado aos 60 dias ( $P < 0,05$ ). A morfologia do epitélio intestinal de pacu e dourado juvenis não foi alterada pelo fornecimento de CBL, entretanto, observaram-se diferenças entre os segmentos intestinais. A atividade da enzima aminopeptidase N foi maior nos pacus alimentados com 10% e 20% de CBL ( $P < 0,05$ ); a atividade das peptidases e dissacaridases foi menor aos 60 dias; exceto para aminopeptidase A, que apresentou elevada atividade neste mesmo período. No dourado, apenas houve diferença para aminopeptidase A, que foi menor aos 60 dias ( $P < 0,05$ ). Com relação aos indicadores de atividade celular, no intestino de pacu, a relação proteína total (PT)/RNA foi menor aos 30 dias. No fígado de dourado houve interação entre dieta e período para DNA, sendo maior nos peixes alimentados com 20% de CBL, aos 60 dias. No músculo de pacu PT/RNA foi maior com 10% de CBL; RNA, PT/DNA e RNA/DNA menor aos 60 dias, enquanto DNA e PT/RNA, maior neste mesmo período. No músculo do dourado, RNA e RNA/DNA, foram menores aos 60 dias e, PT/RNA, maior neste mesmo período ( $P < 0,05$ ). Considerando os aspectos estudados para avaliar as consequências do fornecimento de colostro bovino para pacu e dourado juvenis, observou-se que foram mantidas inalteradas a plasticidade e atividade das enzimas no epitélio intestinal e a atividade celular nos tecidos entérico, hepático e muscular. Esta condição sugere a possibilidade de uso desta secreção láctea na nutrição dos peixes estudados.

Palavras-chave: Ictiófagos; Onívoros; Proteína animal; Desenvolvimento tecidual; Atividade enzimática; Morfologia intestinal



## ABSTRACT

### **Enteric, liver and muscle tissues development of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) and dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) juveniles fed diet containing lyophilized bovine colostrum**

The supply of lyophilized bovine colostrum (LBC), alternative protein source, has been evaluated as an innovative ingredient in fish nutrition. The milk secretion influence was studied on enteric, liver and muscle tissues development of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and dourado (*Salminus brasiliensis*), using analysis of serum IGF-I concentration, morphological structure study and enzyme activity in intestine, as well as the responses of cellular indicators in enteric, liver and muscle tissues. Juveniles of pacu ( $8.5 \pm 0.7\text{g}$ ;  $7.7 \pm 0.3\text{cm}$ ) and dourado ( $13.3 \pm 0.9\text{g}$ ;  $10.8 \pm 0.3\text{cm}$ ) were distributed in a completely randomized design in a factorial scheme  $3 \times 2$ , constituting of three diets with LBC inclusion (0, 10 or 20%) and two experimental periods (30 or 60 days). The performance indicators in pacu, interaction between diet and period was observed to weight gain (WG) and feed conversion rate (FCR) ( $P < 0.05$ ). GP values in 10 and 20% LBC did not differ from the values of 0% LBC, indicating that the diets were adequate and met the nutritional needs of the juveniles. Higher FCR was found with 10% LBC at 60 days. IGF-I concentration did not differ between diets in both species, but was higher in dourado at 60 days ( $P < 0.05$ ). The pacu and dourado intestinal epithelium histomorphometry, was not altered by the LBC supply, however, there were differences between intestinal segments. The enzyme activity of aminopeptidase N was higher in pacu fed 10% and 20% of LBC ( $P < 0.05$ ); the activity of peptidases and disaccharidases was lower at 60 days; except for aminopeptidase A which showed high activity in this period. In the dourado, was difference only to aminopeptidase A, which was lower at 60 days ( $P < 0.05$ ). Regarding the indicators of cellular activity, in intestine of pacu, total protein (TP)/RNA ratio was lower at 30 days. In liver of dourado, there was interaction between diet and period for DNA, being higher in fish fed 20% LBC, at 60 days. In muscle of pacu, TP/RNA was higher with 10% LBC; RNA, TP/DNA and RNA/DNA ratio lower at 60 d, while TP and DNA/RNA ratio increased during the same period. In muscle of dourado, RNA and RNA/DNA were lower at 60 days and, TP/RNA higher in the same period ( $P < 0.05$ ). Considering the aspects studied to evaluate the effects of bovine colostrum for juvenile pacu and dourado, it was observed that were kept unchanged the plasticity and enzymes activity in intestinal epithelium and cellular activity in enteric, liver and muscle tissues. This condition suggests the possibility of using this milk secretion in nutrition of fish studied.

**Keywords:** Carnivores; Omnivores; Animal protein; Tissue development; Enzymatic activity; Intestinal morphology



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fotografia do pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> , Holmberg 1887).....	21
Figura 2-	Fotografia do dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> , Cuvier 1816).....	22
Figura 3-	Cavidade abdominal aberta para visualização dos órgãos internos (A) e trato gastrintestinal de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) com os segmentos intestinais distendidos (B).....	42
Figura 4-	Segmentos intestinais de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) distendidos em placas de petri.....	42
Figura 5-	Secção medular (A); cavidade abdominal aberta e retirada dos órgãos internos (B) e; segmentos intestinais distendidos dos juvenis de dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ) (C) .....	43
Figura 6-	Ganho de peso de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta.....	52
Figura 7-	Conversão alimentar aparente de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta.....	52
Figura 8-	Segmentos intestinais de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ).....	59
Figura 9-	Intestino médio, segmento S1 de juvenis de pacu: (A) dobras contínuas (linhas) e em anastomose (retângulo); (B) dobras com superfície apical arredondada (linhas). Barra= 200µm.....	59
Figura 10-	Intestino médio, segmento S2 de juvenis de pacu, dobras altas contínuas, com proeminências na superfície apical, intercaladas por uma ou duas camadas de dobras mais baixas (setas) com alturas e conformações desuniformes e em anastomose (retângulo). Barra= 200µm.....	60
Figura 11-	Reto de juvenis de pacu caracterizado por um emaranhado de dobras desuniformes e superfícies apicais predominantemente lisas. Barra= 300µm.....	60
Figura 12-	(A) e (B) Dobras altas, em anastomose e complexas no intestino médio, segmento S1 e S2, respectivamente; (C) dobras baixas e menos complexas no reto de juvenis de pacu. Barra= 200µm.....	61
Figura 13-	Sulcos longitudinais (setas brancas) e transversais (setas amarelas)	

	na porção apical das dobras do S1 (A), reto (B) e S2 (C) e (D) juvenis de pacu. Barra= 200µm.....	62
Figura 14-	Processo de extrusão celular no intestino médio de juvenis de pacu. Barra= 20µm.....	65
Figura 15-	Intestino médio de juvenis de pacu, (A) enterócitos colunares, barra= 10µm; (B) proeminente camada de microvilosidades (seta). Barra= 20µm.....	65
Figura 16-	Reto de juvenis de pacu, (A) célula caliciforme expelindo muco (seta) no intestino médio, barra=20 µm; (B) caliciformes espalhadas pela superfície externa (setas), barra= 100µm.....	66
Figura 17-	Intestino médio de juvenis de pacu, apresentando células bastonetes isoladas ou aglomeradas. Barra= 20µm.....	66
Figura 18-	Intestino médio de juvenis de pacu: (A) e (B) vacúolos de absorção (setas); (B) célula de defesa (círculo). Barra= 20µm.....	67
Figura 19-	Parasitas no intestino médio de juvenis de pacu (A), (B) e (C), barra= 20 µm; (D), barra= 10 µm; (E) e (F), barra= 5µm; (G) e (H), barra=2µm.....	68
Figura 20-	Segmentos intestinais de juvenis de dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ).....	84
Figura 21-	Intestino médio, segmento S1 de juvenis de dourado, (A) dobras contínuas e em anastomose (retângulo); (B) dobras contínuas intercaladas por uma ou mais camadas de dobras mais baixas com protuberâncias arredondadas (setas brancas); (C) dobras contínuas ramificadas (linhas). Barra= 200µm.....	87
Figura 22-	Intestino médio, segmento S2 de juvenis de dourado, (A) dobras altas, contínuas (linha amarela) e em anastomose (retângulo), intercaladas por uma ou mais camadas de dobras mais baixas com protuberâncias arredondadas; (B) e (C) dobras contínuas ramificadas (linhas azuis). Barra= 300µm.....	87
Figura 23-	Intestino posterior de juvenis de dourado, composto por dobras altas, contínuas e desorganizadas, com avantajadas protuberâncias na superfície apical. Barra= 300 µm.....	88
Figura 24-	Dobras estruturalmente semelhantes compondo o epitélio intestinal:	

	(A) dobras presnetes no S1; (B) dobras presentes no S2; (C) dobras presentes no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 100µm.....	89
Figura 25-	(A) e (B) Sulcos longitudinais superficiais na porção apical das dobras (setas) e sulcos transversais pronunciados na porção basal das dobras no intestino médio (setas); (C) e (D) sulcos profundos (retângulo e setas) nas dobras do intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 100µm.....	90
Figura 26-	Processo de extrusão celular no intestino médio de juvenis de dourado. Barra= 20µm.....	90
Figura 27-	Intestino médio de juvenis de dourado, enterócitos colunares e camada de microvilosidades (setas). Barra= 10µm.....	91
Figura 28-	Células caliciformes presentes no epitélio do intestino médio de juvenis de dourado. Barra= 10µm.....	91
Figura 29-	Células bastonetes (setas) e vacúolos de absorção (círculos) no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 10µm.....	92
Figura 30-	Células de defesa (setas) infiltradas entre os enterócitos do intestino médio (A) e intestino posterior (B); vacúolos de absorção (círculo) e microvilosidades (seta) (C) no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 10µm.....	92
Figura 31-	Concentração de DNA no fígado de juvenis de dourado alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	98





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Bromatologia do colostro bovino liofilizado utilizado para a composição das refeições fornecidas aos juvenis de pacu.....	38
Tabela 2-	Composição química da dieta fornecida aos juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) contendo colostro bovino liofilizado (CBL).	39
Tabela 3-	Composição química da dieta fornecida aos juvenis de dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ) contendo colostro bovino liofilizado (CBL).....	40
Tabela 4-	Desempenho individual (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de pacu alimentados com dietas contendo 0%, 10% e 20% de colostro bovino liofilizado (CBL), aos 30 e 60 dias experimentais.....	52
Tabela 5-	Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) de juvenis de pacu (média $\pm$ erro padrão) alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	54
Tabela 6-	Atividade enzimática intestinal (U/grama de tecido) (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	70
Tabela 7-	Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no intestino de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais.....	74
Tabela 8-	Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no fígado de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais.....	75
Tabela 9-	Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no músculo de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais.....	76
Tabela 10-	Desempenho individual (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de dourado alimentados com dietas contendo 0%, 10% e 20% de colostro bovino liofilizado (CBL), aos 30 e 60 dias experimentais.....	81

Tabela 11- Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) de juvenis de dourado (média $\pm$ erro padrão) alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	83
Tabela 12- Atividade enzimática intestinal (U/grama de tecido) (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	93
Tabela 13- Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no intestino de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	96
Tabela 14- Concentração de proteína total, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no fígado de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	97
Tabela 15- Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média $\pm$ erro padrão) no músculo de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente a aquicultura vem apresentando expressivo crescimento, passando de 52,5 milhões de toneladas produzidas em 2008 para 59,9 milhões de toneladas em 2013, conforme relatório da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, 2010, 2013). No Brasil percebe-se esta mesma tendência de expressividade, pois apresentou crescimento produtivo relativo de 43,8% entre os anos de 2007 e 2009 e, elevação de 39,8% no consumo *per capita* de produtos aquícolas entre 2003 e 2009 (BRASIL, 2013). Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, o consumo de pescados no Brasil alcançou 11,2 Kg por habitante no ano de 2011, quantidade próxima à média mínima recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 12 kg por habitante/ano (BRASIL, 2013).

No Brasil, o aumento na produção de pescados de água doce em confinamento está relacionado, em grande parte, ao vasto potencial para o desenvolvimento dessa atividade. Além de possuir a maior bacia hidrográfica do mundo, a Amazônica, o país apresenta incomparável disponibilidade de espécies nativas e exóticas, clima predominantemente tropical, autossuficiência na produção de grãos, mão de obra abundante e crescente demanda interna por carne mais saudável para consumo (CRESCÊNCIO, 2005; OSTRENSKY; BOEGER; CHAMMAS, 2007). Perante um mercado consumidor cada vez mais exigente por qualidade do pescado, faz-se necessária a organização e fortificação da cadeia produtiva, instalação de programas de incentivo para a produção em propriedades rurais, estabelecimento de padrões de qualidade para os produtos e criação de laboratórios oficiais para certificar a qualidade do pescado, visando o mercado para exportação, importação e consumo interno (FAO, 2013; BRASIL, 2013; VALENTI, 2008).

Nas criações animais intensivas, os gastos com alimentação são elevados, principalmente em função do elevado custo da fração protéica em relação aos demais ingredientes utilizados na alimentação. Com base nisso, a busca por ingredientes protéicos que sejam, ao mesmo tempo, de alta qualidade, custo reduzido e de boa disponibilidade no mercado, faz-se importante economicamente. A primeira secreção láctea bovina, o colostro, uma rica fonte de proteína e componentes biologicamente ativos, tem sido relacionado à melhoria

na nutrição, proteção imunológica e desenvolvimento dos tecidos corporais em mamíferos (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; BÜHLER et al., 1998; PANDEY et al., 2011). Para peixes em crescimento, a utilização do colostro pode ser considerada potencialmente viável em função da facilidade de obtenção do excedente de produção pela vasta bacia leiteira no Brasil, custo reduzido e alta qualidade. Adicionalmente, o processo de liofilização do colostro e incorporação à ração peletizada, vem agregar benefícios, pois conserva as características químicas e organolépticas originais desta secreção.

Foi estudada de forma inédita, a influência do colostro bovino liofilizado (CBL), fonte parcial de proteína na ração de pacu e dourado juvenis, sobre o desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) juvenis. Para tal, foram utilizadas análises da concentração sérica de IGF-I, o estudo da estrutura morfológica e atividade enzimática no intestino e, indicadores de atividade celular nos tecidos entérico, hepático e muscular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características do pacu e dourado

Entre as espécies nativas neotropicais de água doce com importância econômica aos ecossistemas brasileiros destacam-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o dourado (*Salminus brasiliensis*). Estes são peixes endêmicos explorados comercialmente em função de seus desejáveis potenciais zootécnicos, apreciável qualidade da carne e aceitação pelos consumidores (OSTRENSKY; BORGHETTI, 2002; SAMPAIO-OLIVEIRA; CONTE; CYRINO, 2004; URBINATI; GONÇALVES, 2010). Diante destas premissas e, aliado ao fato de possuírem diferentes hábitos alimentares com respostas fisiológicas distintas, estas espécies tornam-se importantes modelos biológicos para estudo.

O pacu, pertence à ordem *Characiformes*, família *Characidae*, subfamília *Serrasalminae*, gênero *Piaractus*, espécie *P. mesopotamicus*. É uma espécie amplamente distribuída no território brasileiro e encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (BICUDO, 2008; GODOY, 1975) (Figura 1). Por possuir hábito alimentar onívoro com forte tendência a herbívoro, alimenta-se em meio natural, de uma ampla gama de frutos, detritos orgânicos, crustáceos, moluscos e pequenos peixes. Aproveita uma grande variedade de alimentos e apresenta dieta diversificada, conforme região e época do ano.



Figura 1 – Fotografia do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887)

O dourado pertence à ordem *Characiformes*, família *Characidae*, subfamília *Salmininae*, gênero *Salminus*, espécie *S. brasiliensis* (STREIT, 2006) (Figura 2). Atualmente foram descritas três espécies do gênero *Salminus*: *Salminus affinis*, *Salminus hilarii* e *Salminus brasiliensis*. A última espécie possui o maior potencial para piscicultura, em função do seu rápido desenvolvimento e crescimento, boa conversão alimentar, elevado preço de mercado e demanda para a pesca esportiva (CRESCÊNCIO, 2005; WEINGARTNER; ZANIBONI-FILHO, 2005). O dourado ocupa atualmente o topo da cadeia alimentar, possui alto valor na ictiofauna brasileira e, encontra-se geograficamente distribuído nas bacias dos rios Paraguai e Pantanal Mato-Grossense, Rio Grande, Paraná, Prata e do Rio São Francisco (BRAGA et al., 2007; FRACALOSSO et al., 2004).

Larvas ou juvenis de dourado são predadores ictiófagos generalistas, capazes de predação uma ampla gama de alimentos de origem animal, enquanto os adultos predam apenas peixes, sendo denominados ictiófagos ou piscívoros por excelência (DAIRIKI, 2009; FRACALOSSO et al., 2004). A preferência alimentar torna elevado seu custo de produção, pois exige dietas com altos teores de proteína (> 40%), a qual é considerada a fração de mais elevado custo da dieta (DELLA FLORA et al., 2010; SCHÜTZ; NUÑER, 2007).



Figura 2 - Fotografia do dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816)

Apesar de haver diversas pesquisas envolvendo estas duas espécies cultivadas (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007; ABREU et al., 2009; BALDAN, 2008; BICUDO; SADO; CYRINO, 2009a, 2009b; COSTA, 2007; CYRINO et al., 2010; FERNANDES; CARNEIRO; SAKOMURA, 2001; HONORATO et al., 2010), o sucesso da produção intensiva depende de estudos adicionais relacionando respostas fisiológicas às exigências nutricionais, sanidade, predisposição a doenças, condições de bem-estar e comportamento.

## 2.2 Anatomia e histologia do intestino de peixes

Entre os teleósteos existem variações anatômicas e histológicas marcantes no trato gastrintestinal (TGI), que por suas intrigantes particularidades e importância para o crescimento do peixe, vem sendo alvo de estudos (ALBRECHT; FERREIRA; CARAMASCHI, 2001; BECKER et al., 2010; RAŠKOVIĆ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009).

Os teleósteos possuem diferentes hábitos alimentares e são classificados conforme a preferência alimentar e dieta consumida em carnívoros, herbívoros e onívoros. As preferências alimentares definem características morfológicas e fisiológicas espécies-específicas, inclusive pH do estômago, morfologia e atividade das enzimas intestinais (CYRINO et al., 2010). O tipo de alimento ingerido pelos peixes, juntamente a anatomia externa e interna, como a posição da boca, dentes, rastros branquiais, estômago e intestino, podem remeter a importantes informações sobre o hábito alimentar de cada espécie (BECKER et al., 2010; FUGI; AGOSTINHO; HAHN, 2001). A percepção anatomohistológica do trato gastrintestinal quando antecede o entendimento do mecanismo de internalização de nutrientes pelo epitélio torna mais fácil o entendimento dos importantes processos absorptivos.

O intestino dos peixes apresenta variações, em especial no que se refere à estrutura anatômica e ao comprimento, intimamente correlacionados com o tipo, tamanho e valor nutricional dos alimentos ingeridos (FUGI; AGOSTINHO; HAHN, 2001; REIFEL; TRAVILL, 1978). Sabe-se que espécies de peixes herbívoros e detritívoros possuem intestinos mais longos e estreitos do que os carnívoros (BECKER et al., 2010; FUGI; AGOSTINHO; HAHN, 2001). Esta diferença pode ser comprovada através da medida do comprimento relativo do intestino (CRI), que leva em consideração o comprimento do intestino médio e reto em relação ao comprimento corporal. Nos carnívoros o CRI varia entre 0,2 a 2,5, nos onívoros entre 0,6 e 8,0 e nos herbívoros de 0,8 a 15,0 (ALBRECHT; FERREIRA; CARAMASCHI, 2001; SEIXAS FILHO et al., 2000, 2001).

O tubo digestivo dos peixes é dividido, anatomicamente, em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Segundo Bertin (1958), o intestino anterior compreende o esôfago e estômago; o intestino médio é representado pelo intestino propriamente dito, o qual se inicia na válvula pilórica ou região dos cecos pilóricos; e intestino posterior ou reto, é o segmento final do aparelho



digestivo, que se inicia após a interrupção da valva íleo-retal ou após um curto trajeto dorsiventrocaudal e desemboca no ânus. O intestino médio pode ser ainda subdividido em segmentos, ou alças, sendo S1 ou cranial, S2 ou intermediário e S3 ou distal (BERTIN, 1958; RODRIGUES; MENIN, 2008).

O intestino é composto, histologicamente, por quatro camadas de tecido sendo mucosa, submucosa, túnica muscular e serosa. O sistema digestivo é composto por tecido muscular revestido por uma membrana mucosa em forma de dobras e convoluções, que aumentam a superfície de absorção e refletem as diferentes funções de cada compartimento (ALBRECHT; FERREIRA; CARAMASCHI, 2001; BANAN KHOJASTEH et al., 2009).

Os diferentes segmentos que formam o intestino médio (S1, S2 e S3) e o intestino posterior, possuem características estruturais diversificadas, não sendo possível, por vezes, estabelecer um padrão para a histologia do intestino (ALBRECHT; FERREIRA; CARAMASCHI, 2001; CINAR; SENOL, 2006; FACCIOLI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2009; SEIXAS FILHO et al., 2001). O arranjo das dobras intestinais relaciona-se a quantidade e velocidade de transporte do alimento pelo intestino (SEIXAS FILHO et al., 2001).

Nos teleósteos, normalmente são encontrados, compondo as dobras da mucosa intestinal, dois tipos de células, os enterócitos e as células caliciformes. Os enterócitos, também conhecidos como células absorptivas, são células epiteliais cilíndricas que apresentam na porção apical uma camada de microvilosidades. As células caliciformes, especializadas na produção de muco comportam em seu interior grânulos de mucinas que quando exocitadas para o lúmen intestinal possuem, além da habilidade de se ligar às células constituintes da microbiota bacteriana, a possibilidade de aderir-se a patógenos invasores do organismo (ASCENCIO et al., 1998). Normalmente, maior quantidade destas células secretórias é encontrada na presença de patógenos invasores (CORFIELD et al., 2001; DEPLANCKE; GASKINS, 2001). A última porção do intestino, em diferentes espécies de animais, tem apresentado maior número de células caliciformes (CRUZ et al., 2014; MACHADO-NETO et al., 2013; NORDI et al., 2013). Adicionalmente aos tipos celulares comumente encontrados, compondo o epitélio intestinal de peixes, existe um tipo celular denominado *rodlet cells* ou células bastonetes. Estas, ainda são pouco conhecidas e exploradas no meio científico, contudo pesquisas vêm sendo realizadas para seu melhor

entendimento (DEZFULI et al., 2013; LAURÀ et al., 2012; MANERA; DEZFULI, 2004; REITE; EVENSEN, 2006). Em sua revisão Manera e Dezfuli (2004), trazem um breve histórico das células bastonetes, sendo interpretadas inicialmente por Thelohan em 1892, como parasitos em função da semelhança estrutural entre ambos. Atualmente, são caracterizadas como unidades glandulares endógenas presentes apenas em tecidos dos teleósteos, principalmente no epitélio do trato gastrintestinal e das brânquias (DEZFULI et al., 2013; REITE; EVENSEN, 2006). Suas funções específicas ainda não são completamente entendidas, contudo, supõe-se atuar como mecanismo de defesa inato, não específico, em função do considerável aumento na quantidade quando o peixe está parasitado (DEZFULI et al., 2013; LAURÀ et al., 2012; MANERA; DEZFULI, 2004; REITE; EVENSEN, 2006). Ainda, sugere-se possível utilização destas células como marcadores biológicos, pois aparecem com alta frequência nos tecidos epiteliais das brânquias e intestino após submissão à condição de estresse (MANERA; DEZFULI, 2004).

Células bastonetes foram verificadas por microscopia óptica e eletrônica no intestino de peixes (ARELADO; STORCH; SARASQUETE, 2002; BORGES et al., 2010; DEZFULI et al., 2013; LAURÀ et al., 2012; REZENDE et al., 2013; SCHMACHTENBERG, 2007). Na garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) foram encontradas inclusões citoplasmáticas na forma de bastões, no interior das células e a liberação de grânulos para a luz do tubo digestivo por microscopia óptica (BORGES et al., 2010). Utilizando-se a transmissão, pesquisadores encontraram células com formato oval e alongado, contendo uma cápsula fibrosa e núcleo condensado na posição basal. No interior das células estava presente retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e aparelho de Golgi. Laurà et al. (2012), ainda pôde verificar diferentes estágios de maturação destas células.

### **2.3 Processo digestivo no intestino de peixes**

Nos teleósteos, as características histológicas e estruturais das células absorptivas do intestino médio estão associadas, além da osmorregulação, à absorção de nutrientes menores após a digestão enzimática (monossacarídeos, aminoácidos e lipídios) por difusão, enquanto nos segmentos intestinais posteriores são carregadas unidades nutricionais maiores, por pinocitose

(ABAURREA-EQUISOAÍN; OSTOS-GARRIDO, 1996; GEORGOPOULOU et al., 1988; KROGDAHL et al., 2003; OSTASZEWSKA et al., 2005).

Em mamíferos, o transporte de macromoléculas do colostro ocorre através de um processo de absorção não seletivo pela membrana apical dos enterócitos fetais apenas nos primeiros dias de vida, quando surge uma nova geração de células, tipo adultas, impermeáveis a estas moléculas, processo denominado fechamento intestinal (BESSI et al., 2002a, 2002b; MACHADO-NETO et al., 2011; MORETTI et al., 2014a; NORDI et al., 2012; SKRZYPEK et al., 2007). Nestes animais, os enterócitos fetais são vacuolados e possuem um sistema de canalículos apicais constituído por vacúolos citoplasmáticos de diferentes tamanhos (MORETTI et al., 2013; SKRZYPEK et al., 2007). O epitélio intestinal dos teleósteos, diferente dos mamíferos, possui condições diferenciadas de permeabilidade, pois o processo pinocítico persiste até à fase juvenil e adulta, com variação entre as espécies e durante as fases da vida (BARBIERI; HERNANDEZ-BLASQUEZ, 2002; GEORGOPOULOU et al., 1988; STROBAND; van der VEEN, 1981). A absorção das macromoléculas por pinocitose ocorre através de um mecanismo de penetração de fluidos na célula e formação de invaginações na membrana celular da porção apical dos enterócitos intestinais e conseguinte formação de um massivo acúmulo de vesículas e vacúolos citoplasmáticos de absorção (BARBIERI; HERNÁNDEZ-BLASQUEZ, 2002; SCHEP et al., 1999).

Estudos utilizando ferritina, como modelo de macromolécula protéica eletrondensa, verificaram que as proteínas são encontradas nas vesículas pinocíticas nos enterócitos, as quais passam inespecificamente pelo epitélio, principalmente na segunda porção do intestino do curimbatá (*Prochilodus scrofa*) e da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (BARBIERI; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, 2002; STROBAND; van der VEEN, 1981). Ao utilizar a proteína *horseradish* peroxidase (HRP) para truta (*Oncorhynchus mykiss*) com peso corporal entre 150-250 g, foi verificado que após a internalização da peroxidase pelos enterócitos, em torno de 6% alcançou a corrente sanguínea (GEORGOPOULOU et al., 1988). Segundo os autores, o máximo de HRP detectada foi após 12 horas da utilização, presente em invaginações da membrana plasmática na base das microvilosidades, vesículas formadas na membrana apical e no espaço intercelular após serem excitadas.

O adequado processo de digestão e absorção de nutrientes pelo trato gastrintestinal é dependente do contato do alimento com as enzimas digestivas extracelulares e intracelulares presentes no trato digestivo. Desde o primeiro dia após eclosão, mesmo antes do início da alimentação exógena, são encontradas enzimas digestivas nos teleósteos (KUZ'MINA, 1996; TENGJAROENKUL et al., 2002; ZOUITEN et al., 2008). A produção enzimática é variável e influenciada pelo tamanho do intestino, fase do desenvolvimento e alimento consumido (GIRI et al., 2000; HAKIN et al., 2006; HARPAZ; UNI, 1999; KROGDAHL et al., 2003; KUPERMAN; KUZ'MINA, 1994; ZAMBONINO INFANTE; CAHU; PERES, 1997). Após uma fase inicial, ocorre um processo de maturação do epitélio intestinal, caracterizado pela diminuição das enzimas citosólicas concomitantemente com o aumento das enzimas de superfície (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 1995; ZAMBONINO-INFANTE; CAHU, 2007; ZOUITEN et al., 2008). Após este período de transição, ocorre variação enzimática normal no intestino de peixes nas fases subsequentes (KUZ'MINA, 1996).

O estudo histológico do epitélio intestinal, juntamente ao entendimento das enzimas presentes no epitélio intestinal, considerados indicadores de condição fisiológica, faz-se relevante quando se pretende a incorporação de dieta adequada para cada fase do desenvolvimento nos peixes.

#### **2.4 Colostro como suplementação protéica**

O colostro, primeira secreção láctea produzida pelos mamíferos, é uma mistura de secreções produzidas pela glândula mamária e elementos oriundos do soro sanguíneo principalmente proteínas como as imunoglobulinas (FOLEY; OTTERBY, 1978; JEFFCOTT, 1972; PANDEY et al., 2011; PENCHEV GEORGIEV, 2008). A primeira secreção láctea difere do leite, pois apresenta elevadas concentrações de nutrientes essenciais, imunoglobulinas e fatores biologicamente ativos (BÜHLER et al., 1998; BLUM; BAUMRUCKER, 2002; HAMMOM; BLUM, 2002; PENCHEV GEORGIEV, 2008).

Os mamíferos, ao nascerem apresentam pouca ou nenhuma proteção específica (ARGÜELLO et al., 2004; LIMA et al., 2013), em função das barreiras placentárias que separam a circulação sanguínea materna da fetal, dificultando a passagem de anticorpos maternos durante a gestação. Com isso, faz-se de extrema necessidade o consumo do colostro nas primeiras horas de vida, em

função da presença de elevada concentração de imunoglobulinas nesta secreção, conferindo assim proteção imunológica ao recém-nato (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; BÜHLER et al., 1998; PENCHEV GEORGIEV, 2008). Em peixes, os componentes imunes de uma fêmea imunocompetente são, da mesma forma que nos ruminantes, transferidos para seus descendentes, contudo, através do saco vitelino (SWAIN; NAYAK, 2009).

As principais imunoglobulinas presentes no colostro bovino são IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, sendo que, em ruminantes, a IgG, que perfaz mais de 80% da imunoglobulinas do colostro, é priorizada no processo de transferência (CAMPBELL et al., 1977; PENCHEV GEORGIEV, 2008). Em peixes, a principal imunoglobulina responsável pela proteção específica humoral transferida de origem materna é a IgM, processo que permanece até o final da absorção do saco vitelínico (SWAIN; NAYAK, 2009).

A utilização de colostro bovino como suplemento alimentar tem sido estudado em humanos (CHEN et al., 2014; MARCHBANK et al., 2011; STEFANI et al., 2014), em outras espécies de animais (FENGER et al., 2014; MORETTI et al., 2012a, 2012b, 2014a; PAULETTI et al., 2007c; PANDEY et al., 2011) e, recentemente, em peixes por nosso grupo de pesquisa (MORETTI et al., 2014b, CRUZ et al., 2014; RODRIGUES et al., 2009, 2010). O fornecimento desta secreção láctea incluída em peletes de ração para pacu e dourados juvenis não determinou alterações negativas significativas na fisiologia entérica indicando-a como passível de uso para peixes em função da elevada qualidade protéica (CRUZ et al., 2014; MORETTI et al., 2014b).

O colostro bovino acrescentado à dieta de peixes pode contribuir nutricionalmente como fonte protéica alternativa e complementar a outras fontes de proteína normalmente utilizadas na nutrição de peixes. Esta secreção possui alta concentração de proteína bruta, variando entre 15,7 e 31,3%, além das gorduras, minerais e vitaminas (FOLEY; OTTERBY, 1978; HADJIPANAYIOTOU, 1995; MORETTI et al., 2010). Adicionalmente, o colostro está envolvido com a promoção da saúde em função da concentração de peptídeos biologicamente ativos, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II), fator de crescimento fibroblástico (FGF), epidermal (EGF) e transformador beta (TGF- $\beta$ ) (ELFSTRAND et al., 2002; PANDEY et al., 2011). Os fatores de crescimento agem no aumento da proliferação e diferenciação das células

intestinais influenciando assim a capacidade absorptiva de eletrólitos e nutrientes pelas células intestinais (PANDEY et al., 2011). Na composição do colostro bovino, ainda estão presentes fatores que previnem a degradação protéica como o fator inibidor de tripsina (CHRISTENSEN et al., 1995), fatores antimicrobianos como a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima (PANDEY et al., 2011) e, fatores antioxidantes como as enzimas lactoperoxidase, catalase (CAT), superóxido dismutase e glutatona peroxidase, e as vitaminas A, E, C e selênio. Estes fatores antioxidantes agem na prevenção da formação em excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), evitando consequentemente, o estresse oxidativo (PRZYBYLSKA; ALBERA; KANKOFER, 2007).

Um alimento é considerado nutracêutico quando pode ser utilizado como agente terapêutico aumentando a resistência contra patógenos causadores de infecções e doenças (PANDEY et al., 2011). Neste aspecto, segundo os mesmos autores, o colostro pode ser enquadrado nesta definição, pois, além de sua eficiência contra organismos invasores do organismo, aumenta a permeabilidade intestinal, auxilia na cicatrização de lesões intestinais e proporciona o aumento da absorção de nutrientes pelo trato gastrintestinal (MARCHBANK et al., 2011; PANDEY et al., 2011).

Embasado nas características deste ingrediente lácteo, quando adicionado na alimentação de peixes, pode ser substancialmente importante para o desenvolvimento das funções fisiológicas e, crescimento das espécies. Em função do ineditismo desta fonte alimentar de origem animal para peixes neotropicais e endêmicos do Brasil como o pacu e dourado e, com base na preocupação em aliar a nutrição com saúde, bem-estar das espécies, e rendimento econômico, houve ampliação das bases para pesquisas no nosso grupo de pesquisa na ESALQ/USP.

## **2.5 IGF-I e suas ações**

Os fatores de crescimento semelhante à insulina - IGFs são compostos bioativos envolvidos com mecanismos fisiológicos como diferenciação e proliferação celular, desenvolvimento, crescimento corporal e reprodução (BECKMAN, 2011; JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011; KELLEY, 2004; MORIYAMA et al., 2000; RADAELLI et al., 2003; REINECKE, 2010; SHVED; BAROILLER; EPPLER, 2009). Os peptídeos bioativos têm sido definidos como

fragmentos específicos das proteínas que, ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, induzem respostas fisiológicas (KITTS; WEILER, 2003; RYAN et al., 2011). Em função dos efeitos mitogênicos e anabólicos, a utilização dos IGFs para peixes pode ser interessante como estimulante das vias de sinalização do crescimento do tecido muscular, principalmente em função de seu modo de crescimento hiperplásico e hipertrófico durante a fase de crescimento (CASTILLO et al., 2004; FUENTES et al., 2011; PAULETTI et al., 2007a).

Entre os vertebrados, o grupo dos peixes foram os primeiros a apresentarem um completo sistema de ligantes e receptores para insulina, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II), peptídeos pertencentes à mesma família de proteínas (DEBNATH, 2010; DUAN, 1998; PLANAS et al., 2000). Estes polipeptídeos de cadeias simples e estrutura terciária estão envolvidos com o controle dos mecanismos fisiológicos e processos celulares no organismo.

O IGF-I, IGF-II e a pró-insulina são estruturalmente similares, derivados provavelmente, após a duplicação de um gene ancestral comum, sendo a sequência de aminoácidos altamente conservada durante a evolução dos vertebrados (CAO et al., 1989; PLANAS et al., 2000). A molécula madura do IGF-I é uma cadeia simples de polipeptídeos com 70 resíduos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos da molécula do IGF-I de salmão e de humanos difere somente em 14 dos 70 aminoácidos, e o IGF-I da truta compartilha 79,6% de homologia com o IGF-I humano (ROTWEIN, 1991). Os domínios A e B da molécula do IGF-I de tilápia possuem mais que 90% de homologia com outros teleósteos, podendo chegar até a 97% e, 86 a 93% com mamíferos, o que demonstra ser o IGF-I altamente conservado entre uma variedade de espécies de vertebrados (MORIYAMA et al., 2000; REINECKE et al., 1997).

O fator de crescimento participa do eixo hipotálamo/hipófise. Após a liberação do hormônio do crescimento (GH) pela adenohipófise e a ligação ao seu receptor nos diversos órgãos alvo, há o estímulo para a síntese e a liberação de IGF-I pelos tecidos. Mediando a ação do GH, este peptídeo bioativo mitogênico encontra-se envolvido com o controle de mecanismos fisiológicos como metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e minerais, diferenciação e proliferação celular, desenvolvimento e crescimento corporal, proteção imunológica e reprodução (BECKMAN, 2011; JOHNSTON; BOWER;

MACQUEEN, 2011; KELLEY, 2004; MORIYAMA et al., 2000; RADAELLI et al., 2003; REINECKE, 2010; SHVED; BAROILLER; EPPLER, 2009). Existem evidências de que o IGF-I, integrado a outros hormônios no organismo, responde a estímulos externos como temperatura da água, salinidade, fotoperíodo, pH, disponibilidade de alimento, buscando manter a homeostase do peixe (DEBNATH, 2010; PICHA et al., 2008).

A concentração sérica de IGF-I provém principalmente do tecido hepático, fonte primária de produção e secreção deste peptídeo (BERISHVILI et al., 2006; HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997; REINECKE et al., 1997). Adicionalmente, todas as unidades celulares do organismo são potencialmente capazes de secretar o IGF-I. Berishelli et al. (2006), verificaram que em tilápias (*Oreochromis niloticus*) o mRNA do IGF-I e o peptídeo apareceram logo nos primeiros dias após a eclosão no fígado, intestino, pâncreas, tubos e ductos renais, condrócitos, células musculares esqueléticas e cardíacas, brânquias epiderme, cérebro e neurônios. A maior expressão do mRNA do IGF-I foi verificado no fígado, musculatura e sistema nervoso central em juvenis de *shidrum* (*Umbrina cirrosa*) (RADAELLI et al., 2003). Peterson et al. (2004) também verificaram maior expressão de mRNA no fígado, sendo até três vezes maior quando comparado ao músculo. O IGF-I secretado pelos tecidos extra-hepáticos possui ação local e sistêmica (autócrina e parácrina) agindo como fatores de crescimento que circulam no plasma e atuam em sítios distantes (DUAN, 1998; HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997; RADAELLI et al., 2003; REINECKE et al., 1997).

Os IGFs são secretados à medida que são produzidos, pois não há um órgão de armazenamento. Neste processo, o peptídeo age complexado a proteínas de ligação específicas (IGFBPs) presentes nos fluídos corporais, sendo que, sua ação nas células é ainda mediada por receptores específicos de membrana (IGF-IRs) (PLANAS et al., 2000; PAYE; FORSTEN-WILLIAMS, 2006).

As IGFBPs são uma família de proteínas transportadoras que se ligam com alto grau de especificidade e afinidade aos IGFs modulando sua ação e, assim, regulam o crescimento em vertebrados (DUAN et al., 1999; FUENTES et al., 2011; PICHA et al., 2008). Além de agirem como um reservatório que aumentam a meia-vida dos IGFs na corrente sanguínea, as proteínas transportadoras captam e transportam o peptídeo bioativo entre os fluídos



biológicos, determinam a biodisponibilidade para seus receptores nos diversos tecidos, inibindo ou potencializando a ação do IGF-I (DUAN, 1999; PICHA et al., 2008). Na forma livre, a meia vida do IGF-I é cerca de 20 minutos, contudo, ao ligar-se às proteínas transportadoras formando um complexo binário (IGF-I + IGFBP) a meia vida pode aumentar para até duas horas e, ao formar um complexo ternário (150 kDa) composto por IGF-I + IGFBP + ALS (subunidade ácido-lábil) pode aumentar a meia vida de seis a 12 horas, prolongando a possibilidade deste fator de crescimento exercer suas funções biológicas (HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997). Em função do alto peso molecular, estes complexos ternários não conseguem transpor a barreira endotelial sendo que estes complexos funcionam apenas como reservatório circulante dos IGFs.

Em mamíferos foram isoladas e caracterizadas 6 tipos de IGFBP (IGFBP-1 - 6), sendo a IGFBP-3 a mais abundante e importante pois faz complexo com 99% do IGFs circulantes (HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997; ROSENZWEIG, 2004; SHIMIZU et al., 2006). Em peixes são conhecidas três IGFBPs, com peso molecular variando de 22-29 kDa, 28-31 kDa e 41-45 kDa, conforme a espécie estudada, e similares as IGFBP-1, IGFBP-2 e IGFBP-3 de mamíferos (DUAN et al., 1999; KAWAGUCHI et al., 2013; SHIMIZU et al., 2006). Estas proteínas e seus mRNA são sintetizados localmente e em diversos tecidos, desde a fase embrionária até adultos, contudo, a disponibilidade, atividade e funções biológicas vêm sendo estudadas para melhor entendimento dos efeitos no organismo dos peixes (DUAN et al., 1999; KAWAGUCHI et al., 2013; RADAELLI et al., 2003). Ao saber que cada proteína de ligação possui regulação independente e algumas características próprias, apresentando diferentes efeitos biológicos no organismo, muito ainda há para ser elucidado sobre possíveis relações com o crescimento, uso terapêutico e enfermidades.

A IGFBP de 22 kDa (IGFBP-1) e a IGFBP de 31 kDa (IGFBP-2) parecem inibir a ação do IGF-I na proliferação celular e síntese de DNA, inibindo assim a taxa de crescimento somático durante o jejum (DUAN et al., 1999; KELLEY et al., 2001; SHIMIZU et al., 2006). Em situação de catabolismo, Kawagushi et al. (2013) verificaram que a concentração das proteínas séricas identificadas como IGFBP-1a (28-kDa) e IGFBP-1b (22-kDa), subtipos da IGFBP-1, aumentam em *masu salmon* (*Oncorhynchus masou*) influenciando negativamente o crescimento somático neste período. Correlação negativa dos níveis circulantes de IGFBP-1

com peso corporal e taxa de crescimento também foi verificado em dois tipos de salmonídeos (*Oncorhynchus tshawytscha* e *Oncorhynchus kisutch*) e *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) (PETERSON; SMALL, 2004; SHIMIZU et al., 2006). De modo contrário, a IGFBP de 40-50 kDa (IGFBP-3), regulada pelo GH, não foi influenciada pelo estado de jejum e parece estar direta e positivamente relacionada ao crescimento em *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) e *coho salmon* (*Oncorhynchus kisutch*) (KELLEY et al., 2001; PETERSON; SMALL, 2004).

O receptor do IGF-I (IGF-IR), presente em todos os tipos celulares no organismo, é homólogo ao receptor da insulina e com alta similaridade com os receptores de IGF-I e insulina de mamíferos. São proteínas heterotetraméricas composta por duas subunidades extracelulares  $\alpha$  e duas subunidades intracelulares  $\beta$  unidas por pontes de sulfeto. A subunidade  $\alpha$ , com peso molecular aproximado de 115 kDa, contém um sítio de ligação com a cisteína e a subunidades  $\beta$ , com aproximadamente 95 kDa, possui atividade de tirosina quinase (DUAN et al., 2010; PÁRRIZAS et al., 1995; PLANAS et al., 2000). Quando unido ao receptor específico, o IGF-I induz a fosforilação de resíduos de tirosina e desencadeia uma série de reações enzimáticas intracelulares. No músculo esquelético de *fine flounders* (*Paralichthys adspersus*), o fornecimento exógeno de IGF-I foi capaz de ativar sinalização celular através da via MAPK/ERK e PI3K/Akt promovendo efeitos mitogênicos e anabólicos contribuindo para o crescimento somático em peixes (FUENTES et al., 2011). Estas vias ativadas estimulam a miogênese, através da divisão celular, síntese de proteínas e diferenciação celular no músculo (CLEMMONS, 2009; FUENTES et al., 2011).

O fornecimento exógeno de IGF-I, inseridos em peletes de ração (concentração de 0,02 nmol de IGF-I/g) proporcionou aumento no ganho de peso, no conteúdo de proteína muscular e redução da concentração de lipídios no hepatopâncreas de crustáceos juvenis de *crayfish* (*Cherax quadricarinatus*), (CHAULET et al., 2012). Da mesma forma, concentrações séricas de IGF-I foram correlacionadas positivamente com comprimento e peso corporal em *masu salmon* (*Oncorhynchus masou*) (KAWAGUCHI et al., 2013), indicando que os níveis de IGF-I são aceitáveis, juntamente aos índices bioquímicos, para a estimativa de taxa de crescimento em diversas espécies de peixes (BECKMAN, 2011; KAWAGUCHI et al., 2013; PICHA et al., 2008). Confirmando estes

achados, Cyrino e Mulvaney (1999), forneceram *in vitro* suplementação do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) para avaliar os efeitos sobre a proliferação da linhagem de células somáticas do bagre *brown bullhead* (*Ictalurus nebulosus*) e verificaram que os fatores de crescimento de mamíferos estimulam discretamente a atividade mitogênica de células de peixes.

Ao saber que diversos fatores como o tipo de alimento, estado nutricional, mudanças de temperatura, jejum prolongado, situações de estresse estão envolvidos na regulação do IGF-I, pesquisas tem sido realizadas para elucidar quais são os mecanismos relacionados a este fator de crescimento em organismos aquáticos, principalmente teleósteos (CHAULET et al., 2012; CYRINO; MULVANEY, 1999; KELLEY et al., 2001; PAULETTI et al., 2007a, 2007b; RODRIGUES et al., 2010; SHIMIZU et al., 2006; SILVERSTEIN et al., 2000). O colostro bovino, que contém concentração de IGF-I variando entre 15 - 500 ng/mL (BLUM; HAMMON, 2000; HAMMON; BLUM, 2002; MORETTI et al., 2012b; PENCHEV GEORGIEV, 2008), foi testado pioneiramente pelo nosso grupo de pesquisa, Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal da ESALQ/USP na alimentação de peixes (CRUZ et al., 2014; MORETTI et al., 2014b; PAULETTI et al., 2007a, 2007b; RODRIGUES et al., 2009, 2010). Os pesquisadores verificaram respostas fisiológicas sobre os parâmetros histológicos e enzimáticos no intestino de peixes, e principalmente sobre os processos que regulam o crescimento dos peixes. Apesar de, nas últimas décadas, pesquisas terem sido realizadas com foco nos IGFs em diferentes espécies de peixes (DUAN, 1998; DYER et al., 2004; PETERSON et al., 2004; REINECKE et al., 1997), pouco se conhece sobre a ação do IGF-I exógeno e heterólogo em juvenis de pacu e dourado.

## **2.6 Indicadores de atividade celular**

Concentrações de proteína total (PT) e o conteúdo de ácidos nucleicos, indicadores bioquímicos de atividade celular nos tecidos corporais, são utilizados para estimar a condição nutricional e o crescimento em peixes (CHÍCHARO; CHÍCHARO, 2008; GWAK; TANAKA, 2001; GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003; MERCALDO-ALLEN; KUROPAT; CALDARONE, 2008; SIVARAMAN et al., 2009). A concentração de ácido desoxirribonucleico (DNA) esta intimamente relacionada ao número de células presentes no tecido, enquanto a concentração de ácido

ribonucleico (RNA) está relacionada à síntese de proteínas. Com isso, a relação entre RNA/DNA reflete a capacidade de síntese protéica em cada célula e, conseqüentemente, relaciona-se a taxa de crescimento, principalmente durante as fases larval e juvenil (BUCKLEY, 1984; SIVARAMAN et al., 2009).

Segundo Buckley, Caldarone e Ong (1999), a concentração de RNA varia de acordo com as exigências para a síntese protéica, o estado fisiológico e a taxa de crescimento, enquanto a concentração de DNA por célula mantém-se relativamente constante. Esta técnica de análise, através da síntese protéica, tem sido amplamente utilizada na pesquisa, contudo, sua validade depende de alguns fatores como a espécie em questão, fase do ciclo de vida, tipo de ambiente e temperatura, alimentação, sexo, salinidade dos oceanos, exposição a contaminantes farmacêuticos, entre outros (CHÍCHARO et al., 2007; CHÍCHARO; CHÍCHARO, 2008; FARIA et al., 2011; IMSLAND et al., 2001, 2002; LI et al., 2010; MALLOY; TARGETT, 1994; ROOKER; HOLT, 1996).

O crescimento muscular, durante os estágios da vida, pode ocorrer em função da alteração da condição de celularidade nos tecidos, através do aumento no volume celular (hipertrofia) ou número de células, decorrente da alta proliferação celular (hiperplasia) (JOHNSTON, 1999; MITTAKOS et al., 2012; PERIAGO et al., 2005). No período inicial de vida, Malzahn et al. (2003) observaram que o crescimento de peixes *Coregonus oxyrinchus* (larvas com peso inferior que 12 mg), ocorreu predominantemente por hiperplasia, indicado pelas elevadas concentrações de DNA, enquanto em larvas maiores, ocorreu principalmente crescimento por hipertrofia. A variação na concentração de DNA no músculo durante o desenvolvimento, também foi verificado por Buckley, Caldarone e Ong (1999), Fonseca et al. (2006) e Olivar et al. (2009). Pauletti et al. (2007a, 2007b) ao fornecer níveis de colostro bovino liofilizado para juvenis de cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*), verificaram aumento no conteúdo de DNA entérico, hepático e muscular, sugerindo elevada contribuição para o crescimento por hiperplasia.

Entre os indicadores bioquímicos relacionados à atividade celular, a relação RNA/DNA tem sido preferencialmente utilizada para estimar o crescimento somático e a condição nutricional, tanto em invertebrados quanto em peixes, pois, é variável conforme as características do ambiente onde os animais estão inseridos (BUCKLEY, 1984; CHAULET et al., 2012; CHÍCHARO;

CHÍCHARO, 2008; PECK et al., 2003; STIERHOFF et al., 2009). RNA/DNA reflete a capacidade de síntese protéica por célula, o que influencia ativamente a celularidade dos tecidos (BUCKLEY, 1984; MITTAKOS et al., 2012; PERIAGO et al., 2005; SIVARAMAN et al., 2009). A celularidade reflete a relação entre quantidade, tipo e característica (diâmetro e tamanho) das células presentes em órgãos ou tecidos, podendo variar conforme a condição fisiológica e fase do desenvolvimento em que o animal se encontra (JOHNSTON, 1999; PERIAGO et al., 2005; MITTAKOS et al., 2012). A diminuição da RNA/DNA acompanhada pela baixa relação proteína/DNA em juvenis de *Japanese flounder* (*Paralichthys olivaceus*) esta relacionada à possível diminuição da condição nutricional em peixes (GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003). Contudo, Chícharro e Chícharro (2008) sugerem relação com desaceleração na taxa de crescimento dos peixes e não necessariamente com inadequada condição nutricional. A redução na taxa de crescimento em peixes durante a fase juvenil e adulta concorda com a teoria de que as células musculares de peixes jovens possui maior capacidade de sintetizar proteínas intracelulares, verificada pela maior relação RNA/DNA, relacionando com o crescimento em peixes (STIERHOFF et al., 2009).

A utilização inédita de colostro bovino liofilizado, como substituto parcial da fonte protéica para pacu e dourado juvenis e a possível influência desta secreção láctea sobre o desenvolvimento intestinal, atividade enzimática e síntese protéica no intestino, fígado e músculo, contribuirá com informações relevantes nestas espécies brasileiras de importância econômica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Condições, tratamentos e dietas experimentais

Foram utilizados alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) provenientes de piscicultura comercial, condicionados a aceitar alimentação artificial e adquiridos de empresa especializada. O período experimental a campo foi conduzido nas instalações do Laboratório de Nutrição de Peixes do Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, com a colaboração do Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino. Os peixes foram submetidos a procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (ESALQ/USP).

Para o início das atividades a campo os pacus ( $8,46 \pm 0,74$  g;  $7,75 \pm 0,27$  cm) e dourados ( $13,27 \pm 0,91$  g;  $10,84 \pm 0,33$  cm), foram submetidos a 10 e 7 dias de adaptação, respectivamente. Após este período, os peixes foram selecionados de acordo com a higidez e homogeneidade de porte e distribuídos aleatoriamente em tanques plásticos experimentais constituindo-se um esquema fatorial 3x2 (18 juvenis de pacu ou 15 juvenis de dourado por tratamento, considerando-se triplicatas para cada tratamento), correspondendo às dietas experimentais (0%, 10 e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado - CBL) e às datas de abate (30 e 60 dias após o início do experimento). Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais até aparente saciedade duas vezes ao dia (08h30m e 16h30m).

Os peixes permaneceram em tanques plásticos (300 L), dotados de fluxo de água e aeração contínuos em sistema de circulação fechada e foto-período de 12 horas luz: 12 horas escuro, mantido por 8 lâmpadas fluorescentes de 160 w (110 v), controladas por temporizador. Parâmetros de qualidade da água como temperatura ( $26,8 \pm 1,5^{\circ}$  C), oxigênio dissolvido ( $5,8 \pm 1,0$  mg/L) na água e pH ( $7,9 \pm 0,3$ ) foram monitorados diariamente utilizando-se o oxímetro digital modelo YSI 55 (INOLAB®). A amônia ( $\leq 0,5$  mg/L) monitorada semanalmente com kit comercial colorimétrico (Labcon Test Amônia Tóxica, Alcon). Todos os parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro dos limites aceitáveis para as espécies segundo Urbinati e Gonçalves (2010). Semanalmente, práticas de limpeza dos tanques por sifonagem foram realizadas.

As dietas foram formuladas de modo que, além de atender os níveis de proteína bruta (PB) e energia bruta (EB), o colostro bovino liofilizado contribuisse com 10 e 20% da dieta. As dietas isonitrogenadas e isoenergéticas, formuladas visando atender 320 g/kg de PB e 17,16 de MJ/kg EB para pacu e, 450 g/kg de PB e 18,27 de MJ/kg EB para dourado, foram preparadas com ingredientes conforme o hábito alimentar das espécies (BICUDO et al., 2009a; BRAGA et al., 2007).

O colostro bovino obtido de vacas sadias foi homogeneizado, armazenado a -20° C e encaminhado para o processo de liofilização no Laboratório de Bioquímica e Análise Experimental, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP. O liofilizado foi triturado a pó e armazenado a -20°C em recipiente vedado até o uso posterior. Os demais ingredientes que compuseram as rações foram finamente moídos ( $\leq 1$  mm), adicionados os níveis de CBL à ração correspondente a cada tratamento, homogeneizados e peletizados. Após secagem por 24 horas em estufa de ventilação forçada (50° C), as dietas foram armazenadas em recipientes plásticos protegidas de luz e mantidas em refrigeração durante o período experimental.

As refeições fornecidas em forma de peletes aos juvenis e o colostro bovino liofilizado, foram analisados para quantificação de proteína bruta, energia bruta, fibra bruta, extrato etéreo e matéria mineral de acordo com os procedimentos Oficiais de análise (AOAC) (2000) (Tabela 1). As dietas experimentais foram formuladas com o software Super Crac 4.0® e os ingredientes utilizados nas dietas dos pacus e dourados estão listados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1 - Bromatologia do colostro bovino liofilizado utilizado para a composição das refeições fornecidas aos peixes

<b>Composição química (g/kg)</b>	
Proteína Bruta	678,9
Matéria seca	941,3
Extrato etéreo	82,1
Energia bruta (MJ/kg)	21,9

Tabela 2 - Composição química da dieta fornecida aos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) contendo colostro bovino liofilizado (CBL)

Ingredientes (g/kg)	Dieta <sup>a</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL
Colostro (679 PB)	-	100,0	200,0
Farelo de soja (450 PB)	265,0	76,7	-
Farelo de trigo	238,0	311,8	311,8
Farinha de vísceras de aves	200,0	200,0	131,3
Quirera de arroz	188,0	198,2	200,0
Farinha de peixe (550 PB)	50,0	50,0	50,0
Óleo de peixe	46,2	40,0	45,7
DL-Metionina	2,4	3,4	4,7
L-Lisina HCL	-	6,0	11,5
Premix <sup>(b)</sup>	10,0	10,0	10,5
BHT	2,0	2,0	2,0
Celulose	-	3,4	-
Calcáreo	-	-	14,7
Milho Grão	-	-	9,3
<b>Composição Química<sup>c</sup></b>	<b>0% CBL</b>	<b>10% CBL</b>	<b>20% CBL</b>
Proteína Bruta, g/kg	324,6	314,9	322
Energia Bruta, MJ/kg	18,0	18,2	18,3
Fibra Bruta, g/kg	30,0	27,7	30,7
Extrato Etéreo, g/kg	90,5	98,2	109,3
Materia Mineral, g/kg	106,4	101,1	92,8

<sup>a</sup>Dieta 0% CBL – sem inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL – 10% de inclusão de CBL; 20% CBL – 20% de inclusão de CBL. <sup>b</sup> (1) Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo, suplementação de premix vitamínico mineral por kg de ração: 2.500.000 UI de vitamina A; 600.000 UI de vitamina D3; 37.500 UI de vitamina E; 3.750 mg vitamina K3; 50.000 mg vitamina C; 4.000 mg vitamina B1; 4.000 mg Vitamina B2; 4.000 mg Vitamina B6; 4.000 mcg Vitamina B12; 12.000 mg de pantetonato de cálcio; 15 mg biotina; 1.250 mg ácido fólico; 22.500 mg niacina; 2.500 mg de cobre; 12.500 mg de zinco; 375 mg de iodo; 87,5 mg de selênio; 125 mg de cobalto; 12.500 mg de manganês; 15.000 mg de ferro; 15.000 mg de B.H.T. <sup>c</sup>Materia seca com base nos procedimentos da AOAC (2000)



Tabela 3 - Composição química da dieta fornecida aos juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) contendo colostro bovino liofilizado (CBL)

Ingredientes (g/kg)	Dieta <sup>a</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL
Colostro (679 PB)	-	100,0	200,0
Farelo de soja (450 PB)	230,0	230,0	230,0
Farinha de vísceras de aves	204,8	119,8	24,5
Farinha de peixe (550 PB)	320,0	300,0	300,0
Óleo de peixe	95,0	90,0	85,2
Premix <sup>b</sup>	10,0	10,0	10,0
BHT	0,2	0,2	0,2
Celulose	20,0	30,0	30,0
Milho Grão	120,0	120,0	120,0
Composição Química <sup>c</sup>	0% CBL	10% CBL	20% CBL
Proteína Bruta, g/kg	422	425,1	444,7
Energia Bruta, MJ/kg	20,8	21,1	20,8
Fibra Bruta, g/kg	18,9	29,2	37,3
Extrato Etéreo, g/kg	140,7	140,6	133,7
Material Mineral, g/kg	121,9	114,5	91,1

<sup>a</sup>Dieta 0% CBL - sem inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL – dieta com inclusão de 10% de CBL; 20% CBL – dieta com inclusão de 20% de CBL. <sup>b</sup>Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo, suplementação de premix vitamínico mineral por kg de ração: 2.500.000 UI de vitamina A; 600.000 UI de vitamina D3; 37.500 UI de vitamina E; 3.750 mg vitamina K3; 50.000 mg vitamina C; 4.000 mg vitamina B1; 4.000 mg Vitamina B2; 4.000 mg Vitamina B6; 4.000 mcg Vitamina B12; 12.000 mg de pantetonato de cálcio; 15 mg biotina; 1.250 mg ácido fólico; 22.500 mg niacina; 2.500 mg de cobre; 12.500 mg de zinco; 375 mg de iodo; 87,5 mg de selênio; 125 mg de cobalto; 12.500 mg de manganês; 15.000 mg de ferro; 15.000 mg de B.H.T. <sup>c</sup>Materia seca com base nos procedimentos da AOAC (2000)

### 3.2 Avaliação dos parâmetros de desempenho

Para avaliação do desempenho, o lote de peixes foi pesado e os juvenis individualmente medidos em cada data de abate, compondo os dois períodos experimentais (30 e 60 dias). Foram calculados e avaliados os seguintes parâmetros de desempenho zootécnicos:

\* Peso inicial (g) – PI

\* Peso final (g) – PF

\* Ganho de peso (g) – GP

$$GP = PF - PI$$

\* Consumo de ração

\* Conversão alimentar aparente - CAA

$$CAA = [(\text{consumo de ração (g)}) / (\text{ganho de peso (g)})]$$

\* Taxa de crescimento específico (% crescimento/dia) - TCE

$$TCE = \{[\ln (PF) - \ln (PI)] / \text{período experimental (dias)}\} \times 100$$

\* Taxa de sobrevivência (%) – S

$$S = (\text{número de animais final} / \text{número de animais inicial}) \times 100$$

### **3.3 Coleta de amostras**

#### **3.3.1 Amostragem de sangue**

Nas datas de abate, após jejum prévio de 24 horas e anestesia com benzocaína (0,5 g/L), amostra de sangue de cada peixe foi coletada através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis (3 mL). Após centrifugação a 6500 x g por 15 minutos o soro resultante de cada amostra foi transferido para frascos devidamente identificados e mantidos à - 20° C para posterior análise sérica de IGF-I.

#### **3.3.2 Tecidos para microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura, a região abdominal foi aberta, o trato gastrintestinal coletado e as alças intestinais desfeitas. O intestino do pacu foi então dividido conforme Bértin (1958), em intestino médio (início na válvula pilórica até a válvula íleo-retal) que foi subdividido em dois segmentos, um cranial (alça 1 - S1) e outro intermediário (alça 2 - S2) correspondendo à região enovelada em alças e, intestino posterior o qual continua o intestino médio, desembocando no ânus (Figuras 3 e 4).

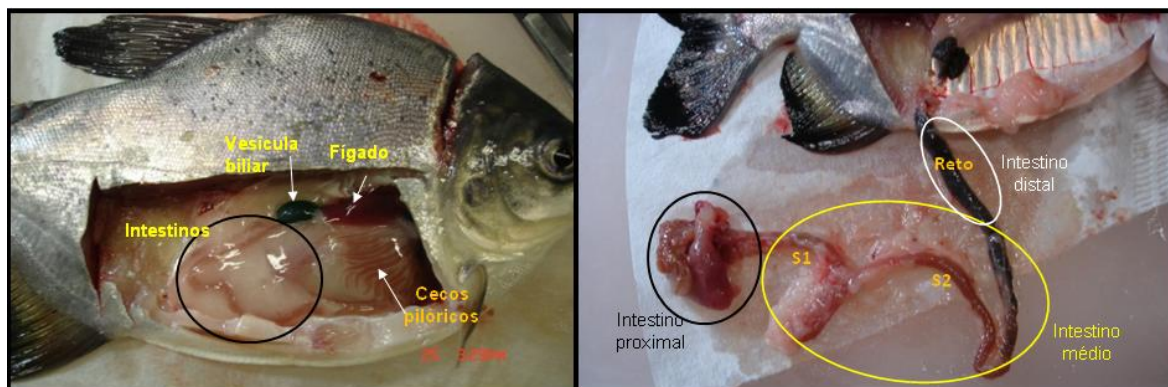


Figura 3 - Cavidade abdominal aberta para visualização dos órgãos internos (A) e trato gastrintestinal de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com os segmentos intestinais distendidos (B)

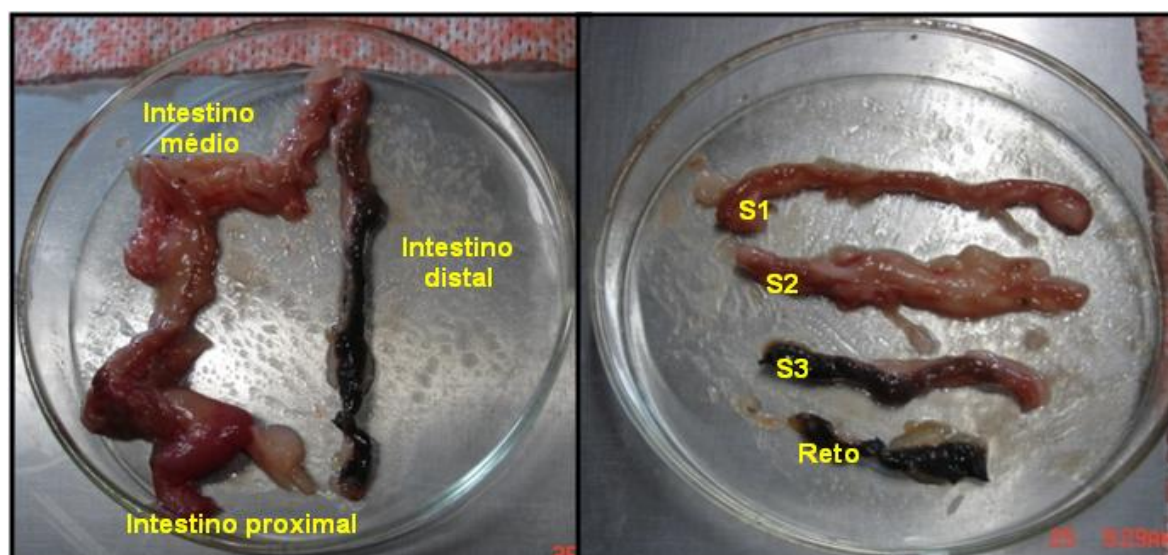


Figura 4 - Segmentos intestinais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) distendidos em placas de petri

O intestino do dourado foi dividido conforme Rodrigues e Menin (2008), em intestino médio (início após o esfíncter pilórico até ultrapassar a região cecal gástrica) que foi subdividido em dois segmentos (alças 1 - S1 e alça 2 - S2) correspondendo à região enovelada em alças, que em conjunto dispõe-se em forma de "N" e, intestino posterior (sem a interrupção por constrição ou valva) o qual continua o intestino médio, desembocando no ânus (Figura 5).

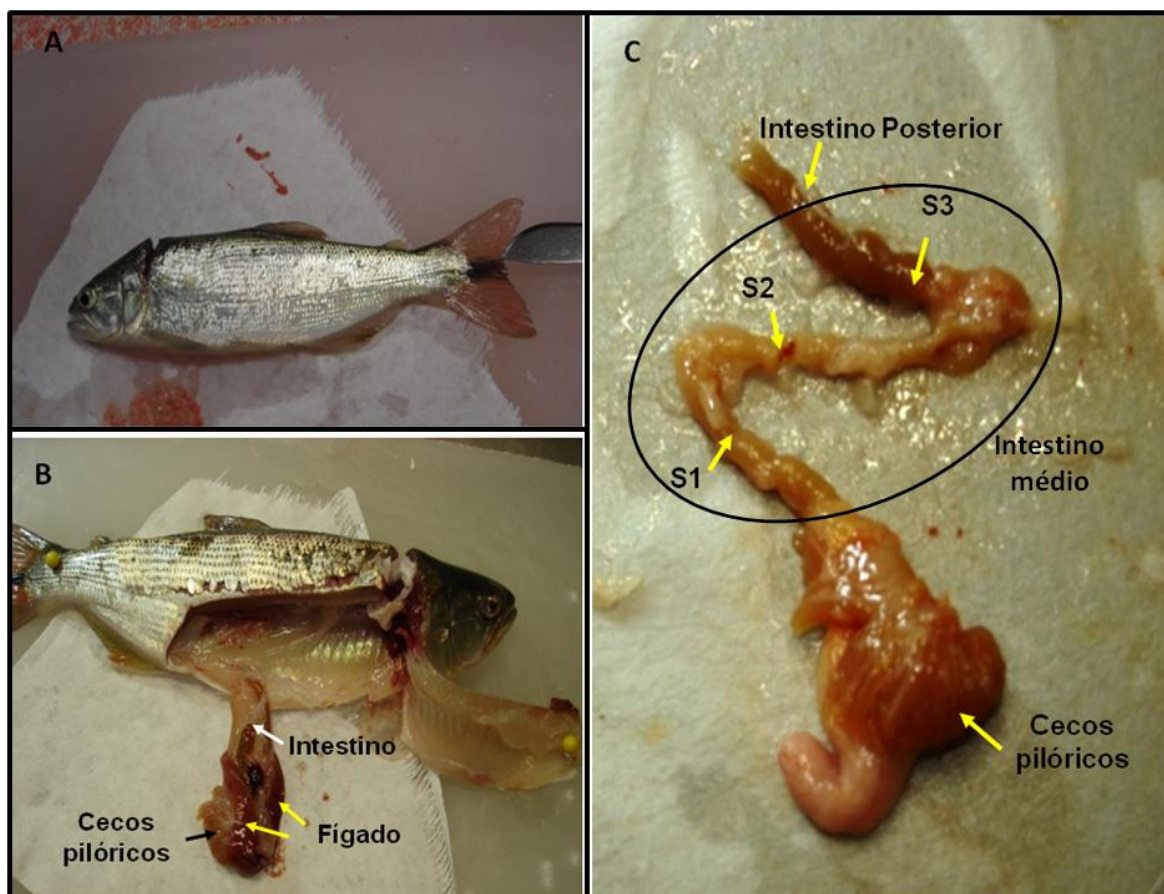


Figura 5 - Secção medular (A); Cavidade abdominal aberta e retirada dos órgãos internos (B) e; segmentos intestinais distendidos de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) (C).

As porções intestinais (5x5 cm) foram abertas longitudinalmente em papel filtro, lavadas com solução salina 0,9% a 5°C. Em seguida as porções teciduais foram esticadas em placas de petri contendo parafina sob papel filtro e fixadas com o auxílio de alfinetes nas extremidades. Os tecidos foram, então, pré-fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS), 0,1M, pH 7.2, por 30 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram repicadas em segmentos de 3x3 mm e armazenadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído, cacodilato de sódio 0,1M e  $\text{CaCl}_2$  0,001 M) a 4°C para posterior análise.

### 3.3.3 Tecidos para análise enzimática, proteína total e ácidos nucléicos

Foram coletadas amostras de sete peixes de cada tratamento, em cada data de abate para análise da atividade das enzimas entéricas, e quantificação de proteína total e ácidos nucléicos totais (DNA e RNA) no intestino total (médio e

posterior), fígado e músculo. As amostras foram imediatamente armazenadas em tubo plástico (1,5 mL) e congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) para posterior análise tecidual.

Para análise dos indicadores de atividade celular, os tecidos entérico, hepático e muscular (aproximadamente 1 g) foram descongelados e homogeneizados em água destilada (19 mL) utilizando-se ultra-turrax (Polytron®-Kinematica GnbH) por um minuto a 22000 rpm. Uma alíquota do homogeneizado obtido foi utilizada para determinar a atividade das enzimas intestinais (MAROUX; LOUVARD; BARATTI, 1973; NAGATSU et al., 1976). Outra alíquota do homogeneizado utilizada para análise do conteúdo de proteína total segundo metodologia proposta por Lowry et al. (1951) modificado por Hartree (1972). O restante do homogeneizado foi utilizado para quantificação de DNA e RNA utilizando ácido perclórico 0,6 N, hidróxido de potássio 0,3 N e solução com corante Hoechst (bis-bensimida, Calbiochem) (LABARCA; PAIGEN, 1980).

### **3.4 Análises laboratoriais**

#### **3.4.1 Quantificação do IGF-I sérico**

A concentração de IGF-I no soro dos peixes foi quantificada segundo Ma et al. (2011), por ensaio imunoenzimático pós-extração utilizando-se o kit comercial (Cusabio, China), sendo de 50 ng/mL o limite mínimo de detecção do ensaio. Para a extração das proteínas ligadoras de IGF-I, 100 µL de amostra e 400 µL de solução de pré-tratamento (etanol ácido) foram incubados por 30 minutos e, na sequência, centrifugados dois minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante (100 µL) foi separado e adicionado a 600 µL de solução de neutralização.

A quantificação do IGF-I sérico foi analisada após adição de 50 µL dos padrões e amostras extraídas aos poços da microplacas revestidas com anticorpo de caprinos anti-coelho. Aos poços foram adicionados 50 µL de IGF-I-HRP (IGF-I conjugado com a enzima *horseradish* peroxidase) e 50 µL do anticorpo específico para IGF-I e, incubados por duas horas a 37°C. Em seguida, a microplaca foi lavada por três vezes consecutivas, utilizando-se 200 µL de solução de lavagem e aspirando bem cada poço entre cada lavagem. Para o desenvolvimento da cor, a cada poço foi adicionado 50 µL do substrato A e 50 µL do substrato B, seguindo-se incubação por 15 minutos, à 37° C, evitando-se exposição à luz. Após a

incubação foi adicionado 50 µL de solução de parada e a absorbância lida em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 450 nm (filtro de referência 650 nm), dentro de 10 minutos. As amostras foram analisadas em duplicata, sendo o valor médio utilizado para se obter as concentrações de IGF-I em ng/mL.

### **3.4.2 Morfologia do epitélio intestinal**

Para estudo histomorfológico por microscopia eletrônica de varredura, as amostras de tecido intestinal armazenadas em solução Karnovsky foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M duas vezes por cinco minutos e pós-fixadas em solução tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, durante uma hora. Após a fixação, os segmentos intestinais foram lavados com água destilada por três vezes, desidratados em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90) por dez minutos em cada concentração, finalizando em duas lavagens de quinze minutos em acetona 100%. Transcorrida estas etapas iniciais, as secções intestinais foram secas com um aparelho de secagem de ponto crítico, Balzers CPD 030 (Bal Tec AG), fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas com ouro paládio (40 nm) à vácuo, utilizando o equipamento Blazers MED-010 (Bal Tec AG). Após o processamento, os tecidos intestinais foram armazenados em sílica para posterior análise ao microscópio eletrônico de varredura (LEO VP-435, Carl Zeiss). Dez imagens por segmento intestinal foram captadas e analisadas para a caracterização morfológica dos segmentos.

### **3.4.3 Atividade enzimática no tecido intestinal**

#### **3.4.3.1 Peptidases**

As enzimas peptidases avaliadas foram aminopeptidase N (EC 3.4.11.2), dipeptidil peptidase IV (EC 3.4.14.5) e aminopeptidase A (EC 3.4.11.7). Para a avaliação da atividade da aminopeptidase N o homogeneizado do tecido intestinal obtido na técnica descrita anteriormente foi diluído com água destilada para 5 mg/mL de tecido e para as enzimas dipeptidil peptidase IV e aminopeptidase A, foi diluído para 10 mg/mL de tecido.

Para a determinação da atividade enzimática das enzimas foram utilizadas soluções de tampão glicina (71 mM, pH 8,0) adicionado de 1,5 mM dos

substratos *L*-leucine-*p*-nitroanilide, glicil-*L*-prolil-*p*-nitroanilide hydrochloride e *L*-glutamic acid 1-(4-nitroanilide) (Sigma-Aldrich Co.) para determinação da atividade da aminopeptidase N (EC 3.4.11.2), dipeptidil peptidase IV (EC 3.4.14.5) e aminopeptidase A (EC 3.4.11.7), respectivamente (MAROUX; LOUVARD; BARATTI, 1973; NAGATSU et al., 1976).

Uma alíquota do homogeneizado da mucosa intestinal (300 µL) foi misturado com o tampão glicina (200 µL) adicionado do substrato das enzimas (pré-aquecido a 37°C por cinco minutos). Após a permanência desta solução por 30 minutos a 37°C, a reação enzimática foi inibida ao adicionar 3 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,2). Após esta etapa, 300 µL do homogeneizado da mucosa intestinal foi adicionado aos tubos controle e a absorbância determinada em espectrofotômetro (Multiskan GO - Thermo Fisher Scientific) em comprimento de onda ajustado em 385 nm. Para cada bateria de amostras, foi estabelecida uma curva padrão que relaciona concentrações (109,8 a 2,74 mg) de *p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich Co.) a valores de absorbância. A atividade enzimática final foi calculada através da subtração do valor das absorbâncias das amostras e o valor das absorbâncias obtidas para os tubos controle. As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando foi observada variação acima de 5%, a análise foi repetida. A atividade enzimática foi calculada como unidades internacionais (UI) por grama de tecido. Uma UI corresponde a um µmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

### **3.4.3.2 Dissacaridases**

Amostras da mucosa intestinal anteriormente homogeneizadas foram diluídas para 30 mg/mL de tecido de pacu e 40 mg/mL de tecido de dourado. Os substratos d-maltose monohidratada e sacarose (56 mM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) diluídos em tampão maleato (0,1 M, pH 6,0) foram utilizados para a atividade enzimática da maltase (EC 3.2.1.20) e sacarase (EC 3.2.1.48), respectivamente (DAHLQVIST, 1964).

Quarenta µL do homogeneizado da mucosa intestinal foi misturado com 200 µL de tampão maleato contendo o substrato (pré-aquecido a 37°C por cinco minutos) permanecendo por 60 minutos a 37°C. Após, a reação foi inibida imergindo os tubos de ensaio em banho-maria a 100°C por um minuto. A dosagem da glicose liberada da reação enzimática colorimétrica foi realizada

utilizando-se o kit Glicose - PP (Gold Analisa Diagnóstica Ltda.). Dois mL do reagente enzimático contendo solução de 4-aminofenazona, hidroxibenzoato e glicose oxidase foram adicionados a 80 µL do sobrenadante obtido anteriormente e incubado a 37°C por 20 minutos, evitando luz direta. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 505 nm. Para cada bateria de amostras, foi estabelecida uma curva padrão que relaciona concentrações de glicose-PP a valores de absorbância. A atividade enzimática final foi calculada subtraindo-se uma amostra em branco (homogeneizado inativado a 100°C antes da incubação com o substrato). As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando observada uma variação acima de 5% a análise foi repetida. A atividade enzimática foi calculada como unidades internacionais (UI) por grama de tecido. Uma UI corresponde a um µmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

#### **3.4.4 Quantificação de proteína total nos tecidos entérico, hepático e muscular**

Para a determinação da concentração da proteína total (PT) nas amostras de intestino, fígado e músculo, utilizou-se como base a metodologia descrita por Lowry et al. (1951) modificado por Hartree (1972). Para a referida análise, as amostras foram descongeladas e os tecidos (aproximadamente 1 g) foram homogeneizados em água destilada (19 mL) como descrito anteriormente. O homogeneizado foi incubado com 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, adicionado de 0,2% triton, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foi adicionado 1600 µL solução contendo carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), hidróxido de sódio (NaOH), citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) e sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) a 320 µL da amostra com a solução protéica e homogeneizados com vórtex. Após um minuto de reação em temperatura ambiente, adicionou-se 160 µl do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co.) diluído na proporção 1:1 com água destilada. Após 30 minutos, intervalo onde a reação foi mantida protegida da luz, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Multiskan GO - Thermo Fisher Scientific) em comprimento de onda ajustado em 600 nm. Foi estabelecida uma curva padrão com cinco pontos (4 a 0,25 mg de albumina/mL de NaOH) que relaciona concentrações de albumina bovina comercial (Sigma-Aldrich Co.) a valores de absorbância para cada bateria de amostras analisadas. Resultados



são expressos em atividade específica (mg proteína/g tecido). As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando foi observada variação acima de 5% a análise foi repetida. As relações proteína total/DNA e proteína total/RNA foram calculadas para mensurar a quantidade de proteína por célula e a atividade de tradução.

### **3.4.5 Quantificação de DNA total nos tecidos entérico, hepático e muscular**

Para a determinação da concentração de DNA nas amostras de intestino, fígado e músculo, utilizou-se como base a metodologia descrita por Labarca e Paigen (1980). As amostras foram descongeladas e cada tecido (aproximadamente 1 g) foi homogeneizado em água destilada (19 mL) como descrito anteriormente. Para a extração do DNA total, o tecido foi transferido para um microtubo contendo 0,5 mL de ácido perclórico (PCA) 0,6 M permanecendo *overnight* a 4° C. No dia seguinte, o tecido foi homogeneizado com vórtex, deixado em descanso durante 10 minutos e centrifugado a 6500 x g, por 15 minutos, a 4°C. Após o sobrenadante foi descartado e o pelete lavado duas vezes com 0,4 mL de PCA 0,2 M. Cada lavagem foi intercalada por centrifugação a 6500 x g, durante 15 minutos, a 4°C, resultando em um material precipitado. A este precipitado foi adicionado 0,8 mL de hidróxido de potássio (KOH) 0,3 M, homogeneizado com vórtex e incubado a temperatura ambiente num agitador (Tecnal - TE 141) a 150 rpm, durante uma hora. Após este procedimento, as amostras permaneceram no gelo para resfriamento, por cinco minutos e, por dez minutos com 0,4 mL de PCA 1,2 M gelado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6500 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante resultante foi transferido para um tubo falcon (15 mL) e utilizado para posterior quantificação do RNA total. O pelete foi lavado duas vezes com 1 mL de PCA 0,2 M gelado e a cada lavagem, o sobrenadante resultante foi adicionado ao mesmo tubo falcon anteriormente citado para posterior quantificação do RNA total. O pelete resultante, que contém o DNA, foi congelado a -20°C para posterior quantificação.

Para a quantificação do DNA, o pelete foi descongelado, dissolvido em 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M e incubado *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, 1 mL de solução contendo 1 µL/mL de corante Hoechst (bis-bensimida H33258, Sigma Aldrich Co.), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2 M de cloreto de sódio (NaCl) e 10 mM de Tris-HCl, foram adicionados a 40 µL

da amostra de DNA e 60 µL de água destilada, sendo essa solução mantida preservada de luz. A quantificação de DNA foi determinada em fluorímetro HOEFER DyNA Quanti 200 (Amersham Biosciences). DNA de timo de bezerro (Sigma-Aldrich Co.) foi utilizado para a curva padrão com 3 pontos (20 a 2 ug/mL). Os resultados são apresentados como mg de DNA/g de tecido.

#### **3.4.6 Quantificação de RNA total nos tecidos entérico, hepático e muscular**

Para a determinação da concentração de RNA nas amostras de intestino, fígado e músculo, amostras contendo o RNA total obtido através do protocolo descrito anteriormente para a extração do DNA foi descongelado, adicionado 3 mL de PCA 0,2 M e homogeneizados em vortéx. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan GO - Thermo Fisher Scientific) com comprimento de onda ajustado em 260 nm e a qualidade determinada pelas razões A260/A280. Os resultados são apresentados como mg de RNA/g de tecido. A relação RNA:DNA foi calculada para mensurar a capacidade de síntese protéica.

### **3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas**

Os juvenis foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado sendo analisados 6 tratamentos por espécie de peixe (pacu e dourado) em esquema fatorial 3x2 (18 pacus e 15 dourados por repetição, considerando-se triplicatas para cada tratamento), correspondendo às três dietas (controle, 10 e 20% de inclusão de CBL) e duas datas de abate (30 e 60 dias). A concentração do IGF-I sérico, atividade das enzimas e quantificação da proteína, DNA e RNA total nos tecidos entérico, hepático e muscular, foram analisadas através do procedimento PROC MIXED do programa SAS® (2008).

Para execução das análises estatísticas todos os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação de diferenças entre médias, foram efetuados contrastes entre pares de médias utilizando-se o teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). No dourado, a atividade da enzima aminopeptidase N não atendeu a pressuposição da normalidade e os dados foram transformados utilizando-se a função logarítmica na base dez.

Análise de correlação de Pearson, utilizando o procedimento PROC CORR do programa SAS® (2008) foram realizadas para verificar associações de

interesse entre as variáveis analisadas. Foi realizada análise das variáveis proteína total, DNA, RNA e suas relações, correlacionando-as com comprimento e peso corporal, no intestino, fígado e músculo dos peixes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES - PACU

### 4.1 Parâmetros de desempenho do pacu

Os parâmetros de desempenho individual para os peixes alimentados com dieta contendo 0, 10 ou 20% de colostro bovino liofilizado nos dois períodos experimentais estão apresentados na Tabela 4. Não houve diferença entre as dietas para os parâmetros de desempenho analisados ( $P>0,05$ ). Entre os períodos houve diferença apenas para consumo alimentar e taxa de crescimento específico ( $P<0,05$ ). Aos 60 dias o consumo alimentar foi superior do que aos 30 dias, enquanto taxa de crescimento específico foi menor neste período.

Houve interação entre dieta e período experimental para ganho de peso (Figura 6) e conversão alimentar aparente (Figura 7) ( $P<0,05$ ). Ao analisar o ganho de peso evidenciou-se crescimento semelhante para os peixes alimentados com as três dietas aos 30 dias, e crescimento significativamente maior aos 60 dias com 20% de CBL em relação a 10% de CBL. A conversão alimentar aparente dos peixes alimentados com 0% de CBL e 20% de CBL foi similar aos 30 e 60 dias (1,12 e 1,13%, respectivamente), enquanto os peixes alimentados com 10% de CBL apresentaram, aos 60 dias, maior índice de conversão alimentar (1,27%).

Tabela 4 - Desempenho individual (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de pacu alimentados com dietas contendo 0%, 10% e 20% de colostro bovino liofilizado (CBL), aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Efeito <sup>2</sup>			
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	Média geral	D	P	D x P
<b>Peso inicial (g)</b>							
30	8,05 $\pm$ 0,15	8,60 $\pm$ 0,43	8,06 $\pm$ 0,57	8,26 $\pm$ 0,25	N.S.	N.S.	N.S.
60	8,15 $\pm$ 0,25	8,86 $\pm$ 0,26	8,73 $\pm$ 0,72	8,63 $\pm$ 0,27			
<b>Média Geral</b>	<b>8,10 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>8,73 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>8,40 <math>\pm</math> 0,43</b>				
<b>Consumo alimentar (g)</b>							
30	41,35 $\pm$ 1,85	41,83 $\pm$ 1,15	45,36 $\pm$ 1,41	43,03 $\pm$ 0,97	N.S.	**	N.S.
60	114,00 $\pm$ 7,80	118,06 $\pm$ 7,65	119,06 $\pm$ 11,51	117,42 $\pm$ 4,81			
<b>Média Geral</b>	<b>77,67 <math>\pm</math> 21,22</b>	<b>79,95 <math>\pm</math> 17,39</b>	<b>82,21 <math>\pm</math> 17,27</b>				
<b>Taxa de crescimento específico (%)</b>							
30	4,61 $\pm$ 0,13	4,60 $\pm$ 0,11	4,71 $\pm$ 0,03	4,64 $\pm$ 0,04	N.S.	**	N.S.
60	3,71 $\pm$ 0,11	3,47 $\pm$ 0,02	3,67 $\pm$ 0,06	3,61 $\pm$ 0,05			
<b>Média Geral</b>	<b>4,16 <math>\pm</math> 0,27</b>	<b>4,03 <math>\pm</math> 0,25</b>	<b>4,19 <math>\pm</math> 0,23</b>				
<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>							
30	92	100	93		N.S.	N.S.	N.S.
60	100	96	98				

\*\*P<0,001; NS - P>0,05; <sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre as dietas; <sup>AB</sup>médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre os períodos pelo teste de Tukey; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

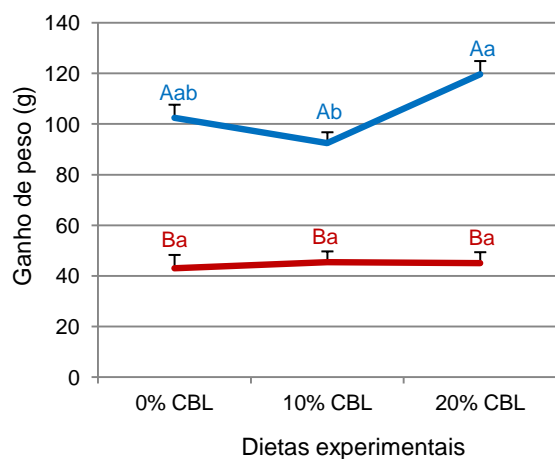


Figura 6 - Ganho de peso de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta

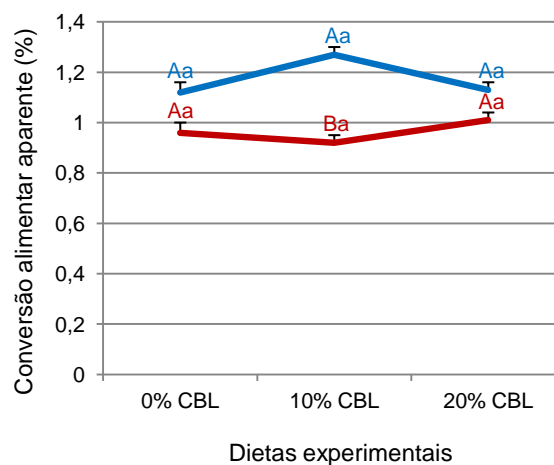


Figura 7 - Conversão alimentar aparente de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta

<sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes diferem entre as dietas; <sup>AB</sup>médias seguidas de letras diferentes diferem entre os períodos pelo teste de Tukey (P<0,05).

Melhores índices de desempenho dos peixes podem ser alcançados utilizando-se dietas balanceadas, com boa qualidade nutricional e biológica. Neste sentido, o colostro bovino, secreção láctea rica em proteínas e que adicionalmente contém componentes ativos do sistema imune, fatores de crescimento, agentes antioxidantes e antimicrobianos (PANDEY et al., 2011) pode influenciar a saúde dos peixes.

A utilização de níveis crescentes de colostro bovino liofilizado (5, 10, 15 e 20%) para cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) influenciou positivamente o ganho de peso, taxa de crescimento e conversão alimentar quando fornecido por 30 dias (PAULETTI et al., 2007a). No presente estudo, apesar da interação entre dieta e período verificada para ganho de peso e conversão alimentar aparente, não houve diferença entre os peixes alimentados com dieta contendo 10% e 20% de CBL e da mesma forma, entre os alimentados com 0% de CBL. Com isso sugere-se que as dietas foram adequadas e atenderam as necessidades nutricionais dos juvenis. Sugere-se que o colostro bovino pode ser indicado como uma promissora fonte de proteína a ser incorporado na dieta de pacus em crescimento.

Influência dos níveis de proteína na dieta sobre os indicadores de desempenho foi verificada por grupos de pesquisa ao utilizar pacu juvenil (*Piaractus mesopotamicus*) como modelo experimental (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007; BICUDO et al., 2010; TESSER et al., 2005). Abimorad e Carneiro (2007) ao estudar o fornecimento de níveis de proteína bruta (220 e 250/g kg), lipídio (40 e 80 g/kg) e carboidratos (140, 460 e 500 g/kg) para pacu com peso inicial de 11,5 g, por 12 semanas, verificaram que melhor conversão alimentar e crescimento foram atingidos com 250 g/kg de PB. Da mesma forma, Bicudo et al. (2010) verificaram ótima relação PB:ED com valor de 22,2 g/MJ para pacu com peso inicial de 15,5 g, por 10 semanas e que o requerimento mínimo de PB é de 270 g/kg. Ainda, segundo os autores, o ganho de peso (%) e a taxa de crescimento específico (%/dia) aumentaram enquanto a conversão alimentar aparente diminuiu consideravelmente com o aumento do nível de inclusão de proteína na dieta (220 g/kg para 271, 268 e 281 g/kg de PB, respectivamente). No atual trabalho foram fornecidos cerca de 320 g/kg de PB para pacu juvenil, valores elevados ao comparar com os níveis utilizados para esta mesma espécie, citados por outros pesquisadores (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007; FERNANDES;

CARNEIRO; SAKOMURA, 2001). Em um curto período de tempo (oito semanas), os juvenis apresentaram desejáveis características zootécnicas, indicando a alta qualidade nutricional das dietas formuladas e fornecidas ao pacu.

A taxa de crescimento específico verificada neste trabalho (4,6% e 3,6%, para 30 e 60 dias, respectivamente) é relativamente alta quando comparada ao encontrado por outros grupos de pesquisa. Tesser et al. (2005) registraram taxa de crescimento entre 3,1 e 3,5% para pacu com peso inicial de 4,3 g e peso final de 18,1 g, alimentado com dietas semi purificadas contendo diferentes níveis e fontes de arginina, por 6 semanas. Em pacu com peso elevado, comparativamente ao atual trabalho, foram encontrados valores entre 1,9 e 2,2% (BICUDO et al., 2010) e, 0,7 e 0,8%/dia (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007). Para todas as dietas testadas, os peixes apresentaram rápido crescimento e aumento do peso em 12 vezes durante os dois meses avaliados.

#### 4.2 IGF-I sérico no pacu

A concentração de IGF-I sérica do pacu (média  $\pm$  erro padrão) expressa em ng/mL, aos 30 e 60 dias, esta apresentada na Tabela 5. Não foi verificado efeito de dieta, período experimental e interação entre os parâmetros ( $P > 0,05$ ) para esta variável.

Tabela 5 - Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) de juvenis de pacu (média  $\pm$  erro padrão) alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
30	218,58 $\pm$ 39,63	208,37 $\pm$ 21,33	193,17 $\pm$ 6,39	205,22 $\pm$ 11,13	N.S.	N.S.	N.S.
60	220,83 $\pm$ 24,00	225,55 $\pm$ 17,84	204,81 $\pm$ 19,58	216,59 $\pm$ 10,40			
<b>Média Geral</b>	219,70 $\pm$ 18,92	216,96 $\pm$ 13,01	198,99 $\pm$ 9,57				

N.S.-  $P > 0,05$ ; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A utilização de colostro bovino como suplemento alimentar tem sido usado em humanos (FENGER et al., 2014; MARCHBANK et al., 2011) e outras espécies de animais (MORETTI et al., 2012a, 2012b, 2014a; PAULETTI et al., 2007c; PANDEY et al., 2011). Em peixes, o fornecimento de colostro bovino liofilizado como fonte alimentar proteica sobre respostas histofisiológicas e o desempenho, uma proposta inédita têm sido estudada por nosso grupo de

pesquisa (CRUZ et al., 2014; MORETTI et al., 2014b; RODRIGUES et al., 2009, 2010).

Além de nutrientes essenciais, o colostro bovino contém fatores de crescimento como o IGF-I e o EGF, os quais estão envolvidos com a proliferação e diferenciação celular (ELFSTRAND et al., 2002; PANDEY et al., 2011). No presente estudo, como ocorre em cavalos de corrida (FENGER et al., 2014) e em ruminantes (KINDLEIN et al., 2007; PAULETTI et al., 2007c; MACHADO-NETO et al., 2011; MORETTI et al., 2014a; NORDI et al., 2013), o IGF-I do colostro não influenciou a concentração sérica de IGF-I. Como hipóteses para justificar esta ausência, incluem-se a baixa quantidade de IGF-I colostrado ingerida, o tempo médio de vida do peptídeo bioativo na corrente sanguínea e a presença de barreiras no intestino.

A concentração de IGF-I no colostro bovino varia entre 15 e 500 ng/mL (BLUM; HAMMON, 2000; PENCHEV GEORGIEV, 2008; MORETTI et al., 2012b). Considerando esta concentração de IGF-I citada na literatura e o fornecimento de apenas 10 e 20% de inclusão de colostro bovino na dieta, presume-se que neste estudo houve fornecimento de insuficiente quantidade do peptídeo bioativo através da dieta, o que não influenciou a concentração na corrente sanguínea dos peixes analisados. Pauletti et al. (2007c), ao fornecer quantidades mais elevadas que a do presente trabalho, 500 a 3000 µg e 3000 a 6000 µg também não identificaram diferenças séricas de IGF-I nos primeiros sete dias de vida de bezerras. Outros estudos, assim como os resultados deste trabalho, também indicam que a concentração sérica de IGF-I não é afetada pela quantidade desse peptídeo bioativo disponível no colostro (HAMMON; BLUM, 2002; MORETTI et al., 2012b; SPARKS et al., 2003), sendo a ação tópica o principal efeito sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal.

A meia vida dos IGFs na corrente sanguínea é variável e aumentada após a formação de complexos à proteínas de ligação específicas (IGFBPs) presentes nos fluidos corporais, tendo sua ação a nível celular mediada por receptores específicos de membrana (IGF-IRs) (PAYE; FORSTEN-WILLIAMS, 2006; PLANAS et al., 2000). Após a formação do complexo binário com proteínas transportadoras (IGF+IGFBP) e terciário, também a uma proteína transportadora mais uma subunidade ácido-lábil (IGF+IGFBP+ALS), a meia-vida dos IGFs na corrente sanguínea, passa de cerca de 20 minutos para até 12 horas (HOSSNER;



McCUSKER; DODSON, 1997). Quando fornecido de forma oral, o IGF-I marcado com I<sup>125</sup> em ratos adultos apresentaram meia vida no intestino, particularmente, no duodeno e íleo dos ratos de cerca de 2 minutos (XIAN; SHOUBRIDGE; READ, 1995). No presente estudo, provavelmente não foi encontrada concentrações de IGF-I sanguíneas, porque, ao submeter os peixes a jejum (pelo menos 24 horas antes da amostragem), o IGF-I pôde ter sido degradado durante este período.

Ao contrário dos mamíferos, os teleósteos possuem características especiais de absorção de macromoléculas pelo epitélio intestinal, pois apresentam permeabilidade durante toda a fase de crescimento (DUAN et al., 1998). Em função desta característica do intestino de peixes, poderia ocorrer um processo de absorção, entretanto, a existência de importantes mecanismos químicos e físicos pode diminuir a eficiência de transferência das macromoléculas para a circulação sanguínea. Entre estes mecanismos podem ser citada a atividade das enzimas digestivas; as células de defesa pertencentes ao sistema imunológico e; as próprias células que compõe o epitélio do intestino (SCHEP et al., 1999). Nos pacus juvenis analisados, sugere-se que o IGF-I, fornecido como um componente exógeno, não pôde ser absorvido pelos enterócitos em função da elevada presença enzimática. Resultados semelhantes foram encontrados em ruminantes recém-nascidos e ratos adultos (MORETTI et al., 2012a; PAULETTI et al., 2007c; SPARKS et al., 2003; XIAN; SHOUBRIDGE; READ, 1995). Buscando promover a estabilidade do IGF-I exógeno usado como agente terapêutico no intestino, integridade estrutural no fluido intestinal e, da mesma forma, atividade de seu receptor, Xian, Shoubridge e Read (1995) ao trabalhar com ratos adultos verificaram que substâncias presentes nas secreções lácteas bovinas, como a caseína, albumina bovina (BSA) e lactoferrina são eficientes para o propósito em questão.

Levando em consideração às barreiras existentes no epitélio intestinal que podem causar a degradação do IGF-I fornecido exogenamente, a alta concentração do peptídeo bioativo (valores entre 193 e 225 ng/mL) na circulação sanguínea de pacus juvenis esta relacionada à produção endógena pelos tecidos hepático e extra-hepático. A concentração sérica de IGF-I encontrada neste trabalho é similar à de *tongue sole* (*Cynoglossus semilaevis*) ao utilizar a mesma técnica de análise (ELISA), com valores de IGF-I variando entre (178 e 368 ng/mL) (MA et al., 2011).

### 4.3 Morfologia do epitélio intestinal de juvenis de pacu

À análise macroscópica, verificou-se que o intestino médio do pacu apresentou em sua constituição três segmentos, S1, S2 e S3, separados por flexões, e desembocando no ânus o reto (Figura 8). Neste trabalho foram analisados somente os segmentos S1 e S2 do intestino médio, pois, segundo Rodrigues e Menin (2008), estas são as porções mais importantes para o processo absorptivo. Como se pretende analisar a influencia do colostro bovino sobre a morfologia do epitélio intestinal, apenas a análise dos dois segmentos iniciais justifica-se. Na primeira porção do intestino dos peixes ocorre a máxima capacidade digestiva com elevada digestão e absorção dos nutrientes, enquanto na porção posterior (reto) ocorre principalmente a absorção de macromoléculas protéicas intactas (ABAURREA-EQUISOAÍN; OSTOS-GARRIDO, 1996; GEORGOPOULOU et al., 1988; KROGDAHL et al., 2003; OSTASZEWSKA et al., 2005).

A partir da análise descritiva da estrutura morfológica utilizando microscopia eletrônica de varredura não foram verificadas diferenças estruturais no epitélio intestinal dos peixes controle (0% CBL) comparativamente aos peixes alimentados com 10 ou 20% de CBL. Independente da dieta consumida houve diferença para a altura das dobras, estruturas que compõem o epitélio intestinal e projetam-se em direção ao lúmen, entre os segmentos intestinais. No intestino médio as dobras apresentaram-se estruturalmente maiores e mais complexas do que no reto (Figuras 9, 10, 11 e 12), sugerindo aumento da área de superfície de absorção no intestino médio. Esta característica, assim como também verificado por Faccioli et al. (2014) no ictiófago *Hemisorubim platyrhynchos*, esta relacionada com as funções fisiológicas inerente a cada compartimento digestivo. Nos dois intestinos analisados, de forma geral, houve como característica predominante a presença de dobras contínuas e em anastomose.

Entre os segmentos S1 e S2 do intestino médio foram verificadas diferenças morfológicas. No S1, houve maior padronização das dobras (Figura 9) com tamanhos similares e superfícies apicais arredondadas, enquanto no S2, as dobras apresentaram-se desuniformes, sendo que dobras altas e superfícies apicais longitudinais estavam intercaladas por uma ou duas camadas de dobras mais baixas também com alturas e conformações desuniformes e superfície apical arredondada (Figura 10). Por toda extensão do intestino foram visualizados

sulcos longitudinais pronunciados e sulcos transversais superficiais, sugerindo aumento da área de absorção (Figura 13). Neste estudo verificou-se, por vezes, despadronização das amostras, o que por vezes tornou difícil a caracterização destes tecidos. A mesma característica foi verificada por Seixas Filho et al. (2001) em espécimes de dourado (*Salminus brasiliensis*).

A mesma despadronização encontrada no intestino médio dos pacus amostrados neste trabalho, também foi verificada no segmento final do trato gastrintestinal, o reto. Este apresentou como característica um emaranhado de dobras desuniformes, predominância de superfícies apicais lisas e ausência de sulcos transversais (Figuras 11 e 12). A partir desta característica, sugere-se que o processo absorptivo neste segmento intestinal não é tão eficiente quanto no intestino médio. A presença de sulcos pelas vilosidades intestinais de leitões também foi verificada por Skrzypek et al. (2005) utilizando microscopia óptica e eletrônica de varredura. Características morfológicas semelhantes às encontradas no presente estudo foram encontradas em *Pseudophoxinus antalyae*, *Leporinus friderici* e *Leporinus taeniofasciatus* (ALBRECHT; FERREIRA; CARAMASCHI, 2001; CINAR; SENOL, 2006).



Figura 8 - Segmentos intestinais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

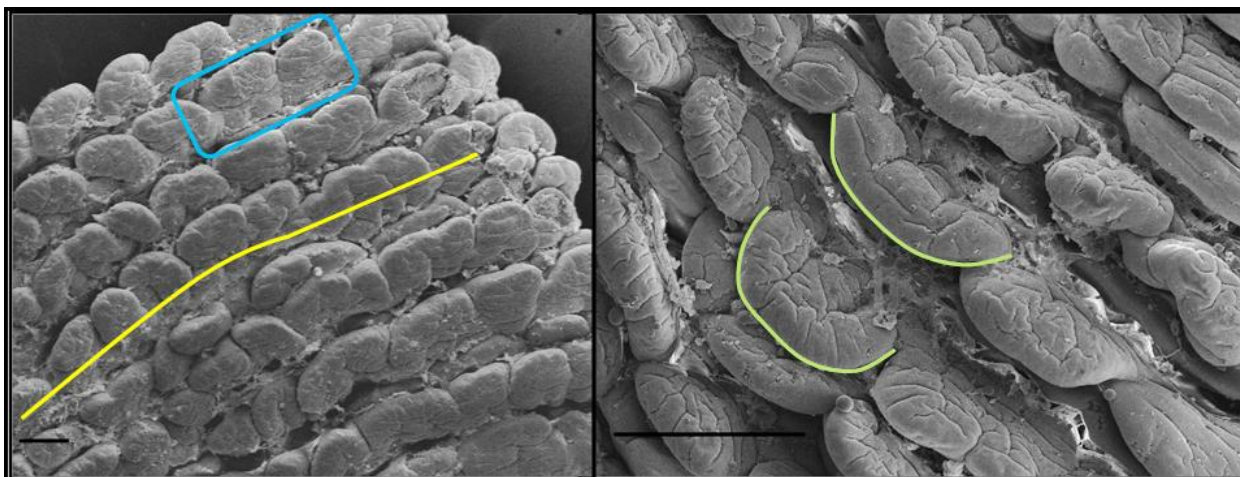


Figura 9 – Intestino médio, segmento S1 de juvenis de pacu: (A) dobras contínuas (linhas) e em anastomose (retângulo); (B) dobras com superfície apical arredondada (linhas). Barra= 200 $\mu$ m

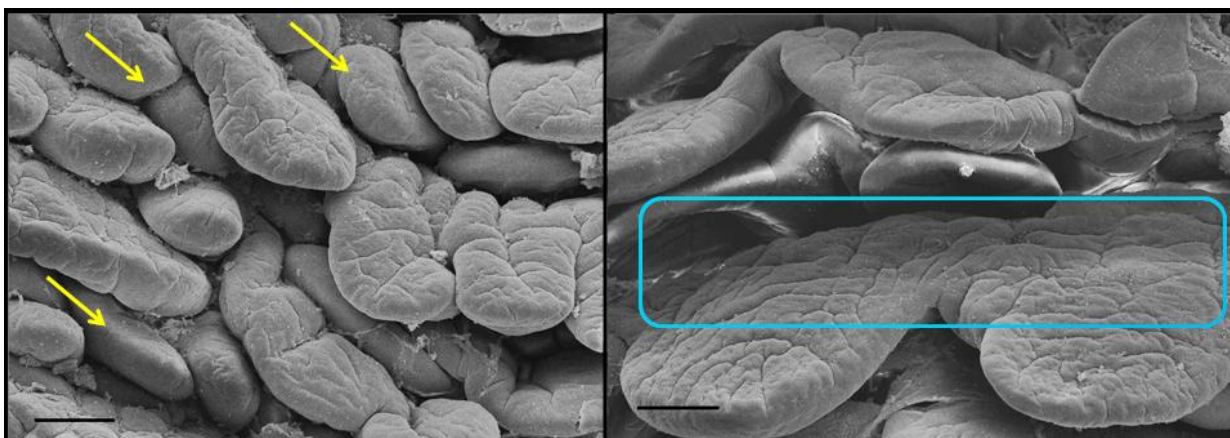


Figura 10 – Intestino médio, segmento S2 de juvenis de pacu, dobras altas contínuas, com proeminências na superfície apical, intercaladas por uma ou duas camadas de dobras mais baixas (setas) com alturas e conformações desuniformes e em anastomose (retângulo). Barra= 200 $\mu$ m

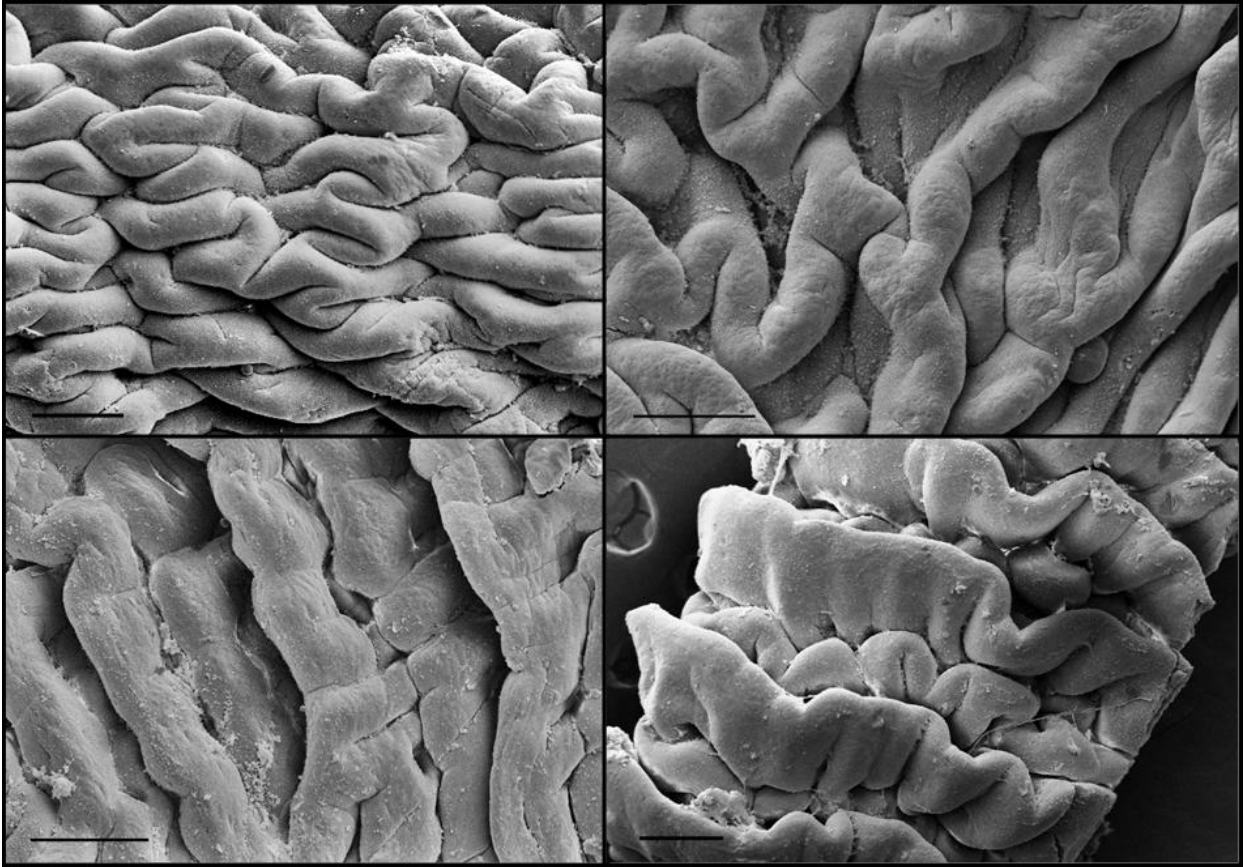


Figura 11 – Reto de juvenis de pacu caracterizado por um emaranhado de dobras desuniformes e superficies apicais predominantemente lisas. Barra= 300 $\mu$ m

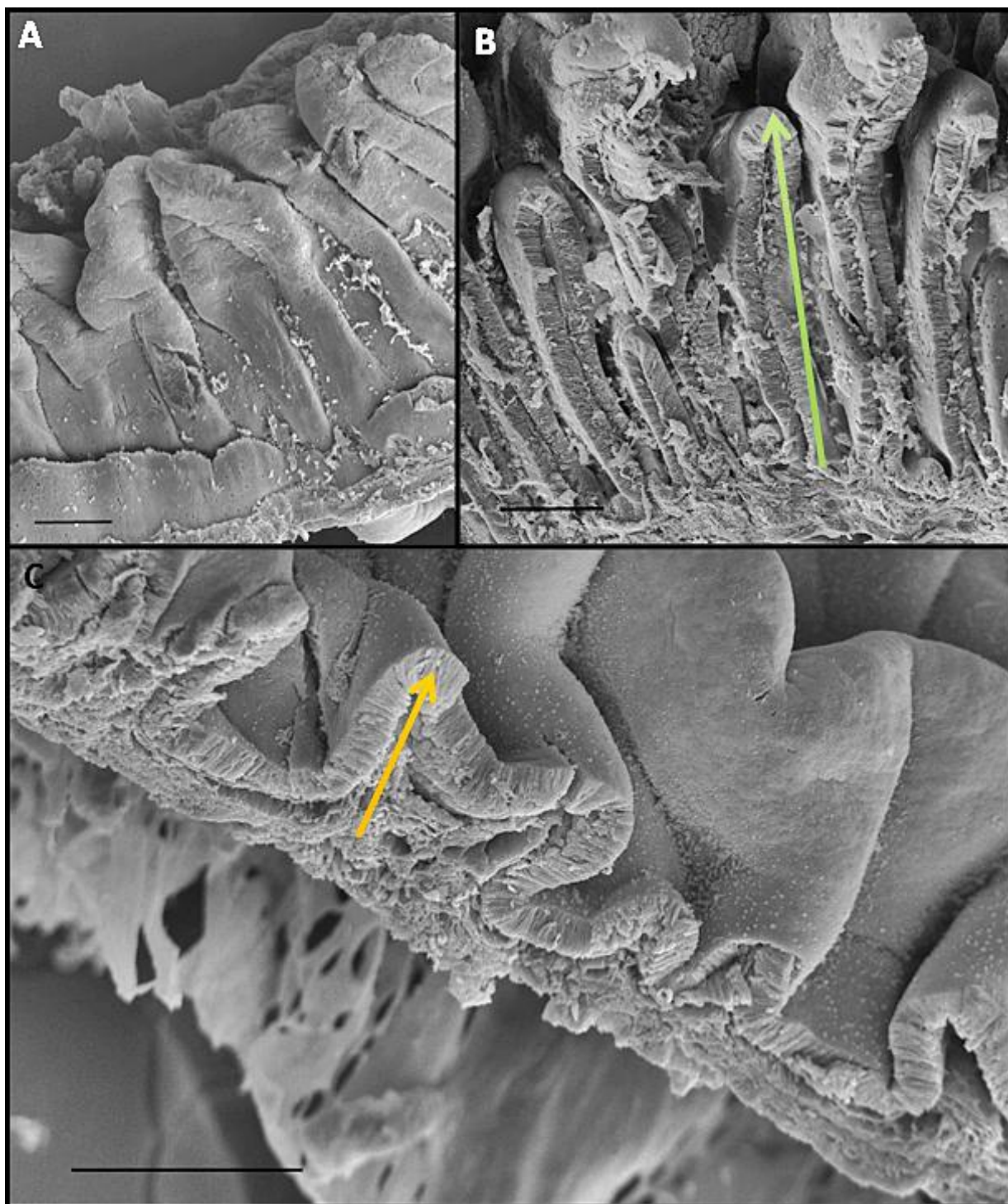


Figura 12 – (A) e (B) Dobras altas, em anastomose e complexas no intestino médio, segmento S1 e S2, respectivamente; (C) dobras baixas e menos complexas no reto de juvenis de pacu. Barra= 200 $\mu$ m

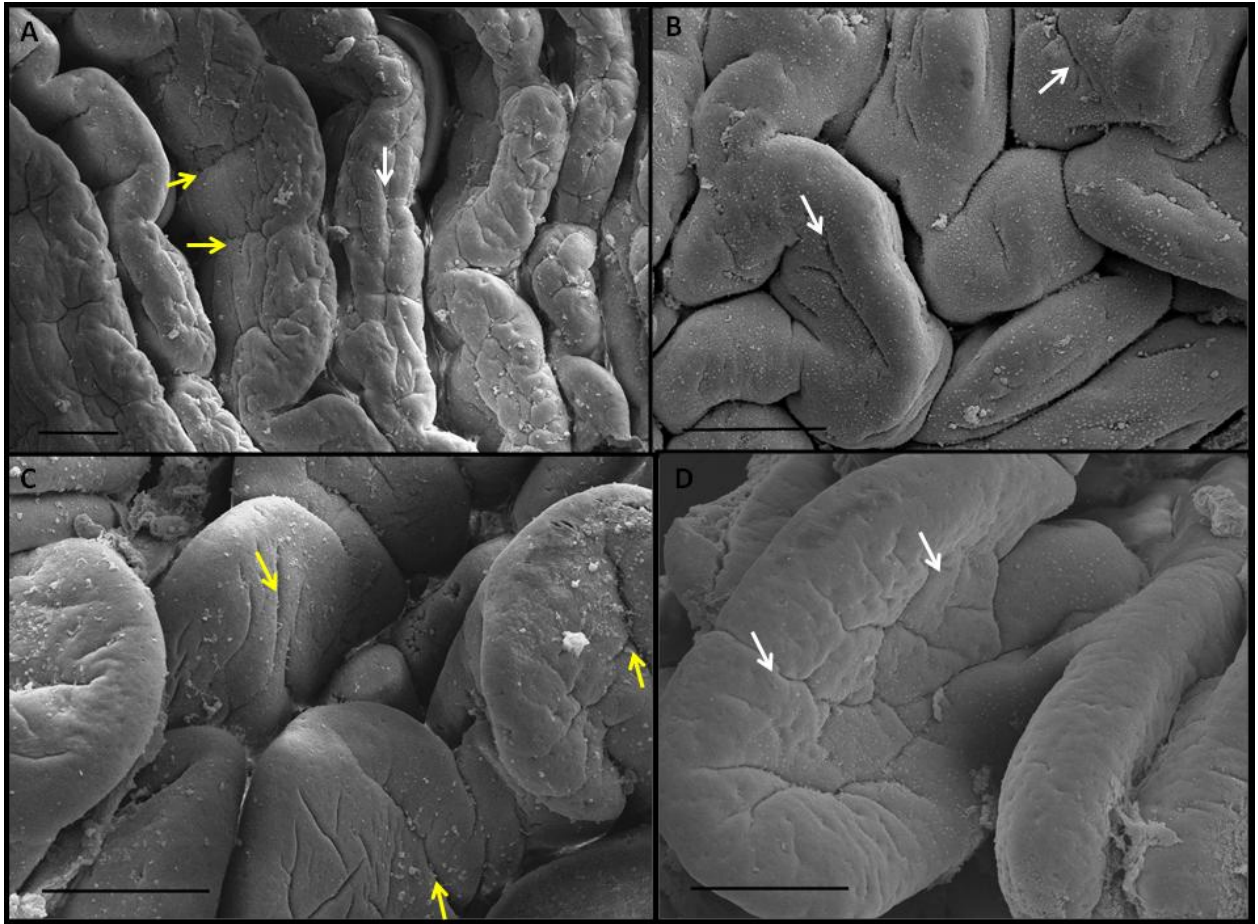


Figura 13 - Sulcos longitudinais (setas brancas) e transversais (setas amarelas) na porção apical das dobras do S1 (A), reto (B) e S2 (C) e (D) de juvenis de pacu. Barra= 200 $\mu$ m

O arranjo das dobras intestinais relaciona-se com a quantidade e velocidade de transporte do alimento pelo intestino (SEIXAS FILHO et al., 2001). Segundo sugerido pelos mesmos autores, há suposição de que o padrão longitudinal das dobras anastomosadas retarda o avanço do alimento em sentido aboral, possibilitando melhor aproveitamento e digestão dos nutrientes. Ainda, auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal e distensão das paredes do intestino conforme o alimento ingerido (SEIXAS FILHO et al., 2001). Com base nas características estruturais das dobras visualizadas em pacus neste trabalho, supõe-se que o intestino médio é o responsável por maior parte do processo de absorção de nutrientes, concordando com estudos anteriormente realizados.

Nos exemplares de pacus analisados, não foram verificadas criptas intestinais, as quais estão relacionadas aos processos de proliferação e renovação celular (BITTRICH et al., 2004; GODLEWSKI et al., 2005; NORDI et al., 2013). A ausência de criptas é uma característica comum aos teleósteos e, em função disso, sugere-se que as divisões mitóticas ocorrem na base das dobras por células indiferenciadas originando assim, novas células (SENA et al., 2012).

Zonas de extrusão celular (Figura 14), indicando que houve perda de células para renovação epitelial foram encontradas ao longo das dobras intestinais de pacu. O processo normal de apoptose e extrusão para o lúmen intestinal normalmente ocorre no topo das vilosidades em mamíferos (SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985; SKRYPEK et al., 2007). Contudo, assim como observado por Moretti et al. (2011), no intestino de cabritos recém-nascidos, este processo parece ocorrer ao longo das vilosidades, indicando que outros componentes que chegam a este segmento podem influenciar a integridade das células intestinais estimulando o processo apoptótico.

O epitélio da mucosa intestinal dos pacus analisados, assim como os demais animais, é formado basicamente por uma única camada de células epiteliais absorptivas denominadas enterócitos, intercalados por células caliciformes. Os enterócitos apresentaram formato colunar e longo, com uma desenvolvida camada de microvilosidades na porção apical (Figura 15). As células caliciformes no epitélio intestinal encontram-se dispostas entre as células absorptivas e são especializadas na produção de muco (DEPLANKE; GASKINS, 2001). Em pacu, estas células foram observadas juntamente à porção apical dos



enterócitos, como pequenos botões (por vezes expelindo muco para a luz intestinal) e rodeadas de células absorptivas (Figura 16). Adicionalmente a estes dois tipos celulares, considerando a estrutura, tamanho e localização, sugere-se a presença de *rodlet cells*, ou células bastonetes, no epitélio intestinal dos juvenis analisados neste trabalho (Figura 17). Estas são células glandulares endógenas presentes em vários órgãos, principalmente no epitélio do trato gastrintestinal e das brânquias (BORGES et al., 2010; DEZFULI et al., 2013; REITE; EVENSEN, 2006). A partir das análises microscópicas em juvenis de pacu, as células bastonetes foram visualizadas isoladas ou aglomeradas e, caracterizadas com formato oval, alongada e contendo uma cápsula fibrosa. Sugere-se da mesma forma, a presença de células do sistema de defesa infiltradas entre os enterócitos (Figura 18). Vacúolos de absorção também puderam ser visualizados (Figura 18).

Onze exemplares de pacu analisados, de um total de 36, apresentaram estruturas semelhantes a parasitos no intestino médio, independentemente da dieta, contendo ou não o colostro bovino, ou período experimental (Figura 19). Estes peixes foram mantidos durante todo o período experimental nos mesmos tanques, com temperatura controlada e recebendo a mesma água e alimento que os demais. Com isso, sugere-se que esta pode ser uma condição normal nesta espécie de peixe. Francesquini et al. (2013) verificaram ocorrência de infecções parasitárias durante as diferentes fases de produção, em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do híbrido patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*). Os pesquisadores encontraram 63% dos peixes na fase de reprodução e larvicultura infectados por pelo menos uma espécie de parasita, e durante a engorda e no pesque-pague houve prevalência de 100%. Os parasitas encontrados no epitélio intestinal de pacu, não foram classificados e diferenciados.

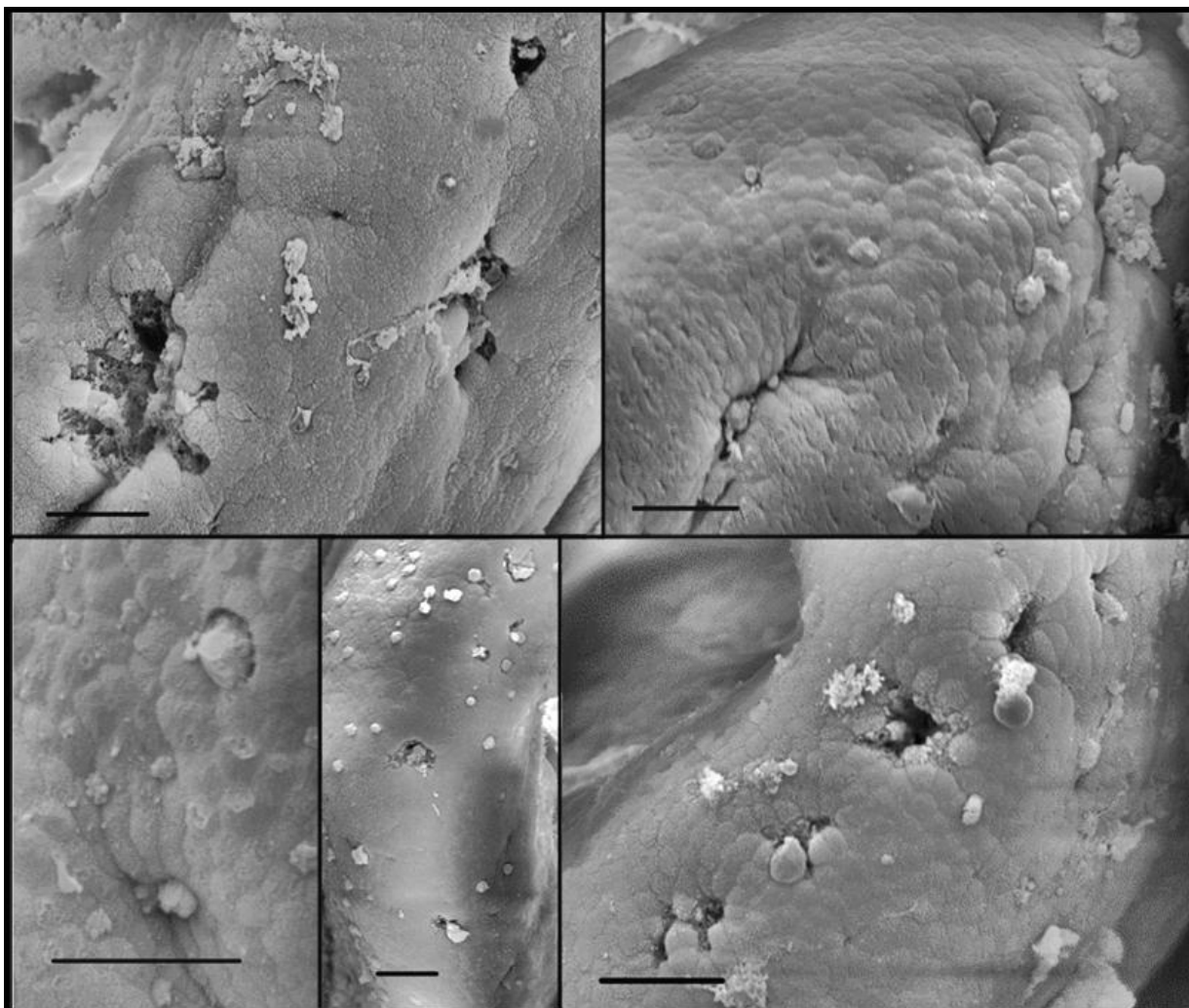


Figura 14 - Processo de extrusão celular no intestino médio de juvenis de pacu. Barra= 20 $\mu$ m

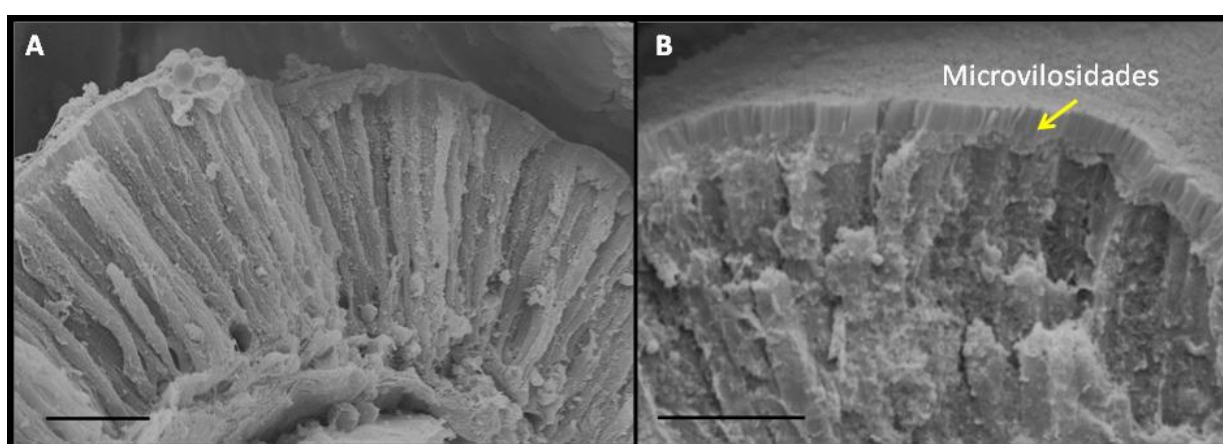


Figura 15 – Intestino médio de juvenis de pacu: (A) enterócitos colunares, barra= 10 $\mu$ m; (B) proeminente camada de microvilosidades (seta). Barra= 20 $\mu$ m

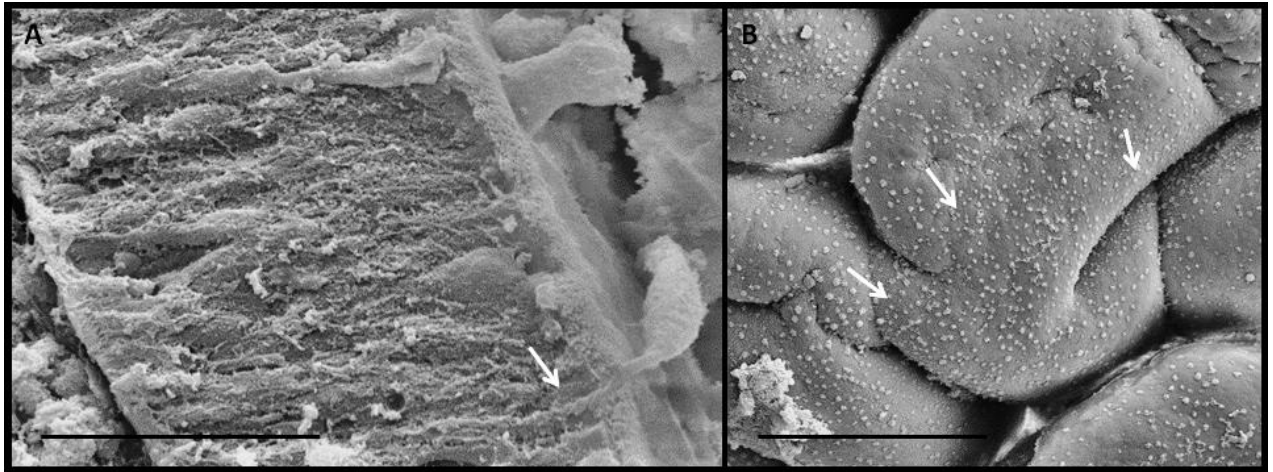


Figura 16 – Reto de juvenis de pacu: (A) célula caliciforme expelindo muco (seta) no intestino médio, barra=20  $\mu\text{m}$ ; (B) caliciformes espalhadas pela superfície externa (setas), barra= 100 $\mu\text{m}$

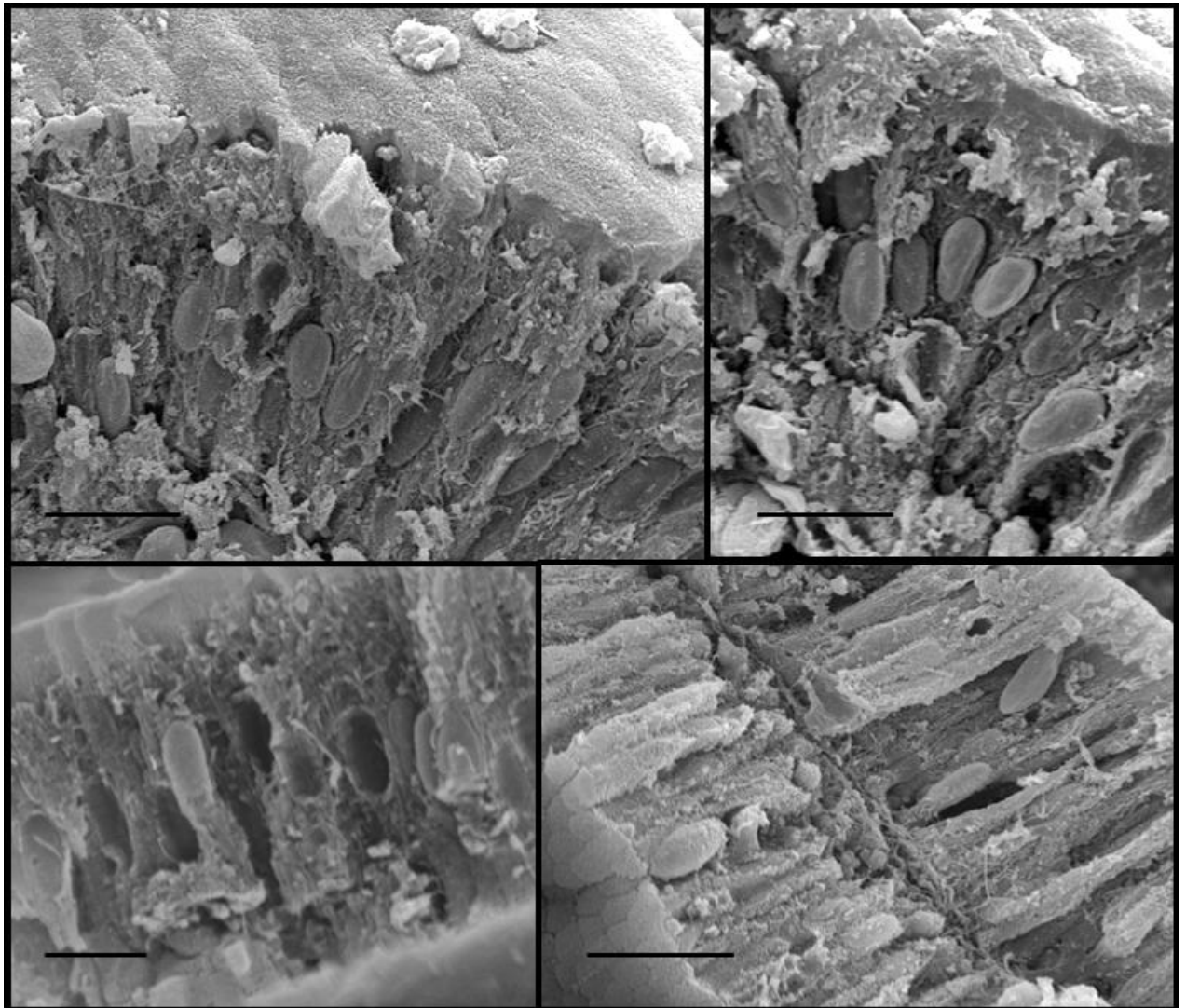


Figura 17 – Intestino médio de juvenis de pacu, apresentando células bastonetes isoladas ou aglomeradas. Barra= 20 $\mu\text{m}$

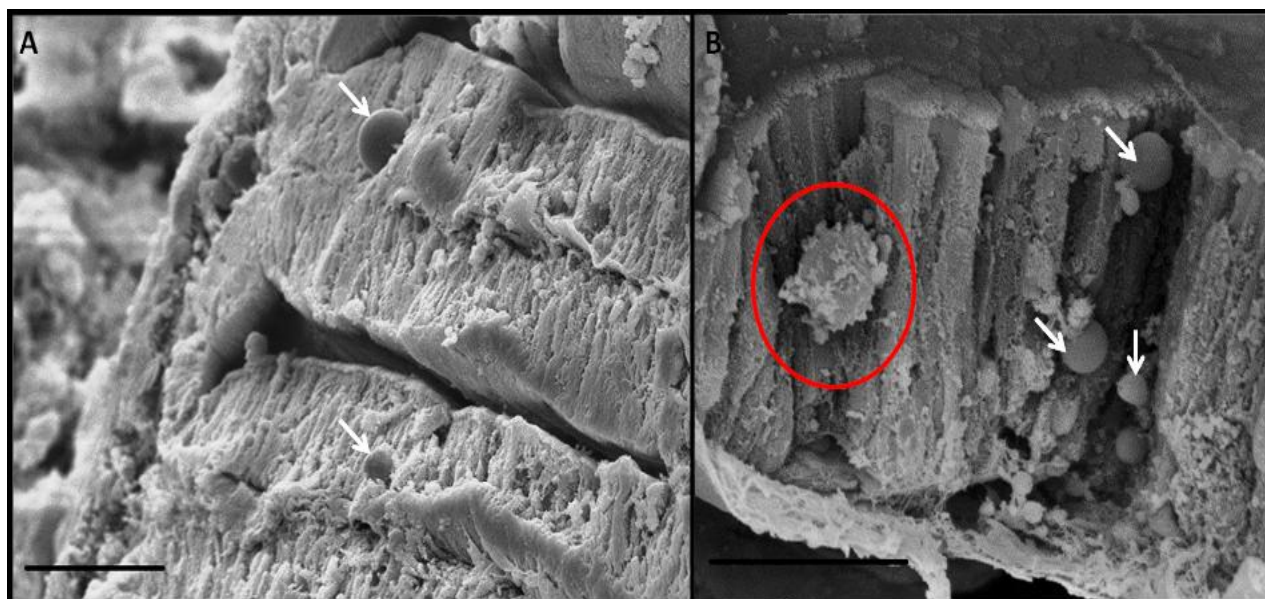


Figura 18 – Intestino médio de juvenis de pacu: (A) e (B) vacúolos de absorção (setas); (B) célula de defesa (círculo). Barra= 20 $\mu$ m

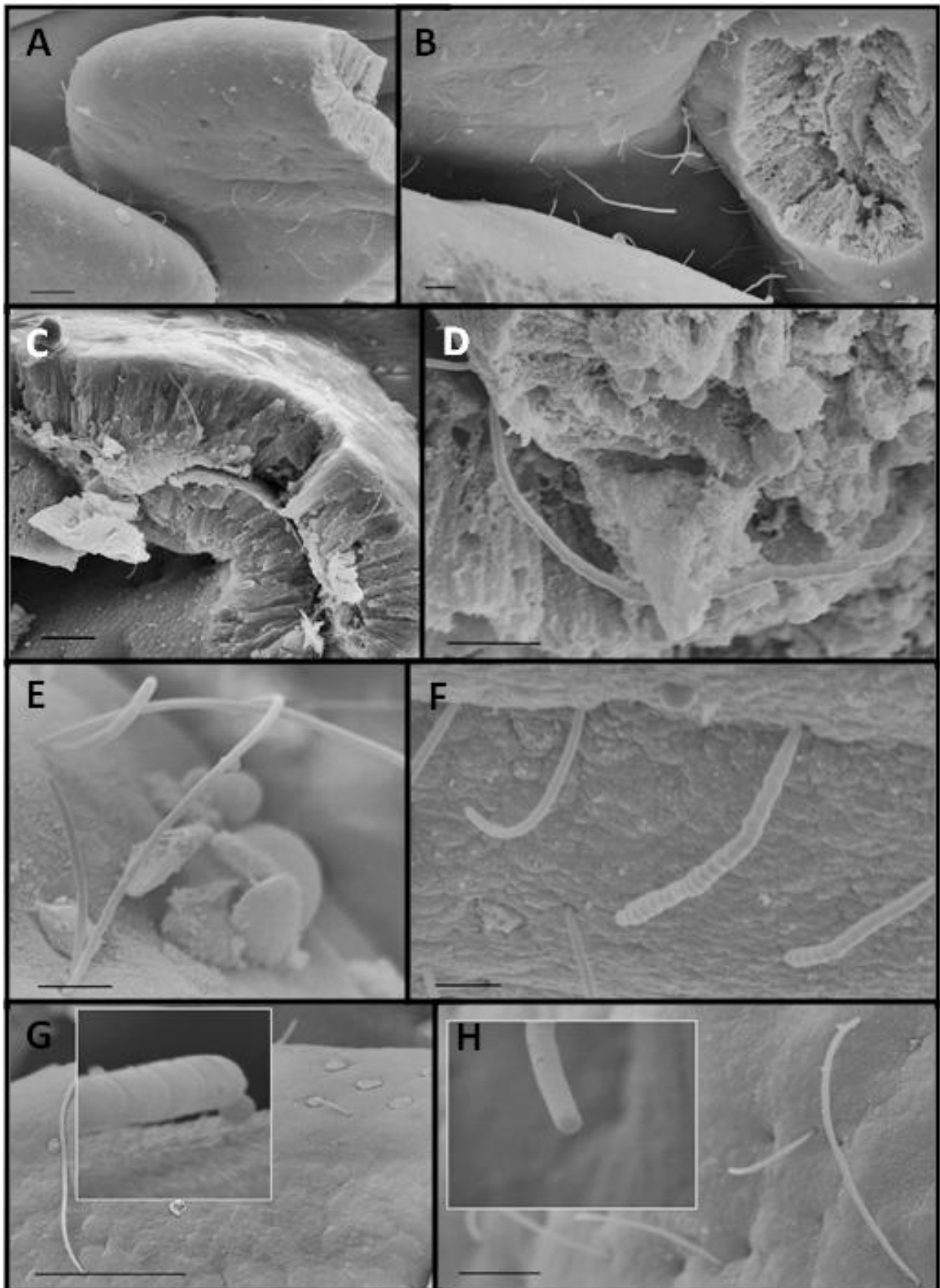


Figura 19 – Parasitos no intestino médio de juvenis de pacu (A), (B) e (C), barra= 20 $\mu$ m; (D), barra= 10 $\mu$ m; (E) e (F), barra= 5 $\mu$ m; (G) e (H), barra=2 $\mu$ m

O estudo das alterações na estrutura da mucosa do trato gastrointestinal é frequentemente utilizado e útil para o entendimento das funções absorptivas durante as diferentes fases do desenvolvimento. Da mesma forma é utilizado como parâmetro de avaliação em resposta a fatores ambientais ou alimentos fornecidos aos animais. A ausência de diferenças morfológicas no epitélio intestinal de pacus alimentados ou não com colostro bovino liofilizado indica que a fonte alternativa de proteínas não causou prejuízo ao epitélio destes peixes e, conseqüentemente, ao processo absorptivo. Assim, os resultados deste trabalho sugerem que o colostro bovino pode ser utilizado como fonte protéica de alta qualidade aos pacus juvenis.

#### **4.4 Atividade enzimática no tecido intestinal do pacu**

A atividade das enzimas peptidases (aminopeptidase N, dipeptidil peptidase IV e aminopeptidase A) e dissacaridases (maltase e sacarase) no intestino médio e reto de pacu, expressas em U/ grama de tecido, são apresentadas na Tabela 6.

A atividade da aminopeptidase N no intestino de pacu diferiu entre dieta e período experimental ( $P < 0,05$ ), sendo superior nos peixes que ingeriram as dietas contendo 10% e 20% de inclusão de CBL e, da mesma forma, nos peixes amostrados aos 30 dias. As enzimas dipeptidil peptidase IV e aminopeptidase A apresentaram atividades diferentes entre os períodos ( $P < 0,05$ ), sendo que a maior atividade da dipeptidil peptidase IV foi verificada aos 30 dias, enquanto que para aminopeptidase A aos 60 dias. Não houve correlação significativa entre as peptidases ( $P > 0,05$ ).

A atividade das enzimas maltase e sacarase no tecido entérico diferiu entre os períodos ( $P < 0,05$ ), com valores superiores aos 30 dias. Houve correlação positiva de  $r = 0,86$  entre as duas dissacaridases analisadas ( $P = 0,001$ ). Ao comparar todas as enzimas, foi verificada correlação negativa entre aminopeptidase A e maltase e ( $r = - 0,57$ ) ( $P = 0,03$ ).

Tabela 6 - Atividade enzimática intestinal (U/grama de tecido) (média ± erro padrão) de juvenis de pacu alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Aminopectidase N</b>							
30	1,33 ± 0,07	1,80 ± 0,15	1,50 ± 0,60	1,69 ± 0,14	*	*	N.S.
60	0,84 ± 0,01	1,44 ± 0,02	1,18 ± 0,01	1,19 ± 0,09			
<b>Média Geral</b>	1,08 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,20 <sup>a</sup>				
<b>Dipeptidil peptidase IV</b>							
30	3,55 ± 0,01	3,37 ± 0,18	3,41 ± 0,24	3,43 ± 0,10	N.S.	*	N.S.
60	2,99 ± 0,50	3,36 ± 0,05	2,56 ± 0,18	2,97 ± 0,17			
<b>Média Geral</b>	3,26 ± 0,26	3,37 ± 0,08	2,98 ± 0,23				
<b>Aminopectidase A</b>							
30	1,14 ± 0,07	1,17 ± 0,04	1,42 ± 0,03	1,25 ± 0,05	N.S.	*	N.S.
60	1,49 ± 0,12	1,56 ± 0,12	1,61 ± 0,37	1,55 ± 0,06			
<b>Média Geral</b>	1,31 ± 0,12	1,36 ± 0,10	1,46 ± 0,05				
<b>Maltase</b>							
30	0,93 ± 0,07	1,04 ± 0,07	0,98 ± 0,11	0,99 ± 0,05	N.S.	*	N.S.
60	0,36 ± 0,08	0,53 ± 0,01	0,75 ± 0,03	0,61 ± 0,09			
<b>Média Geral</b>	0,65 ± 0,17	0,78 ± 0,12	0,92 ± 0,08				
<b>Sacarase</b>							
30	0,61 ± 0,04	0,82 ± 0,22	0,75 ± 0,03	0,74 ± 0,08	N.S.	*	N.S.
60	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,06	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,03			
<b>Média Geral</b>	0,37 ± 0,14	0,47 ± 0,19	0,55 ± 0,13				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; ; <sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre as dietas pelo teste de Tukey; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período; U – um µmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C

Estudos enzimáticos são determinantes quando se pretende a utilização de fontes alternativas alimentares para peixes em crescimento, pois, comportam-se como indicadores da competência fisiológica digestiva. Teleósteos, ao contrário dos mamíferos, apresentam alta capacidade digestiva desde os primeiros estágios do desenvolvimento (KUZ'MINA, 1996; ZAMBONINO INFANTE; CAHU; PERES, 1997). No momento da eclosão, mesmo antes do início da alimentação exógena, já são encontradas proteases e carboidrases no intestino, provenientes do estômago, pâncreas e intestino (KUZ'MINA, 1996; TENGJAROENKUL et al., 2002; ZOUITEN et al., 2008). A presença das enzimas no trato gastrintestinal, relacionadas ao metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios sugere preparação do organismo para maximização da utilização destes componentes alimentares desde o início da vida, perdurando, com variação na

atividade, durante todo desenvolvimento dos peixes (TENGJAROENKUL et al., 2002). Nos intestinos dos juvenis de pacu avaliados no presente estudo verificou-se a atividade das cinco enzimas estudadas (aminopeptidase N, dipeptidil aminopeptidase IV, aminopeptidase A, maltase e sacarase). A produção das enzimas é variável e influenciada pelo tamanho do intestino, fase de crescimento, alimento consumido e hábito alimentar (GIRI et al., 2000; HARPAZ; UNI, 1999; HAKIN et al., 2006; KROGDAHL et al., 2003; KUPERMAN; KUZ'MINA, 1994; ZAMBONINO INFANTE; CAHU; PERES, 1997).

O colostro bovino, além de apresentar elevadas concentrações de proteínas e fatores de crescimento, possui em sua composição fatores que previnem a degradação protéica como o fator inibidor de tripsina (CHRISTENSEN et al., 1995; PANDEY et al., 2011). No presente estudo, as três peptidases e duas dissacaridasas presentes no intestino apresentaram comportamento similar frente às dietas fornecidas, exceto para aminopeptidase N. Elevada presença desta enzima foi verificada nos peixes alimentados com os dois níveis de inclusão de CBL, o que pode estar relacionado ao aminoácido leucina presente no colostro. Moretti et al. (2012a), sugerem que ocorre aumento progressivo da atividade de peptidases na membrana da célula de cabritos recém-nascidos em resposta a vários estímulos, principalmente em relação às proteínas presentes nos alimentos. Estudos anteriores de Kuiken e Pearson (1949), Zándoki et al. (2006) e Csapó et al. (2009), relacionaram a composição em aminoácidos no colostro de vacas de diversas raças e verificaram alta concentrações de leucina, substrato para a peptidase em questão, variando entre 8,1 a 9,1% no conteúdo de proteína bruta do colostro. Com isso, ao saber que o organismo dos peixes não produz este aminoácido essencial, que a leucina é utilizada como substrato para a identificação da atividade da aminopeptidase e, após o fornecimento da dieta contendo CBL a atividade da aminopeptidase N nos pacus aumentou, sugere-se relação com a leucina presente no colostro. A maior presença da aminopeptidase N quando se usou fonte protéica à base de farinha de peixe nativa foi verificada em *sea bass* (*Dicentrarchus labrax*) e, menor presença da enzima em peixes alimentados com farinha de peixe hidrolisada (composta com 75% de di e tripeptídeos) (ZAMBONINO INFANTE; CAHU; PERES, 1997).

Entre os períodos experimentais, houve diminuição na atividade enzimática aos 60 dias, exceto para a aminopeptidase A, que apresentou elevada



atividade. Kuz'mina (1996), verificou que a atividade total enzimática relativa ao peso corporal (g) em *perch* (*Perca fluviatilis* L.) e *roach* (*Rutilus rutilus* L.) foi maior nos estágios iniciais de vida, decrescendo em peixes maiores. Da mesma forma, a queda na atividade das enzimas verificadas neste estudo pode estar relacionada ao maior tamanho do intestino neste período quando se registrou crescimento do peixe de aproximadamente 107% entre o início do período experimental e 60 dias.

De acordo com Zambonino-Infante e Cahu (2001), a variação na atividade enzimática durante o período estudado está relacionada com a estrutura físico-morfológica do intestino durante os processos de digestão e absorção. Anatomicamente, o intestino dos peixes mais velhos difere do intestino dos mais novos, apresentando maior extensão. Da mesma forma, peixes onívoros, ao contrário dos carnívoros, apresentam intestino mais longo possibilitando maior contato dos nutrientes com as enzimas (HIDALGO; UREA; SANS, 1999). Em função da maior área intestinal é possível que as partículas alimentares sejam quebradas lentamente em frações menores para a absorção, sem a necessidade de elevada produção enzimática para a digestão.

A atividade das dissacaridases, maltase e sacarase, no epitélio intestinal de pacus, não diferiu entre as dietas fornecidas, contendo ou não colostro bovino, como fonte parcial de proteína. Entre os períodos houve variação na atividade destas enzimas, com maior valor aos 30 dias decrescendo significativamente até os 60 dias. Este resultado concorda com o estudo de Kuz'mina (1996), que encontrou redução na atividade das enzimas que degradam carboidratos com a idade, em quatro espécies de peixes, com diferentes hábitos alimentares. Segundo o mesmo autor, esta variação está relacionada ao comportamento, preferência alimentar e à composição do alimento.

Considerando o pacu um peixe de hábito alimentar onívoro, esperava-se maior presença de enzimas que degradam carboidratos, assim como verificado em peixes onívoros e herbívoros (HARPAZ; UNI, 1999). Contudo, neste trabalho observou-se maior presença de proteinases em comparação às dissacaridases, comportamento provavelmente relacionado com quantidade de proteína fornecida (320 g/kg de PB) ao pacu. Aumento da relação protease/carboidrase durante o crescimento em espécies de peixes com hábitos alimentares diferentes *Pike* (*Esox lucius* L. - predador), *perch* (*Perca fluviatilis* L. - predador

facultativo/bentófago), *bleak* (*Abramis brama* L. - bentófago) e *roach* (*Rutilus rutilus* L. - bentófago) também foi verificado por Kuz'mina (1996). As proteínas vegetais são mais difíceis para digerir do que as proteínas de origem animal e, apesar dos onívoros apresentarem menos enzimas proteolíticas do que os carnívoros há necessidade de melhor aproveitamento das proteínas, justificando a maior presença das enzimas que as degradam (HIDALGO; UREA; SANS, 1999).

A elevada presença da maltase e sacarase aos 30 dias de experimento, correlacionadas entre si ( $r = 0,865$ ,  $p < 0,0001$ ), no intestino de pacu, indica a capacidade destes peixes em utilizar carboidratos durante a fase juvenil. Tilápias (*Oreochromis niloticus* L.), peixe também de hábito alimentar onívoro, possuem plena capacidade em utilizar carboidratos desde a eclosão (TENGGAROEK et al., 2002).

#### **4.5 Concentração de proteína total, DNA e RNA total nos tecidos intestinal, hepático e muscular de pacu**

A concentração de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no intestino dos juvenis de pacu, são apresentadas na Tabela 7. Houve diferença apenas para a razão proteína/RNA entre os períodos experimentais ( $P < 0,05$ ), sendo o maior valor verificado nos peixes amostrados aos 30 dias.

Tabela 7 - Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média ± erro padrão) no intestino de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	109,60 ± 6,10	113,36 ± 12,12	118,57 ± 19,29	114,37 ± 7,67	N.S.	N.S.	N.S.
60	113,15 ± 16,23	104,27 ± 7,21	117,55 ± 10,10	111,47 ± 5,55			
<b>Média Geral</b>	111,37 ± 7,15	108,82 ± 6,63	118,06 ± 9,74				
<b>DNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,10 ± 0,08	0,92 ± 0,03	0,99 ± 0,24	0,99 ± 0,08	N.S.	N.S.	N.S.
60	1,17 ± 0,02	1,02 ± 0,12	1,35 ± 0,19	1,18 ± 0,09			
<b>Média Geral</b>	1,14 ± 0,04	0,97 ± 0,06	1,17 ± 0,16				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	3,79 ± 0,46	3,03 ± 0,09	3,30 ± 0,46	3,32 ± 0,21	N.S.	N.S.	N.S.
60	3,75 ± 0,20	4,17 ± 0,49	4,11 ± 0,62	4,02 ± 0,27			
<b>Média Geral</b>	3,77 ± 0,21	3,57 ± 0,33	3,71 ± 0,39				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	106,13 ± 17,78	127,40 ± 15,86	127,72 ± 17,87	122,20 ± 9,21	N.S.	N.S.	N.S.
60	105,09 ± 14,98	127,50 ± 31,52	89,55 ± 9,76	107,65 ± 12,79			
<b>Média Geral</b>	105,61 ± 9,50	127,44 ± 15,78	108,63 ± 12,48				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	30,25 ± 1,37	35,95 ± 3,47	35,87 ± 1,14	34,49 ± 1,53	N.S.	*	N.S.
60	31,25 ± 1,97	25,36 ± 1,25	30,47 ± 2,79	28,74 ± 1,46			
<b>Média Geral</b>	30,75 ± 1,02	30,65 ± 2,89	33,17 ± 1,81				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	3,72 ± 0,90	3,64 ± 0,18	3,55 ± 0,48	3,63 ± 0,24	N.S.	N.S.	N.S.
60	3,54 ± 0,29	4,94 ± 1,37	3,10 ± 0,14	3,90 ± 0,55			
<b>Média Geral</b>	3,63 ± 0,39	4,29 ± 0,68	3,33 ± 0,25				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A concentração de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no fígado dos juvenis de pacus são apresentadas na Tabela 8. Diferença significativa não foi observada para as variáveis no tecido hepático (P>0,05), entre as dietas ou períodos experimentais.

Tabela 8 - Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média  $\pm$  erro padrão) no fígado de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	168,29 $\pm$ 1,09	170,48 $\pm$ 7,85	157,15 $\pm$ 12,38	164,93 $\pm$ 5,33	N.S.	N.S.	N.S.
60	163,99 $\pm$ 16,88	167,18 $\pm$ 7,87	159,32 $\pm$ 18,20	163,50 $\pm$ 7,35			
<b>Média Geral</b>	166,14 $\pm$ 7,01	168,83 $\pm$ 5,03	158,24 $\pm$ 9,86				
<b>DNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,52 $\pm$ 0,06	1,55 $\pm$ 0,05	1,38 $\pm$ 0,15	1,48 $\pm$ 0,06	N.S.	N.S.	N.S.
60	1,56 $\pm$ 0,15	1,57 $\pm$ 0,12	1,44 $\pm$ 0,09	1,52 $\pm$ 0,06			
<b>Média Geral</b>	1,54 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,06	1,41 $\pm$ 0,08				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	4,32 $\pm$ 0,40	2,59 $\pm$ 0,29	3,55 $\pm$ 0,39	3,10 $\pm$ 0,26	N.S.	N.S.	N.S.
60	3,61 $\pm$ 0,01	3,41 $\pm$ 0,09	3,15 $\pm$ 0,20	3,37 $\pm$ 0,10			
<b>Média Geral</b>	3,40 $\pm$ 0,33	3,00 $\pm$ 0,23	3,35 $\pm$ 0,21				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	114,56 $\pm$ 6,51	109,70 $\pm$ 3,56	121,98 $\pm$ 19,97	115,52 $\pm$ 7,05	N.S.	N.S.	N.S.
60	109,16 $\pm$ 21,22	107,59 $\pm$ 7,61	113,75 $\pm$ 16,44	110,29 $\pm$ 7,23			
<b>Média Geral</b>	111,86 $\pm$ 9,19	108,65 $\pm$ 3,79	117,86 $\pm$ 11,71				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	48,60 $\pm$ 4,77	73,74 $\pm$ 12,40	47,35 $\pm$ 3,96	59,05 $\pm$ 6,47	N.S.	N.S.	N.S.
60	45,68 $\pm$ 4,34	49,31 $\pm$ 2,67	53,69 $\pm$ 11,37	50,05 $\pm$ 4,09			
<b>Média Geral</b>	50,14 $\pm$ 5,39	61,53 $\pm$ 7,88	50,52 $\pm$ 5,57				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	2,88 $\pm$ 0,14	1,68 $\pm$ 0,25	2,57 $\pm$ 0,67	2,13 $\pm$ 0,30	N.S.	N.S.	N.S.
60	2,36 $\pm$ 0,23	2,19 $\pm$ 0,12	2,22 $\pm$ 0,23	2,25 $\pm$ 0,10			
<b>Média Geral</b>	2,25 $\pm$ 0,27	1,94 $\pm$ 0,17	2,40 $\pm$ 0,32				

N.S.-  $P > 0,05$ ; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A concentração de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no músculo dos juvenis de pacus são apresentadas na Tabela 9. Foi observada diferença entre os tratamentos para a razão proteína/RNA ( $P < 0,05$ ) sendo o maior valor encontrado nos peixes que receberam dieta contendo 10% de inclusão de CBL. Houve diferença entre os períodos experimentais para a concentração de DNA, RNA e as razões proteína/DNA, proteína/RNA e RNA/DNA ( $P < 0,05$ ). A concentração de RNA e as razões proteína/DNA e RNA/DNA no músculo dos peixes diminuíram aos 60 dias, enquanto a concentração de DNA e a razão proteína/RNA aumentaram neste período.

Tabela 9 - Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média  $\pm$  erro padrão) no músculo de juvenis de pacu alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado, aos 30 e 60 dias experimentais.

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	111,80 $\pm$ 16,59	113,13 $\pm$ 3,36	103,30 $\pm$ 10,57	109,12 $\pm$ 5,09	N.S.	N.S.	N.S.
60	117,68 $\pm$ 15,16	116,30 $\pm$ 3,55	99,68 $\pm$ 7,70	110,41 $\pm$ 5,08			
<b>Média Geral</b>	114,74 $\pm$ 9,33	114,71 $\pm$ 2,30	101,50 $\pm$ 5,91				
<b>DNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,00 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,20	1,06 $\pm$ 0,09	N.S.	*	N.S.
60	1,74 $\pm$ 0,05	1,66 $\pm$ 0,10	1,62 $\pm$ 0,15	1,66 $\pm$ 0,06			
<b>Média Geral</b>	1,37 $\pm$ 0,21	1,45 $\pm$ 0,12	1,28 $\pm$ 0,19				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,32 $\pm$ 0,17	1,03 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,07	N.S.	*	N.S.
60	0,78 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,04			
<b>Média Geral</b>	1,05 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,12				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	126,42 $\pm$ 13,79	98,47 $\pm$ 12,00	146,03 $\pm$ 47,28	123,29 $\pm$ 17,96	N.S.	*	N.S.
60	67,96 $\pm$ 9,99	73,37 $\pm$ 6,10	63,07 $\pm$ 8,52	68,16 $\pm$ 4,26			
<b>Média Geral</b>	97,20 $\pm$ 18,25	85,92 $\pm$ 8,23	104,55 $\pm$ 28,38				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	90,48 $\pm$ 6,72	110,75 $\pm$ 6,47	81,87 $\pm$ 8,73	94,85 $\pm$ 6,12	*	*	N.S.
60	153,80 $\pm$ 3,54	173,85 $\pm$ 12,41	128,30 $\pm$ 0,88	151,76 $\pm$ 8,53			
<b>Média Geral</b>	122,14 $\pm$ 18,54 <sup>b</sup>	142,30 $\pm$ 15,44 <sup>a</sup>	105,09 $\pm$ 11,10 <sup>b</sup>				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	1,49 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,15	1,81 $\pm$ 0,59	1,39 $\pm$ 0,25	N.S.	*	N.S.
60	0,45 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,03			
<b>Média Geral</b>	0,97 $\pm$ 0,31	0,66 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,40				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; <sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre as dietas pelo teste de Tukey; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A avaliação de alimentos que atuam sobre o desenvolvimento do epitélio intestinal, atividade do fígado e crescimento do tecido muscular, é necessária para o entendimento da fisiologia dos peixes, contribuindo adicionalmente para a melhoria do processo de produção. Nos teleósteos, a condição nutricional influencia diretamente a atividade celular nos tecidos corporais e, da mesma forma, o crescimento durante o desenvolvimento (BUCKLEY; CALDARONE; ONG, 1999; GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003). Dentre as técnicas utilizadas para avaliar a condição, a análise da concentração de proteína total, DNA, RNA e suas razões, que são importantes índices bioquímicos relacionados à atividade

celular nos tecidos, têm sido utilizada (CHÍCHARO; CHÍCHARO, 2008; GWAK; TANAKA, 2001; GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003; PAULETTI et al., 2007a, 2007b; RAŠKOVIĆ et al., 2011; SIVARAMAN et al., 2009; XIONG et al., 2011).

O colostro bovino, fonte protéica de origem animal que apresenta alta qualidade e peptídeos bioativos como o IGF-I, ao ser fornecido para peixes cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) em fase de crescimento, estimulou a atividade das células absortivas intestinais, hepáticas e musculares e modificou positivamente o crescimento (PAULETTI et al., 2007b). No atual trabalho, o fornecimento de colostro bovino para pacu juvenil, não influenciou nenhum dos indicadores de atividade celular no tecido entérico e hepático ( $P>0,05$ ).

A concentração de DNA, que reflete a densidade celular nos tecidos através do número de células, é relativamente constante dentro da mesma espécie, pois, idênticos genomas contêm quantidades similares de DNA nuclear carregando a mesma informação genética (CHÍCHARO et al., 2007). Enquanto isso, a concentração de RNA, indicativo de síntese protéica nos tecidos, é variável conforme o estado fisiológico, fases do desenvolvimento e em diferentes condições ambientais (BUCKLEY; CALDARONE; ONG, 1999; MALZAHN; CLEMMESSEN; ROSENTHAL, 2003). A similaridade observada entre a maioria dos indicadores de atividade celular entre dieta e período experimental, de acordo com Moretti et al. (2014a), indica equivalência entre taxas de proliferação e apoptose nestes tecidos contribuindo assim, para a manutenção da densidade celular.

No epitélio intestinal verificou-se diminuição para a razão proteína/RNA ( $P<0,05$ ), entre 30 e 60 dias, refletindo a elevada atividade de tradução de proteínas no primeiro período analisado. O processo de síntese de proteínas no intestino parece não estar envolvido diretamente com o crescimento dos peixes e sim, relacionado com os processos absortivos de nutrientes, oriundos da alimentação e metabolismo. Este fato pode ser confirmado pela correlação negativa entre a razão proteína/RNA no intestino, comprimento e peso corporal dos peixes, com valores de  $r = - 0,57$  e  $r = - 0,54$  ( $P=0,02$ ), respectivamente.

Entre os três tecidos avaliados, o tecido muscular foi o mais influenciado pela utilização do colostro bovino liofilizado como fonte parcial de proteína e pelos períodos avaliados. Os peixes que se alimentaram da dieta contendo 10% de inclusão de CBL apresentaram maior valor para a razão proteína/RNA, indicando

elevada atividade de tradução de proteínas com possível síntese e depósito destas no músculo. Considerando que a proteína é uma importante fonte de energia, principalmente durante períodos de jejum e que fornece os aminoácidos para a síntese de novas proteínas (LOUGHNA; GOLDSPINK, 1984), pode-se inferir que os peixes que ingeriram dieta com 10% CBL apresentaram melhor condição nutricional do que os demais.

Aos 60 dias experimentais, verificou-se no músculo do pacu elevada quantidade de células (concentração de DNA), e, da mesma forma, maior quantidade de proteína sendo traduzida (proteína/RNA), variáveis positivamente correlacionadas ( $r = 0,81$ ,  $P < 0,05$ ). Correlação positiva também foi encontrada para DNA e proteína/RNA com comprimento ( $r = 0,80$  e  $r = 0,76$ ) e peso corporal ( $r = 0,81$  e  $r = 0,74$ ) ( $P < 0,001$ ) para DNA e para a razão proteína/RNA, respectivamente. Acompanhando o padrão de redução na razão proteína/DNA, houve diminuição para RNA/DNA, indicando que a síntese de proteína esta relacionada com a concentração de RNA, assim como também verificado em *Japanese flounder (Paralichthys olivaceus)* por Gwak, Tsusaki e Tanaka (2003). Sugere-se com base nestes resultados a predominância de crescimento muscular por hiperplasia aos 60 dias, característica de crescimento muscular também verificada em cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) alimentados com dietas contendo colostro bovino (PAULETTI et al., 2007a).

O aumento do número de células durante o crescimento corrobora com os princípios e curva normal de crescimento para peixes estipulada por Von Bertalanffy (1934), utilizando o comprimento corporal em função da idade (SPARRE; VENEMA 1998). No músculo verificou-se reduzida taxa de síntese protéica (RNA) e proteína por célula (proteína/DNA) e, conseqüentemente, limitada capacidade de síntese de proteínas por célula (RNA/DNA), variáveis altamente correlacionadas ( $r = 0,82$  entre RNA e proteína/DNA e,  $r = 0,96$  entre RNA/DNA e proteína/DNA,  $P < 0,001$ ). Isto sugere reduzida eficiência por unidade celular, alteração na celularidade neste tecido, e uma possível alteração na condição nutricional dos peixes.

A razão RNA/DNA, que reflete a capacidade de síntese protéica por célula, vem sendo comumente utilizada como indicador da condição nutricional em peixes. A diminuição na razão RNA/DNA foi relacionada à inadequada condição nutricional (GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003), contudo, Chícharro e

Chícharro (2008) sugerem relação com desaceleração na taxa de crescimento dos peixes e não necessariamente com inadequada condição nutricional. A redução na taxa de crescimento específico, condição esperada e considerada normal em peixes, foi verificada nos pacus analisados neste estudo, com valores de 4,64% aos 30 dias e 3,61% aos 60 dias. Assim como sugerido por Stierhoff et al. (2009), os dados em pacus juvenis estudados sugerem que as células musculares de peixes mais jovens possuem maior capacidade de sintetizar proteínas intracelulares, verificada pela maior razão RNA/DNA, e consequentemente, relação positiva com o crescimento.





## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES - DOURADO

### 5.1 Parâmetros de desempenho do dourado

Os parâmetros de desempenho individual para os peixes alimentados com dieta contendo 0, 10 ou 20% de colostro bovino liofilizado nos dois períodos experimentais estão apresentados na Tabela 10. Não foi observado efeito significativo das dietas contendo inclusão de CBL ( $P > 0,05$ ) sobre os parâmetros de desempenho nos juvenis de dourado. Entre os períodos experimentais, houve diferença significativa apenas para consumo alimentar e taxa de crescimento específico ( $P < 0,05$ ), sendo que aos 60 dias o consumo alimentar foi superior do que aos 30 dias, enquanto taxa de crescimento específico menor.

Tabela 10 - Desempenho individual (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de dourado alimentados com dietas contendo 0%, 10% e 20% de colostro bovino liofilizado (CBL), aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Peso inicial (g)</b>							
30	13,66 $\pm$ 0,47	12,50 $\pm$ 0,27	13,13 $\pm$ 0,46	13,09 $\pm$ 0,26	N.S.	N.S.	N.S.
60	13,66 $\pm$ 0,46	13,45 $\pm$ 0,82	13,20 $\pm$ 0,67	13,44 $\pm$ 0,34			
<b>Média Geral</b>	13,66 $\pm$ 0,30	12,97 $\pm$ 0,44	13,17 $\pm$ 0,36				
<b>Ganho de peso (g)</b>							
30	42,67 $\pm$ 14,42	30,73 $\pm$ 10,31	28,75 $\pm$ 2,42	34,05 $\pm$ 5,60	N.S.	**	N.S.
60	42,47 $\pm$ 9,22	43,31 $\pm$ 10,47	63,52 $\pm$ 5,31	49,76 $\pm$ 5,51			
<b>Média Geral</b>	42,57 $\pm$ 7,65	37,02 $\pm$ 7,14	46,13 $\pm$ 8,20				
<b>Consumo alimentar (g)</b>							
30	75,14 $\pm$ 19,83	75,86 $\pm$ 14,89	57,74 $\pm$ 1,50	69,58 $\pm$ 7,76	N.S.	**	N.S.
60	94,62 $\pm$ 20,51	113,45 $\pm$ 29,85	118,56 $\pm$ 7,23	108,87 $\pm$ 11,26			
<b>Média Geral</b>	84,88 $\pm$ 13,48	94,65 $\pm$ 17,12	88,15 $\pm$ 13,99				
<b>Conversão alimentar aparente (%)</b>							
30	1,84 $\pm$ 0,13	2,73 $\pm$ 0,54	2,04 $\pm$ 0,20	2,20 $\pm$ 0,21	N.S.	**	N.S.
60	2,29 $\pm$ 0,50	2,57 $\pm$ 0,14	1,88 $\pm$ 0,16	2,25 $\pm$ 0,18			
<b>Média Geral</b>	2,06 $\pm$ 0,25	2,65 $\pm$ 0,25	1,96 $\pm$ 0,12				
<b>Taxa de crescimento específico (%)</b>							
30	3,66 $\pm$ 0,61	3,21 $\pm$ 0,59	3,13 $\pm$ 0,20	3,33 $\pm$ 0,26	N.S.	**	N.S.
60	2,07 $\pm$ 0,27	2,10 $\pm$ 0,62	2,62 $\pm$ 0,12	2,26 $\pm$ 0,16			
<b>Média Geral</b>	2,87 $\pm$ 0,46	2,66 $\pm$ 0,39	2,87 $\pm$ 0,15				
<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>							
30	94,3	100	100		N.S.	N.S.	N.S.
60	99,0	100	100				

\* $P < 0,05$ ; NS-  $P > 0,05$ ; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A ausência de diferença significativa observada para os parâmetros de desempenho entre os juvenis de dourado alimentados com as dietas contendo CBL ou não, provavelmente é reflexo do consumo de uma dieta formulada para atender todas as exigências nutricionais dos peixes. Ao estudar o fornecimento de dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado para cachara juvenis (*Pseudoplatystoma fasciatum*), peixe também de hábito alimentar ictiófago, por 30 e 60 dias, não foram verificadas alterações nas características de desempenho (RODRIGUES et al., 2010).

O colostro é uma secreção láctea de alta qualidade nutricional, que possui propriedades nutracêuticas e peptídeos bioativos, associados com a saúde e crescimento animal (PANDEY et al., 2011; SCHEP et al., 1999). Considerando que, os parâmetros biométricos avaliados neste estudo não foram afetados pela dieta e as características inerentes desta secreção láctea, há indicativos para o uso desta fonte alimentar na alimentação de dourados juvenis. Apesar de existirem estudos utilizando o dourado nas diversas áreas da produção, como nutrição, comportamento, fisiologia e manejo, as pesquisas ainda são incipientes (BORGHESI; DAIRIKI; CYRINO, 2009; BRAGA et al., 2007; BRAUN et al., 2010, 2013). Com isso, as informações contidas neste trabalho podem ser de grande valia para a produção de dourados em sistema intensivo. Investigações adicionais, considerando os efeitos do CBL sobre o desenvolvimento e processos fisiológicos nos peixes, são necessárias para completar o entendimento sobre o valor e as dificuldades de utilizar esta alternativa alimentar como fonte protéica.

## **5.2 IGF-I sérico no dourado**

A concentração de IGF-I sérica do dourado (média  $\pm$  erro padrão), expressa em ng/mL, aos 30 e 60 dias experimentais, são apresentadas na Tabela 11. Para esta variável verificou-se efeito do período experimental, sendo maior a concentração de IGF-I sérica aos 60 dias ( $P < 0,05$ ).

Tabela 11 - Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) de juvenis de dourado (média  $\pm$  erro padrão) alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
30	194,76 $\pm$ 7,71	227,22 $\pm$ 9,09	228,81 $\pm$ 12,60	216,93 $\pm$ 7,50	N.S.	*	N.S.
60	242,10 $\pm$ 10,94	246,25 $\pm$ 6,77	239,72 $\pm$ 9,60	242,69 $\pm$ 4,73			
<b>Média Geral</b>	218,43 $\pm$ 12,16	236,73 $\pm$ 6,62	234,27 $\pm$ 7,56				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A ausência de diferença frente às dietas contendo o colostro bovino sobre os níveis séricos de IGF-I nesta espécie de peixe ictiófago é similar do que ocorreu no pacu, peixe onívoro, podendo assim ser justificada da mesma forma. Nas duas espécies estudadas a baixa quantidade de IGF-I colostrado ingerida, o tempo médio de vida do peptídeo bioativo na corrente sanguínea e a presença de barreiras à absorção de proteínas intactas no intestino podem justificar a ausência de diferença na concentração sérica de IGF-I.

Sugere-se que a maior concentração sérica de IGF-I verificada nos dourados aos 60 dias esta relacionada ao maior comprimento dos peixes comparativamente aos 30 dias (16,15  $\pm$  0,55 cm e 18,08  $\pm$  0,51cm para comprimento final aos 30 e 60 dias, respectivamente). Pesquisadores têm verificado que o peptídeo bioativo participa da regulação dos processos mitogênicos de diferenciação e proliferação celular, desenvolvimento e crescimento corporal (CLEMMONS, 2009; CYRINO; MULVANEY, 1999; DYER et al., 2004; RADAELLI et al., 2003; REINECKE, 2010). Após a ligação do IGF-I aos seus receptores de membrana específicos, ocorre a ativação das vias de sinalização intracelulares como MAPK/ERK e PI3K/Akt desencadeando assim, respostas extracelulares, o que influencia o crescimento corporal (FUENTES et al., 2011). O papel do IGF-I em mediar o crescimento é suportado por McCornick et al. (1992), que verificaram que ao utilizar IGF-I (implantes de rIGF-I) bovina para peixes, houve aumento em 100% na taxa de crescimento linear e 40% no peso corporal, em relação aos peixes que não receberam os implantes. Da mesma forma, Andrews et al. (2011) e Kawaguchi et al. (2013), verificaram associação positiva entre os níveis séricos de IGF-I e a taxa de crescimento

individual de peixes *lingcod* (*Ophiodon elongatus*) e crescimento em *masu salmon* (*Oncorhynchus masou*).

### 5.3 Morfologia do epitélio intestinal de juvenis de dourado

À análise macroscópica, verificou-se que o intestino médio dos dourados, assim como verificado por Rodrigues e Menin (2008) na mesma espécie de peixe, dispõe-se em forma de “N” sendo constituído por três alças ou segmentos, S1, S2 e S3, separados por flexões (Figura 20). Continuando o intestino médio sem interrupção por constrição ou valva e desembocando no ânus, encontra-se o intestino posterior (Figura 20) (OLIVEIRA-RIBEIRO; FANTA, 2000).

A análise morfológica descritiva utilizando microscopia eletrônica de varredura foi realizada com foco na comparação entre as características do tecido epitelial do intestino médio (S1, S2) e posterior de dourados juvenis alimentados com dietas contendo ou não colostro bovino liofilizado, fonte protéica de alto valor biológico, aos 30 e 60 dias experimentais. A análise não revelou diferenças morfológicas no epitélio intestinal dos peixes controle (0% CBL) comparativamente aos peixes alimentados com 10 ou 20% de CBL.

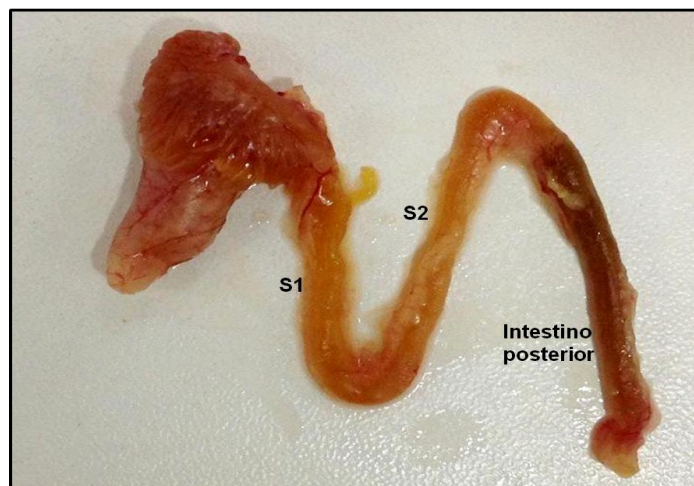


Figura 20 - Segmentos intestinais de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*)

Entre o intestino médio, segmentos S1 e S2 e intestino posterior dos juvenis analisados foram verificadas diferenças na estrutura morfológica. De forma geral, a característica predominante no intestino médio foi presença de dobras altas, contínuas e em anastomose intercaladas por uma ou mais camadas

de dobras mais baixas com protuberância arredondadas em direção ao lúmen. Ramificações nas dobras contínuas também foram visualizadas neste epitélio intestinal (Figuras 21 e 22). No segmento final do trato gastrintestinal dos dourados juvenis, ao contrário dos pacus analisados neste trabalho, que apresentaram um emaranhado de dobras desuniformes, nos dourados houve predominância de dobras altas, desorganizadas e com avantajadas protuberâncias na superfície apical (Figura 23).

Entre os segmentos do intestino médio e posterior de dourado, sugere-se diferença para a altura das dobras, estruturas que compõe o epitélio intestinal projetando-se em direção ao lúmen. As dobras do intestino médio apresentaram-se estruturalmente semelhantes, contudo, ligeiramente maiores do que as dobras presentes no intestino posterior (Figura 24). A predominância de dobras altas no intestino médio e intestino posterior do ictiófago estudado sugere aumento da área de superfície intestinal em função do hábito alimentar e tipo de alimento ingerido, acarretando em melhor condição de absorção dos nutrientes da dieta por todo o intestino. Esta arquitetura da mucosa torna-se especialmente importante ao considerar o menor tamanho do intestino de dourado, comparativamente aos herbívoros e onívoros (BECKER et al., 2010; FUGI; AGOSTINHO; HAHN, 2001). Maior densidade de dobras parece ter sido observada no intestino médio em relação ao intestino posterior, característica comum entre os carnívoros. Resultado semelhantes foram encontrados por Xiong et al. (2011) e Banan Khojasteh et al. (2009) nos ictiófagos *Glyptosternum maculatum* e *Oncorhynchus mykiss*.

O arranjo das dobras intestinais relaciona-se com a quantidade e velocidade de transporte do alimento pelo intestino (SEIXAS FILHO et al., 2001). Segundo sugerido pelos autores, há suposição de que o padrão longitudinal das dobras anastomosadas retarda o avanço do alimento em sentido aboral, possibilitando melhor aproveitamento e digestão dos nutrientes. Ainda, auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal e distensão das paredes intestinais conforme o alimento ingerido. Com isso, sugere-se que, com base nas características estruturais das dobras verificadas neste trabalho, tanto o intestino médio quanto o intestino posterior são altamente eficientes durante o processo absorptivo. Rodrigues et al. (2009) sugerem em função da arquitetura da mucosa

intestinal do ictiófago cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) que a digestão e absorção de nutrientes ocorre principalmente no intestino médio.

Sulcos longitudinais superficiais foram verificados na superfície apical das dobras no intestino médio e posterior, enquanto na porção basal, pronunciados sulcos transversais, sugerindo aumento da área de absorção (Figura 25). No intestino posterior, houve predominância de sulcos transversais mais pronunciados comparativamente ao intestino médio. A presença de sulcos nas estruturas intestinais é comum e também foi verificada nas vilosidades intestinais de leitões (SKRZYPEK et al., 2005). Assim como também visualizado em pacu neste trabalho, o estabelecimento de um padrão para a morfologia do intestino dos exemplares de dourado por vezes não foi possível em função de variações individuais, o que também foi verificado por Seixas Filho et al. (2001) também em dourado (*Salminus brasiliensis*).

Externamente ao epitélio foram verificadas zonas de extrusão celular (Figura 26), indicando que houve perda de células para renovação. A mucosa intestinal dos dourados apresentou numerosas projeções (dobras) constituídas basicamente por três tipos de células. Entre uma única camada de células epiteliais absorptivas com formato colunar e longo denominadas enterócitos, com uma camada de microvilosidades na porção apical (Figuras 27 e 30), foram encontradas células caliciformes (Figura 28). Com base na estrutura e localização, adicionalmente sugere-se a ocasional presença de células bastonetes (Figura 29) e, células do sistema de defesa infiltradas entre os enterócitos (Figura 30). Vacúolos contendo material absorvido também foram observados (Figuras 29 e 30).

As denominadas células bastonetes ainda são pouco conhecidas e entendidas no meio científico, contudo há indícios de participação destas na primeira linha de defesa do organismo (LAURÀ et al., 2012; MANERA; DEZFULI, 2004; REITE; EVENSEN, 2006). Laurà et al. (2012), utilizando microscopia eletrônica de transmissão caracterizaram ultraestruturalmente os diferentes estágio de maturação e distribuição destas células no epitélio intestinal de *Dicentrarchus labrax*.

Assim, considerando a ausência de diferença na morfologia do epitélio intestinal de dourados alimentados ou não com colostro bovino liofilizado, e a alta qualidade nutricional e biológica da proteína do colostro, sugere-se que esta

secreção láctea pode ser promissora utilizada como fonte protéica alternativa quando acrescentada à dieta de juvenis de dourado.

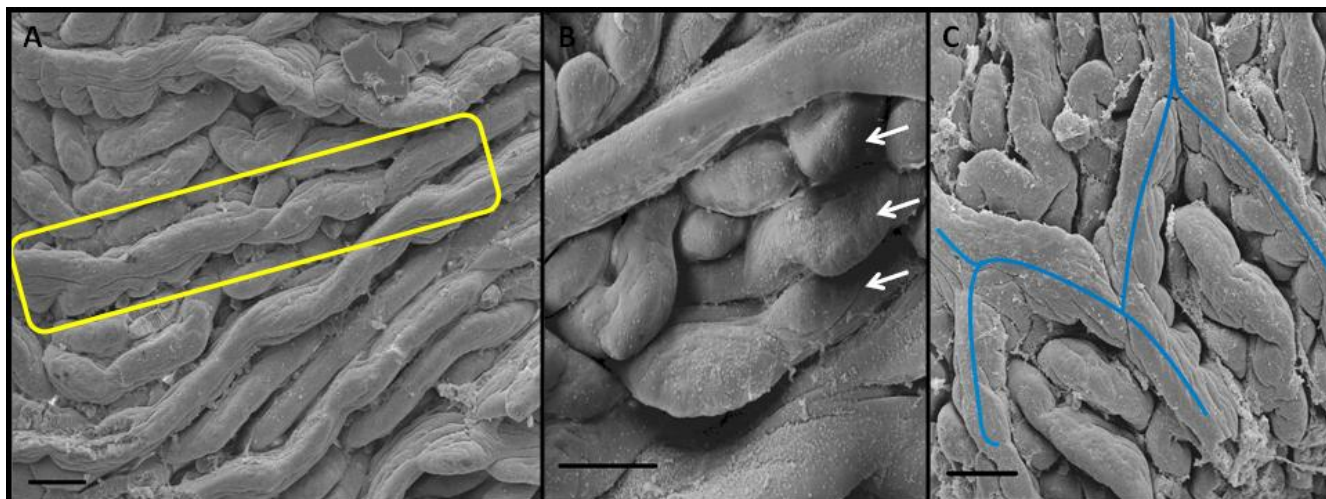


Figura 21 – Intestino médio, segmento S1 de juvenis de dourado: (A) dobras contínuas e em anastomose (retângulo); (B) dobras contínuas intercaladas por uma ou mais camadas de dobras mais baixas com protuberâncias arredondadas (setas brancas); (C) dobras contínuas ramificadas (linhas). Barra= 200 $\mu$ m

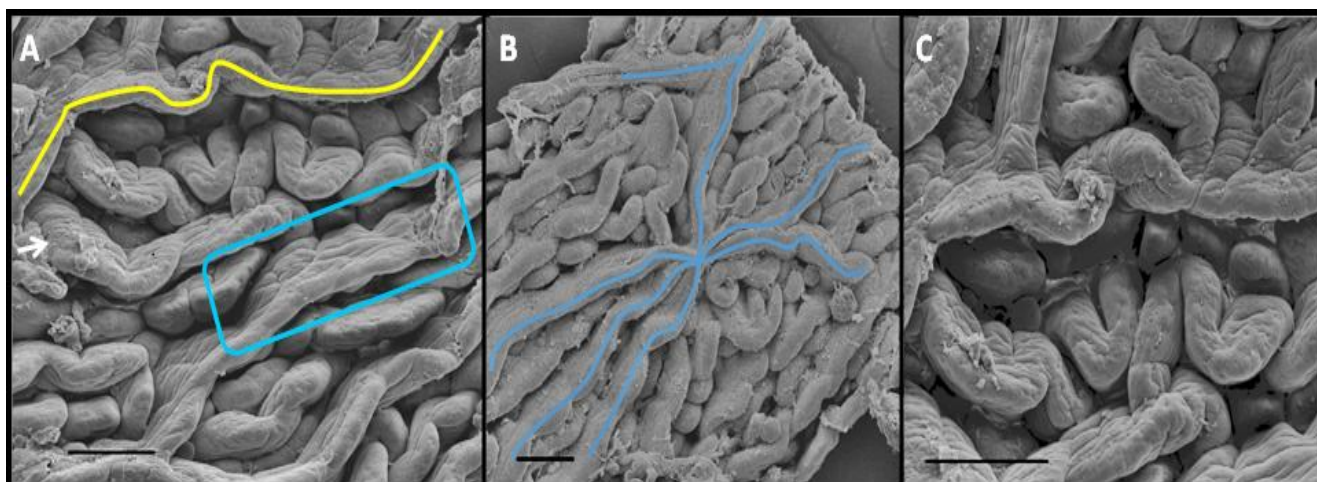


Figura 22 – Intestino médio, segmento S2 de juvenis de dourado: (A) dobras altas, contínuas (linha amarela) e em anastomose (retângulo), intercaladas por uma ou mais camadas de dobras mais baixas com protuberâncias arredondadas; (B) e (C) dobras contínuas ramificadas (linhas azuis). Barra= 300 $\mu$ m



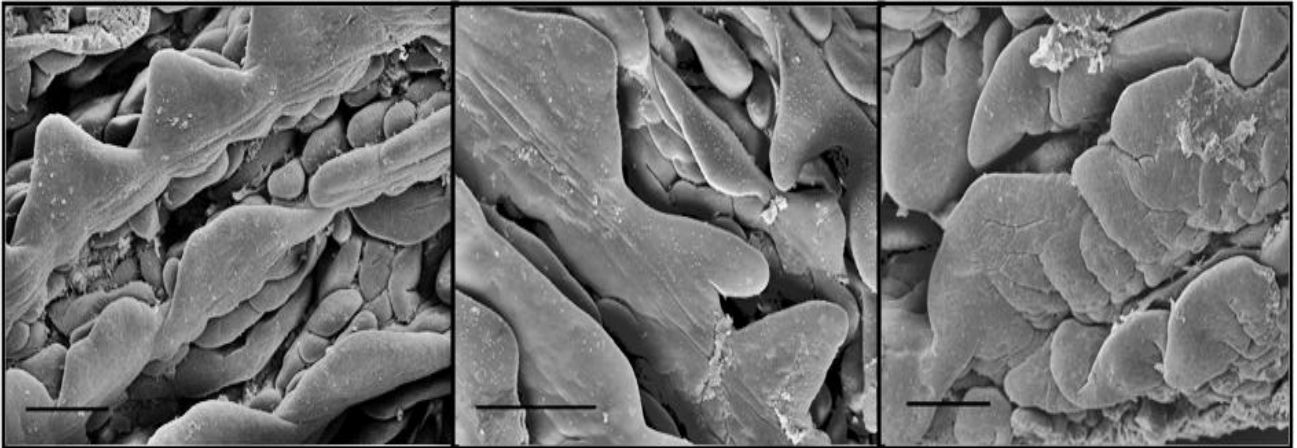


Figura 23 – Intestino posterior de juvenis de dourado, composto por dobras altas, contínuas e desorganizadas, com avantajadas protuberâncias na superfície apical. Barra= 300  $\mu$ m

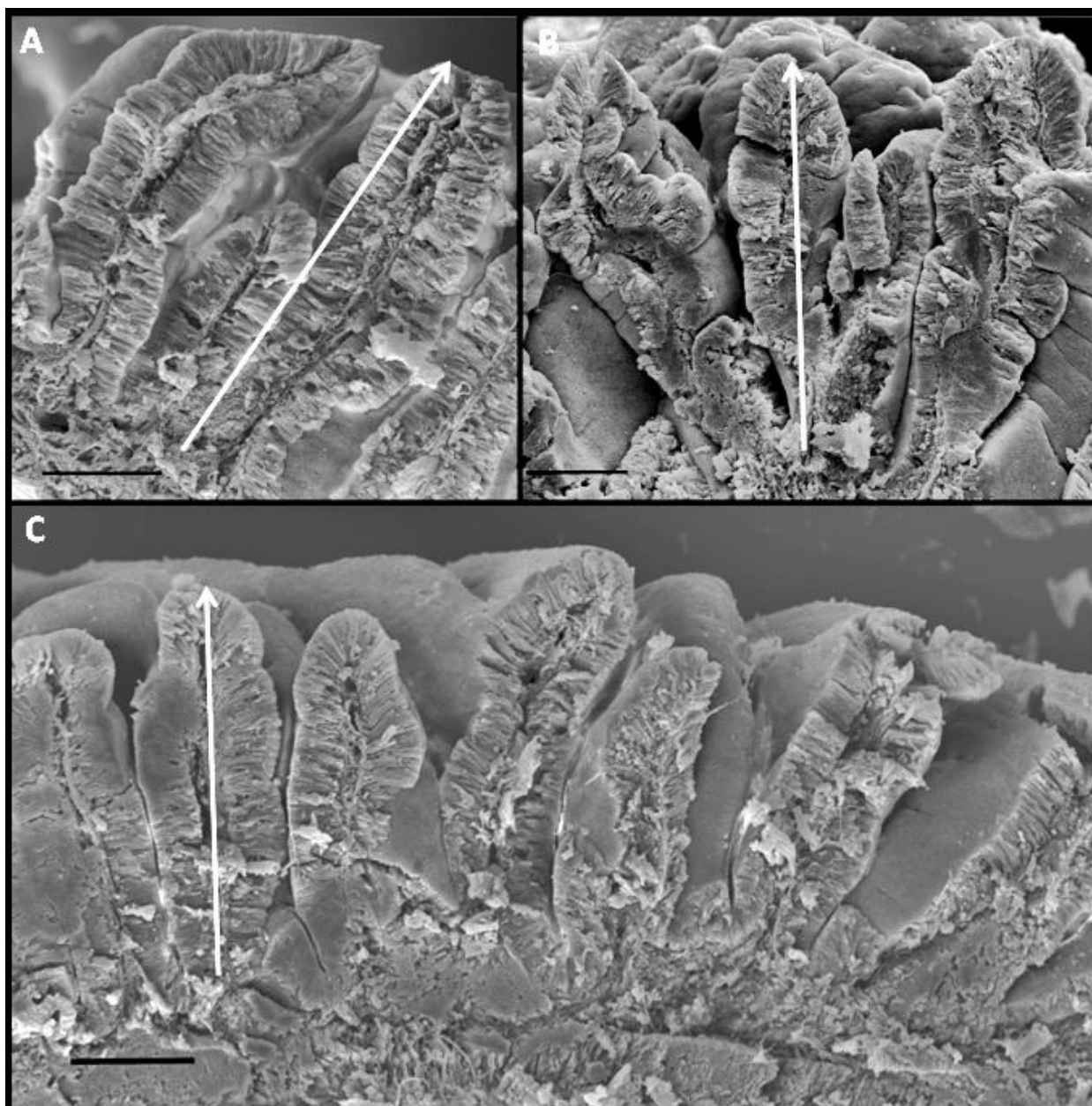


Figura 24 – Dobras estruturalmente semelhantes compondo o epitélio intestinal: (A) dobras presnetes no S1; (B) dobras presentes no S2; (C) dobras presentes no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 100 $\mu$ m

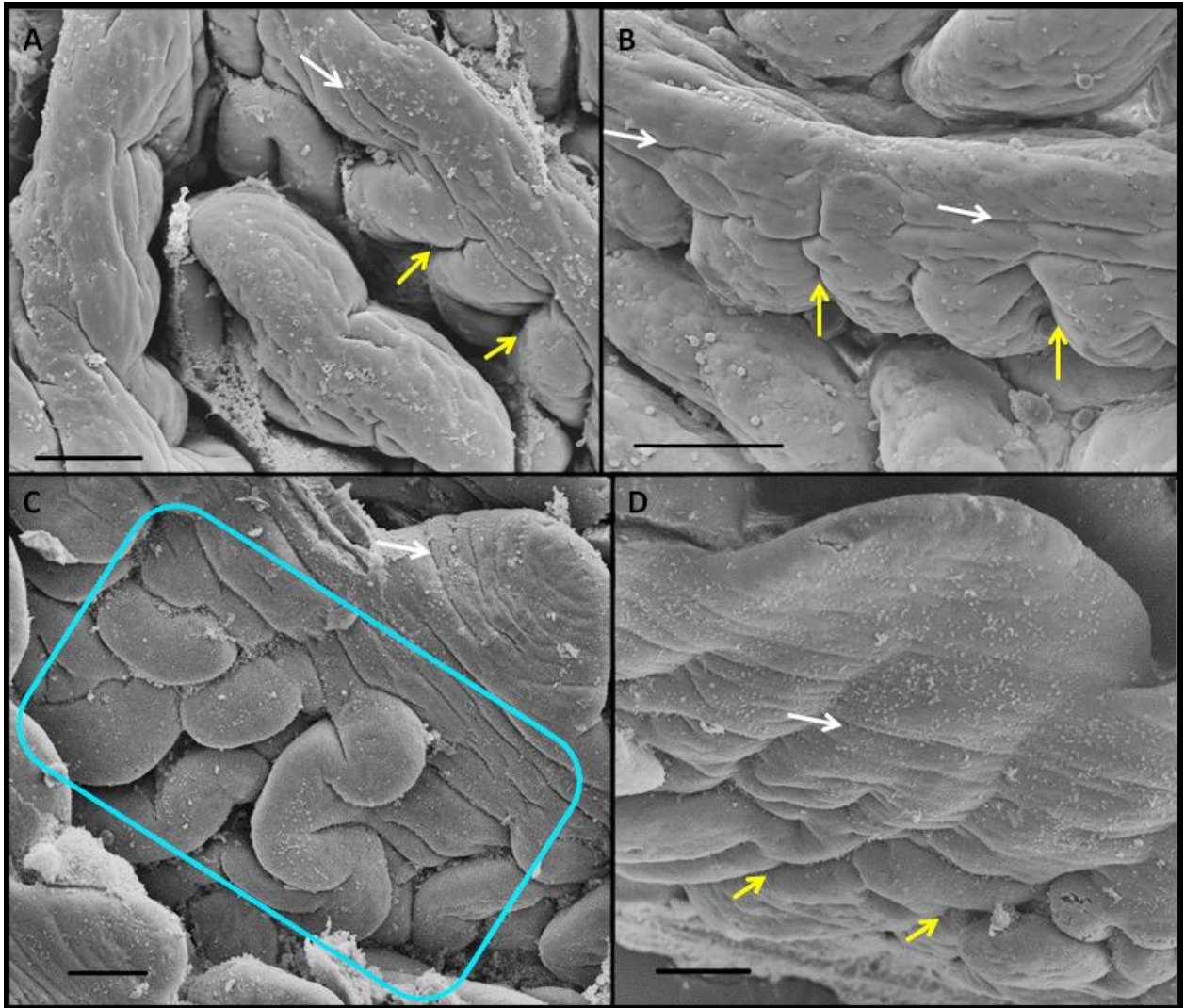


Figura 25 - (A) e (B) Sulcos longitudinais superficiais na porção apical das dobras (setas) e sulcos transversais pronunciados na porção basal das dobras no intestino médio (setas); (C) e (D) sulcos profundos (retângulo e setas) nas dobras do intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 100μm

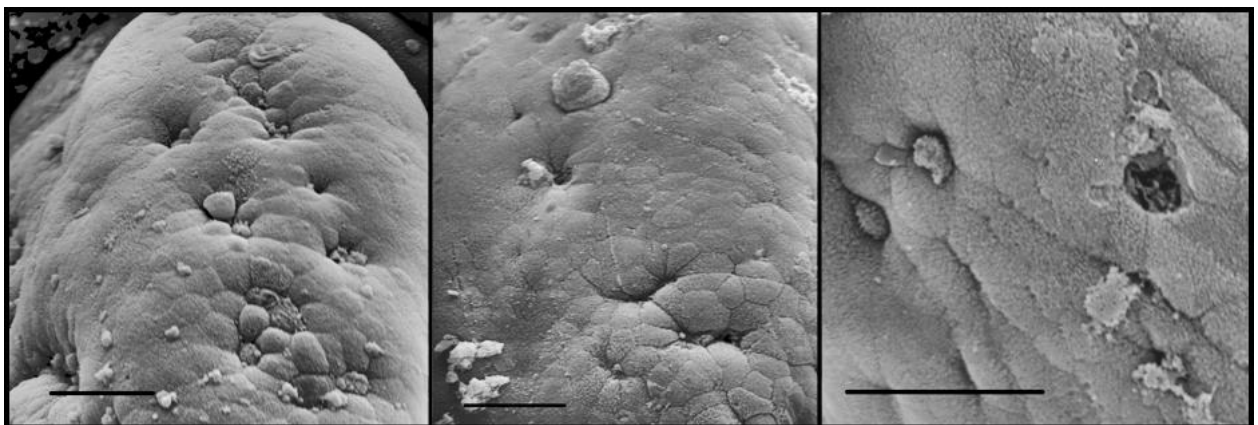


Figura 26 - Processo de extrusão celular no intestino médio de juvenis de dourado. Barra= 20μm

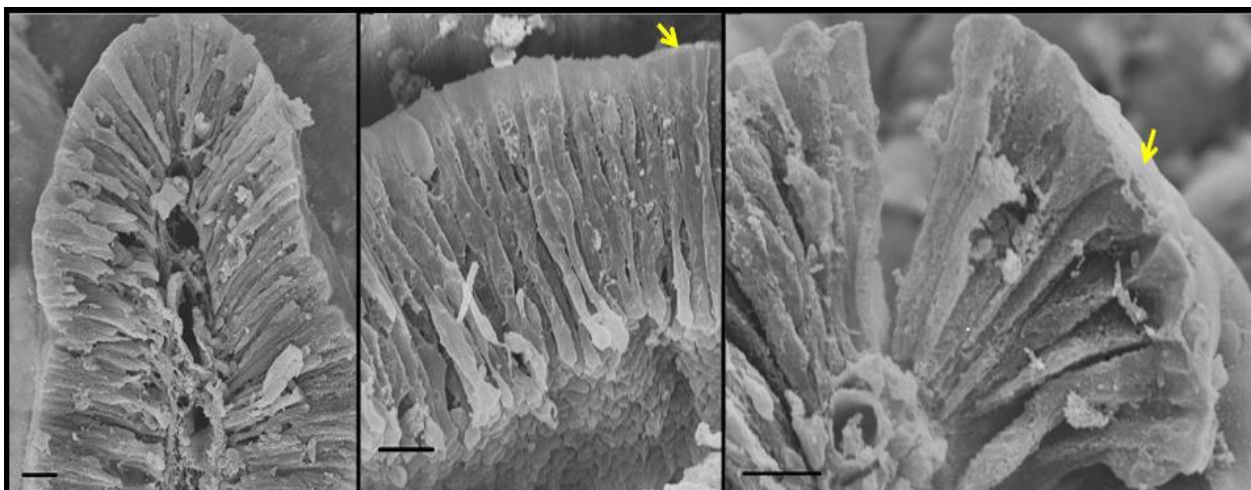


Figura 27 - Intestino médio de juvenis de dourado, enterócitos colunares e camada de microvilosidades (setas). Barra= 10 $\mu$ m

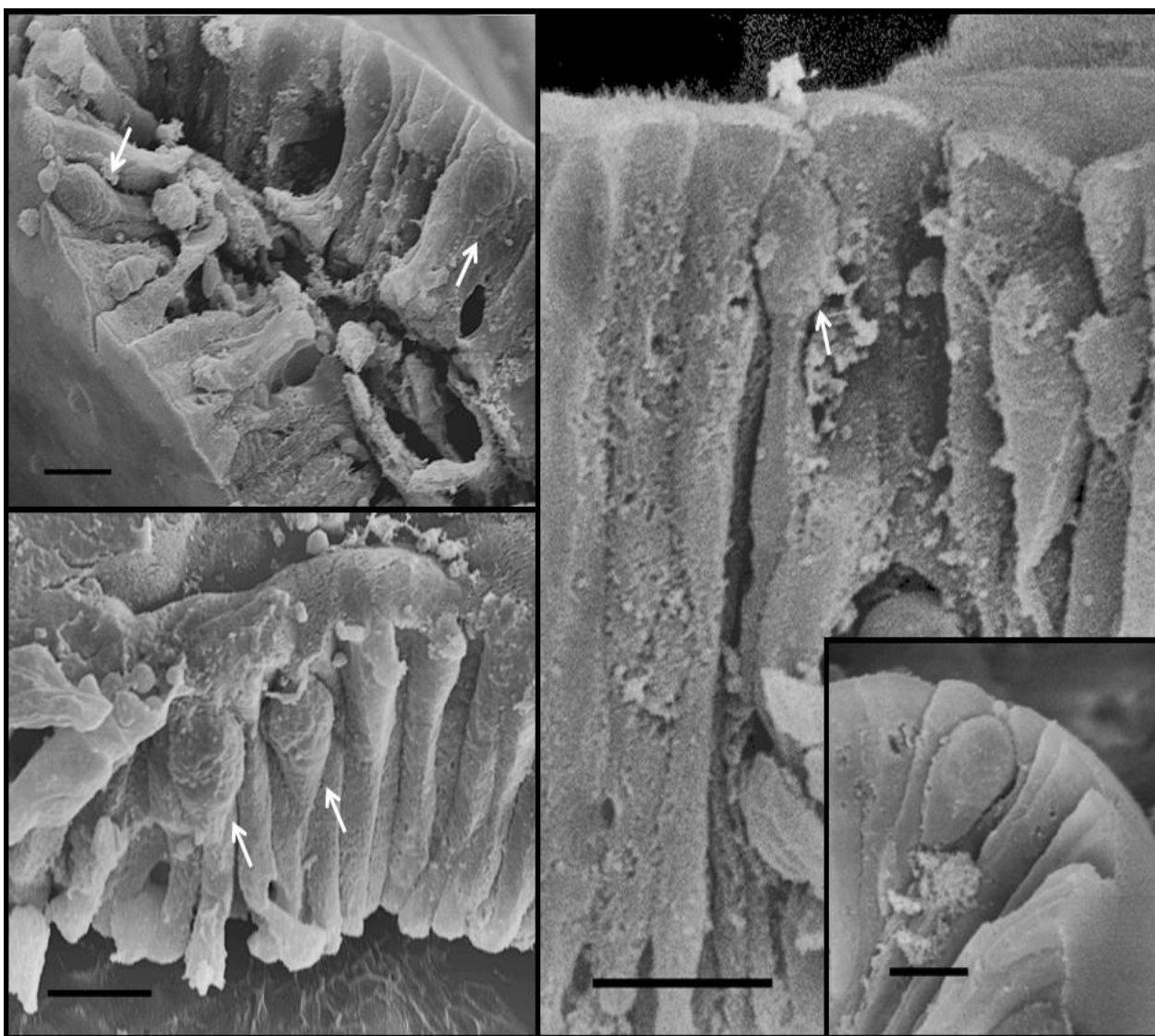


Figura 28 - Células caliciformes presentes no epitélio do intestino médio de juvenis de dourado. Barra= 10 $\mu$ m

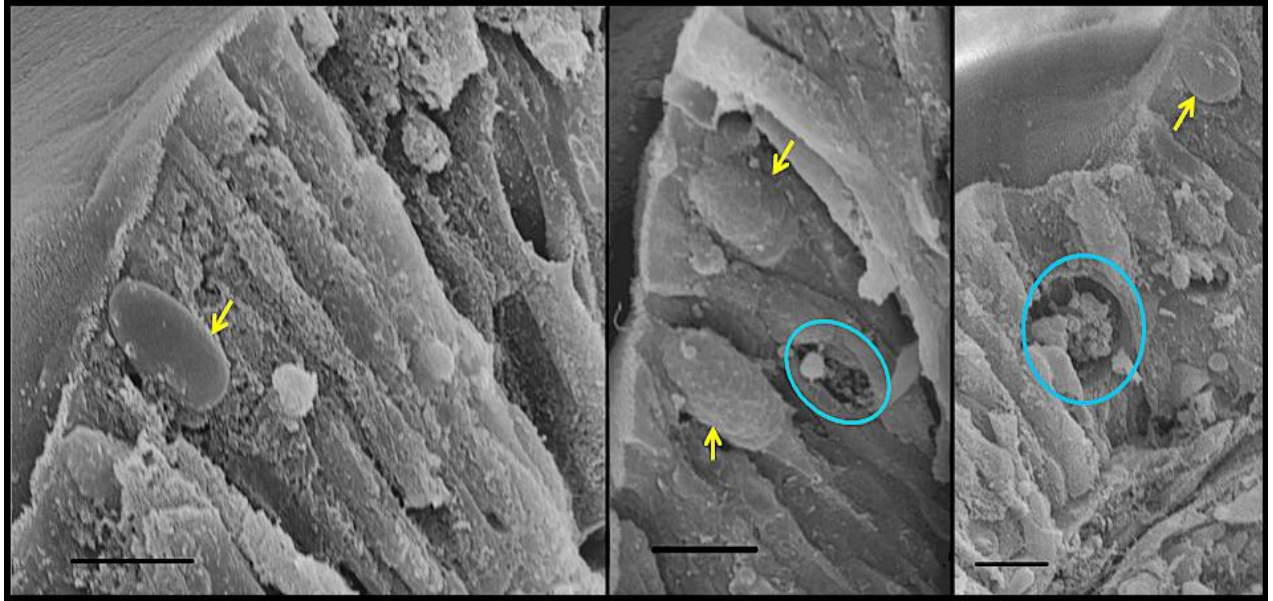


Figura 29 – Células bastonetes (setas) e vacúolos de absorção (círculos) no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 10 $\mu$ m

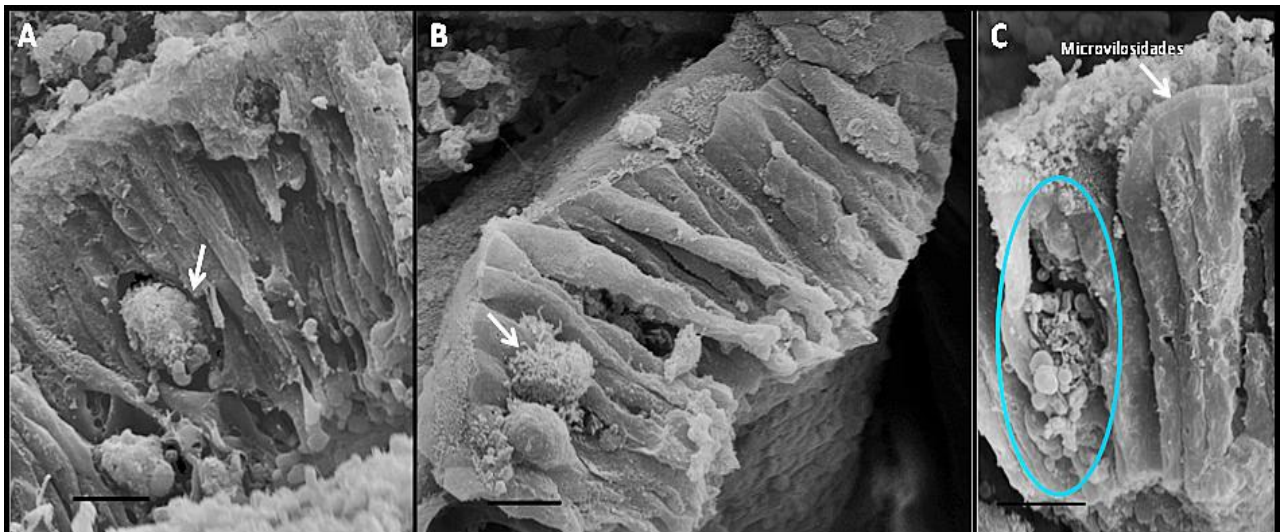


Figura 30 – Células de defesa (setas) infiltradas entre os enterócitos do intestino médio (A) e intestino posterior (B); vacúolos de absorção (círculo) e microvilosidades (seta) (C) no intestino posterior de juvenis de dourado. Barra= 10 $\mu$ m

#### 5.4 Atividade enzimática no tecido intestinal de dourado

A atividade das enzimas peptidases (aminopeptidase N, dipeptidil peptidase IV e aminopeptidase A) e dissacaridases (maltase e sacarase) encontradas no intestino total (intestino médio e intestino posterior) de dourado, expressas em U/ grama de tecido, são apresentadas na Tabela 12. Houve diferença entre os períodos experimentais ( $P < 0,05$ ) apenas para aminopeptidase A, que apresentou maior atividade aos 30 dias. Para as demais enzimas não foi observada diferença entre dieta, período e interação entre dieta e período ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não houve correlação significativa entre a atividade das peptidases e dissacaridases ( $P > 0,05$ ).

Tabela 12 - Atividade enzimática intestinal (U/grama de tecido) (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Aminopeptidase N<sup>3</sup></b>							
<b>30</b>	4,03 $\pm$ 1,29	5,60 $\pm$ 0,82	3,92 $\pm$ 0,31	4,51 $\pm$ 0,53	N.S.	N.S.	N.S.
<b>60</b>	4,49 $\pm$ 0,81	3,14 $\pm$ 0,41	4,56 $\pm$ 1,38	4,06 $\pm$ 0,53			
<b>Média Geral</b>	4,26 $\pm$ 0,69	4,36 $\pm$ 0,68	4,24 $\pm$ 0,65				
<b>Dipeptidil peptidase IV</b>							
<b>30</b>	3,15 $\pm$ 0,28	3,11 $\pm$ 0,19	3,71 $\pm$ 0,37	3,32 $\pm$ 0,17	N.S.	N.S.	N.S.
<b>60</b>	2,57 $\pm$ 0,85	4,18 $\pm$ 0,25	4,08 $\pm$ 0,90	3,69 $\pm$ 0,41			
<b>Média Geral</b>	2,91 $\pm$ 0,34	3,64 $\pm$ 0,28	3,86 $\pm$ 0,36				
<b>Aminopeptidase A</b>							
<b>30</b>	2,51 $\pm$ 0,30	2,52 $\pm$ 0,38	2,83 $\pm$ 0,46	2,62 $\pm$ 0,20	N.S.	*	N.S.
<b>60</b>	2,04 $\pm$ 0,38	1,82 $\pm$ 0,20	1,71 $\pm$ 0,32	1,86 $\pm$ 0,16			
<b>Média Geral</b>	2,27 $\pm$ 0,24	2,17 $\pm$ 0,25	2,27 $\pm$ 0,35				
<b>Maltase</b>							
<b>30</b>	0,25 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02	N.S.	N.S.	N.S.
<b>60</b>	0,27 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,03			
<b>Média Geral</b>	0,26 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,03				
<b>Sacarase</b>							
<b>30</b>	0,39 $\pm$ 0,10	0,18 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,05	N.S.	N.S.	N.S.
<b>60</b>	0,34 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,03			
<b>Média Geral</b>	0,36 $\pm$ 0,05	0,210 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,06				

\* $P < 0,05$ ; N.S.-  $P > 0,05$ ; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período; <sup>3</sup>Dados transformados para  $\log_{10}$ ; U – um  $\mu$ mol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C

No epitélio intestinal de juvenis de dourado avaliados neste trabalho, foi identificada a atividade de todas as cinco enzimas estudadas (aminopeptidase N, dipeptidil amino peptidase IV, amino peptidase A, maltase e sacarase) ao longo do intestino médio e posterior. A presença das enzimas digestivas no trato gastrintestinal esta relacionada com a capacidade do sistema digestivo em utilizar os componentes protéicos e energéticos de origem alimentar (TENGJAROENKUL et al., 2002). A produção das enzimas é variável conforme a porção intestinal e influenciada pelo tamanho do intestino, fase de crescimento, alimento consumido e hábito alimentar (GIRI et al., 2000; HARPAZ; UNI, 1999; HAKIN et al., 2006; KROGDAHL et al., 2003; KUPERMAN; KUZ'MINA, 1994; ZAMBONINO-INFANTE; CAHU; PERES, 1997).

A fonte protéica fornecida ao dourado no presente estudo não estimulou a produção de enzimas digestivas intestinais. Isto pode ser verificado através do comportamento das proteases e carboidrases nos peixes alimentados com as dietas contendo CBL. Da mesma forma, Giri et al. (2000), não encontrou diferença na atividade proteolítica ao comparar juvenis de *Clarias batrachus* (18,2 g, por 56 dias) alimentados com dieta à base de vísceras de aves e peixes (30% PB) em substituição à farinha de peixe.

A elevada presença de enzimas no trato gastrintestinal é considerada uma barreira fisiológica para a absorção de proteínas intactas, pois diminui a eficiência de absorção das proteínas da dieta (SCHEP et al., 1999). O resultado do presente estudo sugere que a dieta contendo o colostro bovino é benéfica para os juvenis, pois, não alterou a atividade das enzimas. Adicionalmente, o colostro bovino possui em sua composição elementos de proteção, como o fator anti-tripsinico que age em sentido contrário à degradação protéica (CHRISTENSEN et al., 1995; SCHEP et al., 1999).

A ausência de diferença entre os períodos experimentais, para as enzimas analisadas, exceto para amino peptidase A, que apresentou reduzida atividade ao final do período analisado, indica estabilização enzimática no intestino durante o crescimento deste peixe ictiófago. Kuz'mina (1996), trabalhando com *Pike (Esox lucius L.)*, também espécie de peixe ictiófago, não verificou variação na atividade proteolítica durante o desenvolvimento, enquanto a atividade da sacarase diminuiu. A estabilidade enzimática observada no dourado, relacionada à regularidade no fornecimento e qualidade do alimento, facilita a

adequada formulação da dieta conforme a fase do desenvolvimento. Assim como no ocorre na mucosa intestinal dos ruminantes recém-nascidos, nos peixes durante o período inicial de vida (larval) ocorre um processo semelhante de transição, caracterizado pela maturação do epitélio intestinal ou “modo adulto de digestão” (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 1995; ZAMBONINO-INFANTE; CAHU, 2007; ZOUITEN et al., 2008). Este processo está associado com a capacidade de digestão e absorção de componentes da dieta, e ocorre quando há diminuição das enzimas citosólicas concomitantemente com o aumento das enzimas de superfície (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 1994, 1995; MA et al., 2005; RIBEIRO et al., 1999; ZOUITEN et al., 2008). Após este período de transição, ocorre variação enzimática normal no intestino de peixes na fase juvenil e adulta (KUZ'MINA, 1996).

Peixes carnívoros, em função de sua característica alimentar com ingestão de elevada quantidade de proteína animal, possuem necessidade de maior presença de enzimas que degradam proteínas no trato gastrintestinal do que peixes onívoros ou herbívoros (HIDALGO; UREA; SANS, 1999). Isto pôde ser observado ao comparar o ictiófago dourado com o onívoro pacu, analisados neste estudo. Nas duas espécies estudadas verificou-se maior presença de proteases do que dissacaridases. Provavelmente este comportamento está relacionado à elevada quantidade de proteína fornecida nas dietas (320 e 430 g/kg de PB, para pacu e dourado, respectivamente) e, conseqüentemente, maior presença de enzimas proteolíticas. O estudo da atividade enzimática gastrintestinal constitui-se em uma investigação fundamental para a avaliação de fontes alternativas alimentares.

### **5.5 Concentração de proteína total, DNA e RNA total no tecido intestinal, hepático e muscular de dourado**

A concentração de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no intestino dos juvenis de dourado são apresentadas na Tabela 13. Não foi observada diferença entre as dietas com inclusão de CBL ou períodos experimentais para todas as variáveis analisadas no intestino ( $P > 0,05$ ).



Tabela 13 - Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média  $\pm$  erro padrão) no intestino de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	141,24 $\pm$ 13,45	138,72 $\pm$ 8,84	122,87 $\pm$ 15,50	134,28 $\pm$ 7,06	N.S.	N.S.	N.S.
60	129,83 $\pm$ 12,81	150,23 $\pm$ 10,14	127,87 $\pm$ 2,74	135,98 $\pm$ 5,97			
<b>Média Geral</b>	135,54 $\pm$ 8,69	144,47 $\pm$ 6,54	125,38 $\pm$ 7,13				
<b>DNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,78 $\pm$ 0,24	1,34 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,23	1,46 $\pm$ 0,13	N.S.	N.S.	N.S.
60	1,62 $\pm$ 0,24	1,52 $\pm$ 0,22	1,55 $\pm$ 0,17	1,56 $\pm$ 0,11			
<b>Média Geral</b>	1,70 $\pm$ 0,16	1,43 $\pm$ 0,12	1,41 $\pm$ 0,14				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	5,93 $\pm$ 0,48	6,10 $\pm$ 0,14	5,09 $\pm$ 0,18	5,70 $\pm$ 0,22	N.S.	N.S.	N.S.
60	6,27 $\pm$ 0,41	6,97 $\pm$ 0,78	6,19 $\pm$ 0,43	6,48 $\pm$ 0,31			
<b>Média Geral</b>	6,10 $\pm$ 0,29	6,54 $\pm$ 0,40	5,64 $\pm$ 0,32				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	80,81 $\pm$ 5,40	107,73 $\pm$ 17,13	108,44 $\pm$ 22,25	98,99 $\pm$ 9,42	N.S.	N.S.	N.S.
60	82,14 $\pm$ 12,45	112,49 $\pm$ 26,30	99,97 $\pm$ 17,24	98,20 $\pm$ 10,71			
<b>Média Geral</b>	81,47 $\pm$ 6,08	110,11 $\pm$ 14,08	104,20 $\pm$ 12,73				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	23,86 $\pm$ 0,49	23,36 $\pm$ 1,10	26,56 $\pm$ 3,62	24,59 $\pm$ 1,21	N.S.	N.S.	N.S.
60	21,09 $\pm$ 3,49	22,42 $\pm$ 3,68	21,20 $\pm$ 1,27	21,57 $\pm$ 1,52			
<b>Média Geral</b>	22,47 $\pm$ 1,69	22,89 $\pm$ 1,73	23,88 $\pm$ 2,09				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	3,44 $\pm$ 0,30	4,75 $\pm$ 0,47	5,33 $\pm$ 1,97	4,50 $\pm$ 0,65	N.S.	N.S.	N.S.
60	4,03 $\pm$ 0,68	5,03 $\pm$ 0,82	5,02 $\pm$ 1,18	4,69 $\pm$ 0,49			
<b>Média Geral</b>	3,73 $\pm$ 0,36	4,89 $\pm$ 0,43	5,18 $\pm$ 1,03				

N.S.-  $P > 0,05$ ; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D - dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A concentração de proteína total, DNA e RNA e as razões entre estas variáveis no fígado dos juvenis de dourados são apresentadas na Tabela 14. Houve interação entre dietas e períodos experimentais para DNA ( $P < 0,05$ ) no fígado (Figura 31). Aos 30 dias houve diferença para a concentração de DNA entre os tratamentos, igualando-se os valores aos 60 dias, exceto para 20% de CBL, que apresentou aumento significativo na concentração de DNA neste período.

Tabela 14 - Concentração de proteína total, RNA e razão entre as variáveis (média  $\pm$  erro padrão) no fígado de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>			Média geral	Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL		D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	154,95 $\pm$ 25,21	134,78 $\pm$ 12,17	158,02 $\pm$ 10,17	149,25 $\pm$ 9,39	N.S.	N.S.	N.S.
60	154,38 $\pm$ 5,70	160,04 $\pm$ 3,83	161,95 $\pm$ 23,25	158,79 $\pm$ 7,09			
<b>Média Geral</b>	154,66 $\pm$ 11,56	147,41 $\pm$ 8,03	159,98 $\pm$ 11,48				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	8,03 $\pm$ 0,77	7,30 $\pm$ 0,29	6,75 $\pm$ 0,54	7,36 $\pm$ 0,34	N.S.	N.S.	N.S.
60	7,89 $\pm$ 0,57	8,20 $\pm$ 1,30	6,59 $\pm$ 0,41	7,56 $\pm$ 0,49			
<b>Média Geral</b>	7,96 $\pm$ 0,43	7,75 $\pm$ 0,63	6,67 $\pm$ 0,30				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	95,73 $\pm$ 17,76	103,59 $\pm$ 21,32	167,80 $\pm$ 18,87	122,38 $\pm$ 14,97	N.S.	N.S.	N.S.
60	114,38 $\pm$ 12,01	133,03 $\pm$ 16,31	118,98 $\pm$ 14,36	122,13 $\pm$ 7,70			
<b>Média Geral</b>	105,05 $\pm$ 10,45	118,31 $\pm$ 13,69	143,40 $\pm$ 15,22				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	20,54 $\pm$ 5,01	19,42 $\pm$ 1,59	24,67 $\pm$ 3,84	21,55 $\pm$ 2,04	N.S.	N.S.	N.S.
60	19,68 $\pm$ 1,13	20,49 $\pm$ 3,12	24,72 $\pm$ 3,48	21,63 $\pm$ 1,59			
<b>Média Geral</b>	20,11 $\pm$ 2,31	19,96 $\pm$ 1,58	24,70 $\pm$ 2,32				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	5,04 $\pm$ 0,53	6,24 $\pm$ 1,04	7,14 $\pm$ 0,65	6,14 $\pm$ 0,49	N.S.	N.S.	N.S.
60	5,81 $\pm$ 0,82	6,65 $\pm$ 0,37	4,87 $\pm$ 0,23	5,78 $\pm$ 0,37			
<b>Média Geral</b>	5,43 $\pm$ 0,47	6,45 $\pm$ 0,50	6,00 $\pm$ 0,59				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; <sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre as dietas; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

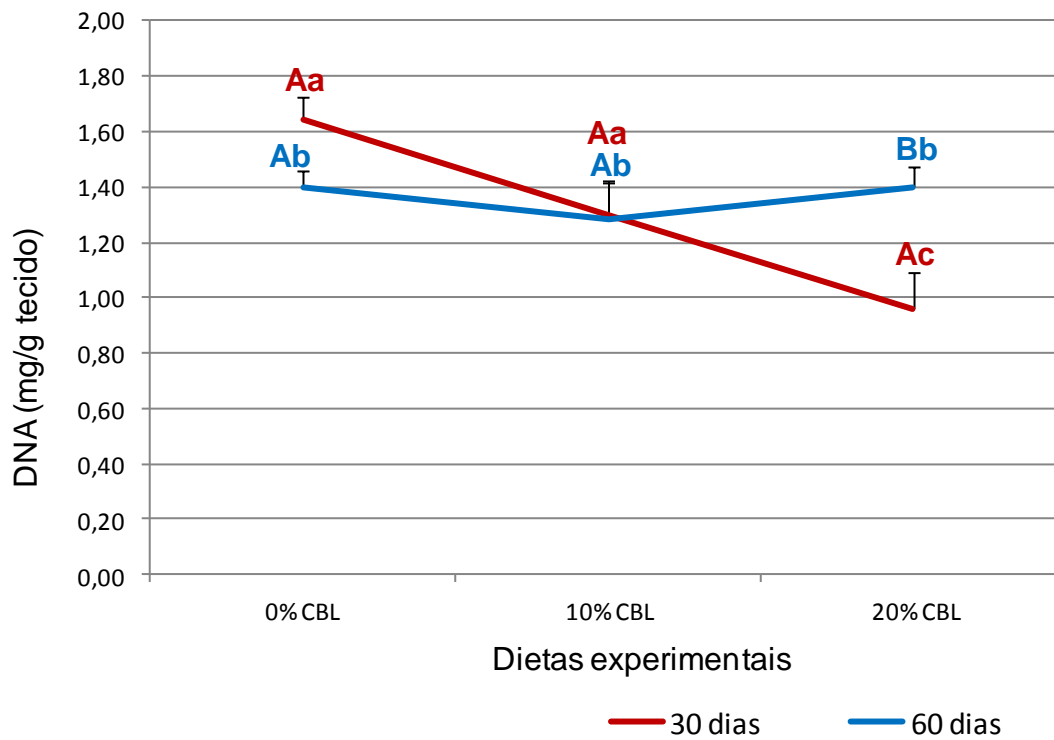


Figura 31 - Concentração de DNA no fígado de juvenis de dourado alimentados com dieta contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais.

<sup>ab</sup>médias seguidas de letras diferentes diferem entre as dietas pelo teste de Tukey;  
<sup>AB</sup>médias seguidas de letras diferentes diferem entre os períodos pelo teste de Tukey.

A concentração de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no músculo dos juvenis de dourado são apresentadas na Tabela 15. No tecido muscular observou-se diferença para a concentração de RNA e para as razões proteína/RNA e RNA/DNA ( $P < 0,05$ ) entre os períodos. Redução na concentração de RNA e RNA/DNA foi verificada aos 60 dias, enquanto a razão proteína/RNA aumentou neste período.

Tabela 15 - Concentração de proteína total, DNA, RNA e razão entre as variáveis (média ± erro padrão) no músculo de juvenis de dourado alimentados com 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado na dieta, aos 30 e 60 dias experimentais

Período (dias)	Dieta <sup>1</sup>				Efeito <sup>2</sup>		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	Média geral	D	P	D x P
<b>Proteína (mg/g tecido)</b>							
30	105,24 ± 3,82	114,07 ± 10,77	78,49 ± 7,35	99,26 ± 6,63	N.S.	N.S.	N.S.
60	115,44 ± 12,77	113,92 ± 14,00	108,35 ± 5,75	112,57 ± 5,82			
<b>Média Geral</b>	<b>110,34 ± 6,38</b>	<b>113,99 ± 7,90</b>	<b>93,42 ± 7,87</b>				
<b>DNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,83 ± 0,28	2,21 ± 0,42	2,03 ± 0,13	2,03 ± 0,16	N.S.	N.S.	N.S.
60	1,95 ± 0,21	2,33 ± 0,11	1,98 ± 0,13	2,09 ± 0,10			
<b>Média Geral</b>	<b>1,89 ± 0,16</b>	<b>2,27 ± 0,20</b>	<b>2,01 ± 0,08</b>				
<b>RNA (mg/g tecido)</b>							
30	1,06 ± 0,06	1,19 ± 0,21	0,85 ± 0,08	1,03 ± 0,08	N.S.	*	N.S.
60	0,75 ± 0,03	0,80 ± 0,07	0,71 ± 0,03	0,76 ± 0,03			
<b>Média Geral</b>	<b>0,91 ± 0,07</b>	<b>0,99 ± 0,13</b>	<b>0,78 ± 0,05</b>				
<b>Proteína/DNA (mg/mg)</b>							
30	59,17 ± 7,11	65,94 ± 10,96	39,66 ± 2,81	54,92 ± 5,51	N.S.	N.S.	N.S.
60	62,54 ± 2,46	49,19 ± 7,38	55,55 ± 6,05	55,76 ± 3,44			
<b>Média Geral</b>	<b>60,86 ± 3,45</b>	<b>57,57 ± 6,10</b>	<b>47,60 ± 4,64</b>				
<b>Proteína/RNA (mg/mg)</b>							
30	108,06 ± 6,53	103,19 ± 26,89	94,58 ± 11,76	101,94 ± 8,90	N.S.	*	N.S.
60	160,70 ± 18,04	143,18 ± 23,32	153,77 ± 2,94	152,55 ± 8,92			
<b>Média Geral</b>	<b>134,40 ± 14,57</b>	<b>123,18 ± 18,26</b>	<b>124,17 ± 14,30</b>				
<b>RNA/DNA (mg/mg)</b>							
30	0,64 ± 0,13	0,64 ± 0,10	0,44 ± 0,06	0,57 ± 0,06	N.S.	*	N.S.
60	0,10 ± 0,06	0,35 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,02			
<b>Média Geral</b>	<b>0,52 ± 0,08</b>	<b>0,49 ± 0,08</b>	<b>0,40 ± 0,04</b>				

\*P<0,05; N.S.- P>0,05; <sup>1</sup>Dietas contendo 0%, 10% e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); <sup>2</sup>D – dieta; P - período; D x P - interação entre dieta e período

A avaliação de fontes alimentares que atuam sobre o desenvolvimento do epitélio intestinal, atividade do fígado e crescimento do tecido muscular, é importante para o entendimento da fisiologia dos peixes, contribuindo adicionalmente para a melhoria do processo de produção. O fornecimento de colostro bovino, fonte protéica de origem animal, que apresenta alta qualidade e peptídeos bioativos, ao ser fornecido para os juvenis de dourado não influenciou os indicadores de atividade celular no tecido entérico e muscular (P>0,05). De modo contrário, cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*), peixe também de hábito alimentar ictiófago, quando alimentados níveis de CBL (5, 10, 15 e 20%)

apresentaram aumento da atividade celular no intestino, fígado e músculo e alteração positiva nas principais características de desempenho (PAULETTI et al., 2007a, 2007b). A similaridade de resultados observada para os indicadores de atividade celular no intestino dos dourados alimentados com a dieta contendo ou não o CBL, como sugerido por Moretti et al. (2014a), sugere estabilização das células intestinais, resultado da equivalência entre taxa de proliferação e apoptose.

No tecido hepático, a concentração de DNA, variável que reflete a densidade celular nos tecidos através do número de células, foi influenciada simultaneamente, pela dieta e período, revelada através da interação entre estas variáveis. Aos 30 dias, a concentração de DNA diferiu entre os tratamentos (0% CBL > 10% CBL > 20% CBL) (Figura 31), igualando-se os valores aos 60 dias. Neste período, houve significativo aumento na concentração de DNA hepático nos peixes alimentados com 20% de CBL, o que indica a ocorrência de um processo celular proliferativo ou recrutamento de novas células para este tecido. O fígado participa do processo de digestão, agindo na metabolização de substâncias, provenientes da absorção intestinal e conseqüentemente, aproveitamento pelo organismo. Assim sugere-se que houve um desenvolvimento compensatório das células hepáticas nos peixes alimentados com 20% de CBL e, conseqüentemente, aceleração ou aumento na atividade celular.

No músculo, aos 60 dias, verificou-se redução na concentração de RNA e para a razão RNA/DNA e, aumento na atividade de tradução de proteínas (razão proteína/RNA). Considerando que a concentração de RNA é indicativo de síntese protéica nos tecidos e, que a razão RNA/DNA reflete a capacidade das células em realizar a síntese de proteína, sugere-se que houve redução na eficiência celular neste tecido.

O processo de tradução de proteínas no músculo parece estar envolvido diretamente com o crescimento dos peixes, como confirmado pela correlação positiva entre proteína/RNA e comprimento ( $r = 0,56$ ) e, proteína/RNA e peso ( $r = 0,52$ ) ( $P < 0,02$ ). Ainda, sugere-se que a síntese endógena de proteína é destinada à deposição muscular. Considerando que proteína é uma importante fonte de energia para peixes (LOUGHNA; GOLDSPINK, 1984), pode-se, assim inferir adequada condição do dourado analisado.

Apesar da redução na razão RNA/DNA ser indicativo de inadequada condição nutricional em peixes (GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003), Chícharro e Chícharro (2008) sugerem que há forte relação com a desaceleração na taxa de crescimento dos peixes e, não necessariamente com inadequada condição nutricional. Concordando com a afirmativa, dourados avaliados no presente trabalho apresentaram redução na taxa de crescimento específico (3,3% e 2,3%, aos 30 e 60 dias, respectivamente, tabela 10) e correlação negativa entre RNA/DNA e comprimento ( $r = - 0,67$ ,  $P = 0,002$ ) e RNA/DNA e peso ( $r = - 0,62$ ,  $P=0,006$ ). Diminuição na razão RNA/DNA acompanhada pela reduzida taxa de crescimento também foi verificada em juvenis de *Solea solea* e *Solea senegalensis* (BUCKLEY et al., 1999; FONSECA; VINAGRE; CABRAL, 2006). Com o aumento na massa muscular, o RNA total parece estar envolvido com a renovação das enzimas e proteínas estruturais (HOULIHAN et al., 1990). Ainda, a diminuição na síntese de proteínas durante jejum prolongado é resultado da redução no número e atividade dos ribossomos nas células (LOUGHNA; GOLDSPINK, 1984).

Ao contrário dos mamíferos, o crescimento dos peixes ocorre continuamente desde o período embrionário até a fase adulta, através dos processos de hiperplasia que ocorre através da produção de novas células musculares e, hipertrofia ou o aumento das fibras musculares até alcançarem o máximo diâmetro funcional (JOHNSTON, 1999; MALZAHN et al., 2003). Os resultados encontrados neste estudo para os juvenis de dourado sugerem crescimento por hipertrofia aos 30 dias e hiperplasia aos 60 dias. Este padrão indica que a ontogenia de dourados é composta por fases cíclicas de hiperplasia e hipertrofia, o que também pôde ser observado em juvenis de *Japanese flounder* (*Paralichthys olivaceus*) (GWAK et al., 2002; GWAK; TSUSAKI; TANAKA, 2003).



## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As respostas de desempenho indicam que o colostro bovino liofilizado foi adequado para atender as necessidades nutricionais dos juvenis de pacu e dourados.

A concentração de IGF-I disponível no colostro bovino liofilizado não afetou a concentração sérica deste peptídeo bioativo em juvenis de pacu e dourado, indicando efeito tópico sobre o desenvolvimento entérico.

O colostro bovino liofilizado quando ingerido por juvenis de pacu e dourado, como fonte parcial de proteínas, não determinou significativas alterações na estrutura morfológica ou atividade enzimática no intestino bem como nos indicadores de atividade celular nos tecidos entérico, hepático ou muscular.

As investigações conduzidas no presente estudo geraram paralelamente à avaliação de uma fonte protéica alternativa à dieta, novos conhecimentos sobre a plasticidade e dinâmica enzimática no trato intestinal bem como na fisiologia celular nos tecidos entérico, hepático e muscular. Estas são informações importantes e inéditas sobre a histologia e fisiologia da digestão e crescimento em pacus e dourados.





## **7 CONCLUSÃO**

Considerando os aspectos estudados para avaliar as consequências do fornecimento de colostro bovino para pacu e dourado juvenis, observou-se que foram mantidas inalteradas a plasticidade e atividade das enzimas no epitélio intestinal e a atividade celular nos tecidos entérico, hepático e muscular. Esta condição sugere a possibilidade de uso desta secreção láctea na nutrição dos peixes estudados.



## REFERÊNCIAS

ABAURREA-EQUISOAÍN, M.A.; OSTOS-GARRIDO, M.V. Enterocytes in the anterior intestine of *Oncorhynchus mykiss*: Cytological characteristics related to osmoregulation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 139, p. 109-116, 1996.

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles - fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 1–9, 2007.

ABREU, J.S.; TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, M.A.; URBINATI, E.C. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, p. 415-421, 2009.

ALBRECHT, M.P.; FERREIRA, M.F.N.; CARAMASCHI, E.P. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related Neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). **Journal of Fish Biology**, London, v. 58, p. 419–430, 2001.

ANDREWS, K.S.; BECKMAN, B.R.; BEAUDREAU, A.H.; LARSEN, D.A.; WILLIAMS, G.D.; LEVIN, P.S. Suitability of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) as a measure of relative growth rates in lingcod. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, London, v. 3, p.250-260, 2011.

ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; ZAMORANO, M.J.; CASTRO-ALONSO, A.; CAPOTE, J. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and comercial sheep colostrum. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 54, p. 237-241, 2004.

ASCENCIO, F.; MARTINEZ-ARIAS, W.; ROMERO, MA.J; WADSTROËM, T. Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 20, p.219-229, 1998.

BALDAN, A.P. **Avaliação da tolerância do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a carboidratos**. 2008. 119 p. Tese (Doutorado em Aquicultura ) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

BANAN KHOJASTEH, S.; SHEIKHZADEH, F.; MOHAMMADNEJAD, D.; AZAMI, A. Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **World Applied Science Journal**, Dubai, v. 6, n. 11, p. 1525-1531, 2009.

BARBIERI, R.L.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F.J. Análise ultra-estrutural da absorção intestinal de macromolécula protéica com o uso de peixe como modelo experimental. **Conscientiae Saúde Revista Científica**, São Paulo, v. 1, p. 21-30, 2002.

BECKER, A.G.; GONÇALVES, J.F.; GARCIA, L.O.; BEHR, E.R.; GRAÇA, D.L.; KURTZ FILHO, M.; MARTINS, T.; BALDISSEROTTO, B. Morphometric parameters comparisons of the digestive tract of four teleosts with different feeding habits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p. 862-866, 2010.

BECKMAN, B.R. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and growth in fishes. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 170, p. 233–252, 2011.

BERISHVILI, G.; SHVED, N.; EPPLER, E.; CLOTA, F.; BAROILLER, J.F.; REINECKE, M. Organ-specific expression of IGF-I during early development of bony fish as revealed in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, by in situ hybridization and immunohistochemistry: indication for the particular importance of local IGF-I. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 325, p. 287–301, 2006.

BERTIN, L. Appareil digestif. **Traité de Zoologic**, Paris, v. 13, p. 1249-1301, 1958.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; DANTAS D'ARCE, R.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2314-2324, 2002a.

\_\_\_\_\_. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. II. Estudo no intestino delgado distal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2325-2331, 2002b.

BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 122 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; CYRINO, J.E.P. Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture**, Oxford, v. 297, p.151–156, 2009a.

\_\_\_\_\_. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 486–495, 2009b.

\_\_\_\_\_. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 16, p. 213–222, 2010.

BITTRICH, S.; PHILIPONA, C.; HAMMON, H.M.; ROMÉ, V.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.W. Preterm as compared with full-term neonatal calves are characterized by morphological and functional immature of the small intestine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1786-1795, 2004.

BLUM, J.W.; HAMMON, H. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, p. 151–159, 2000.

BLUM, J.W.; BAUMRUCKER, C.R. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 23, p. 101-110, 2002.

BORGES, J.C.S.; SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, J.R.M.C. Anatomia e histologia gastrintestinal da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 32, n. 4, p. 407-414, 2010.

BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. **Aquaculture nutrition**, Oxford, v. 15, p. 453–458, 2009.

BRAGA, L.G.T.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. ; CYRINO, J.E.P. Trânsito gastrintestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 131-134, 2007.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2013. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

BRAUN, N.; BALDISSEROTTO, B.; LIMA, R.L.; DAFRE, A.L.F.F.; NUÑER, A.P.O. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 301, p. 22–30, 2010.

BRAUN, N.; DAFRE, A.L.; LIMA, R.L.; BEUX, L.F.; BROL, F.F.; NUÑER, A.P.O. Growth and stress of dourado cultivated in cages at different stocking densities. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 1145-1149, 2013.

BUCKLEY, L.J. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. **Marine Biology**, Heidelberg, v. 80, p. 291-298, 1984.

BUCKLEY, L.; CALDARONE, E.; ONG, T.L. RNA–DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 401, p. 265–277, 1999.

BÜHLER, C.; HAMMON, H.; ROSSI, G.L.; BLUM, J.W. Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R<sub>3</sub>-insulin-like growth factor-I and growth hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 3, p. 758-765, 1998.

CAHU, C.L.; ZAMBONINO INFANTE, J.L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v. 109, p. 213-222, 1994.

CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J.L. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 14, p. 431–437, 1995.

CAMPBELL, S.G.; SIEGEL, M.J.; KNOWLTON, B.J. Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 25, n. 12, p. 361-365, 1977.

CAO, Q.P.; DUGUAY, S.J.; PLISETSKAYA, E.; STEINER, D.F.; CHAN, S.J. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 3, n. 12, p. 2005-2010, 1989.

CASTILLO, J.; CODINA, M.; MARTÍNEZ, M.L.; NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 286, p. 935-941, 2004.

CHAULET, A.; MEDESANI, D.A.; FREITAS, J.; CERVINO, A.; CERVINO, N.; RODRÍGUEZ, E.M. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), by ecdysone and insulin growth factor. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 370/371, p. 1–6, 2012.

CHEN, H.Y.F.; MOLLSTEDT, O.; TSAI, MEN-HWEI; KREIDER, R.B. Potential clinical applications of multi-functional milk proteins and peptides in cancer management. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 21, p. 2424-2437, 2014.

CHÍCHARO, M.A.; AMARAL, A.; MORAIS, P; CHÍCHARO, L. Effect of sex on ratios and concentrations of DNA and RNA in three marine species. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 332, p. 241-245, 2007.

CHÍCHARO, M.A.; CHÍCHARO, L. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 9, p. 1453–1471, 2008.

CHRISTENSEN, S.; WIEGERS, T.; HERMANSEN, J.; SOTTRUP-JENSEN, L. Plasma-derived protease inhibitors in bovine milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, p. 439-449, 1995.

CINAR, K.; SENOL, N. Histological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). **Anatomy, Histology and Embryology**, Moravia, v. 35, p. 147–151, 2006.

CLEMMONS, D.R. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 20, p. 349-356, 2009.

CORFIELD, A.P.; CARROLL, D.; MYERSCOUGH, N.; PROBERT, C.S.J. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 6, p. 1321–1357, 2001.

COSTA, G.M. **Estudo histomorfológico e análise dos perfis celulares do rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleosteo, Characidae), pacu.** 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Editora UFSM, 2005. cap. 1, p. 23-36.

CRUZ, T.M.P.; MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Intestinal epithelium of juvenile dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) fed diet with lyophilized bovine colostrum. **Aquaculture Research**, Oxford, p. 1–9, 2014 (Early view).

CSAPÓ, J.; SALAMON, S.Z. Composition of mare's colostrum and milk II. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro-elements. **Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria**, România, v. 2, p. 133-148, 2009.

CYRINO, J.E.P.; MULVANEY, D.R. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells - BB line. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, p. 517-525, 1999.

CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 68-87, 2010.

DAHLQVIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, p. 18-25, 1964.

DAIRIKI, J.K. **Exigência em aa e farelo de soja na nutrição de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816).** 2009. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

DEBNATH, S. A review on the physiology of insulin like growth factor-I (IGF-I) peptide in bony fishes and its phylogenetic correlation in 30 different taxa of 14 families of teleosts. **Advances in Environmental Biology**, Jordan, v. 5, n. 1, p. 31-52, 2010.

DELLA FLORA, M.A.; MASCHKE, F.; FERREIRA, C.C.; PEDRON, F.A. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2010.

DEZFULI, B.S.; LUI, A.; PIRONI, F.; MANERA, M.; SHINN, A.P.; LORENZONI, M. Cell types and structures involved in tench, *Tinca tinca* (L.), defence mechanisms against a systemic digenean infection. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 36, p. 577–585, 2013.



DEPLANCKE, B.; GASKINS, E.R. Microbial modulation of innate defense: globlet cells and the intestinal mucus layer. **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 73, n. 6, p. 1131-1141, 2001.

DUAN, C. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 306–314, 1998.

DUAN, C.; DING, J.; LI, Q.; TSAI, W.; POZIOS, K. Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, of the USA**, Washington, v. 96, n. 26, p. 15274–15279, 1999.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 167, p. 344–351, 2010.

DYER, A.R.; UPTON, Z.; STONE, D.; THOMAS, P.M.; SOOLE, K.L.; HIGGS, N.; QUINN, K.; CARRAGHER, J.F. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 135, n. 3, p. 268-275, 2004.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, p. 879-887, 2002.

FACCIOLI, C.K.; CHEDID, R.A.; AMARAL, A.C.; VICENTINI, I.B.F.; VICENTINI, C.A. Morphology and histochemistry of the digestive tract in carnivorous freshwater *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). **Micron**, New York, v. 64, p. 10–19, 2014.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2010. 218 p.

\_\_\_\_\_. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome, 2014. 223 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2014.

FARIA, A.A.M.; MUHA, T.; MOROTE, E.; CHÍCHARO, M.A. Influence of starvation on the critical swimming behaviour of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its relationship with RNA/DNA ratios during ontogeny. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 75, n. 1, p. 87-93, 2011.

FENGER, C.; TOBIN, T.; CASEY, P.; LANGEMEIER, J.; HAINES, D. Bovine colostrum supplementation does not influence serum insulin-like growth factor-1 in horses in race training. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 34, p. 1025–1027, 2014.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 646-653, 2000.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 617-626, 2001.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment composition and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 61, n. 8, p. 1033-1060, 1978.

FONSECA, V.F.; VINAGRE, C.; CABRAL, H.N. Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA : DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1551–1562, 2006.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGASTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na Região Sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, p. 345-352, 2004.

FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A.C.; SCHALCH, S.H.C.; GARCIA, F.; ROMERA, D.M.; SILVA, R.J. Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 407-414, 2013.

FUENTES, E.N.; BJÖRNSSON, B.T.; VALDÉS, J.A.; EINARSDOTTIR, I.E.; LORCA, B.; ALVAREZ, M.; MOLINA, A. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 300, p. 1532–1542, 2011.

FUGI, R.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. Trophic morphology of five benthic-feeding fish species of a tropical floodplain. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 1, p. 27-33, 2001.

GEORGOPOULOU, U.; DABROWSKI, K.; SIRE, M.F.; VERNIER, J.M. Absorption of intact proteins by the intestinal epithelium of trout, *Salmo gairdneri* - a luminescence enzyme immunoassay and cytochemical study. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 251, p. 145-152, 1988.

GIRI, S.S.; SAHOO, S.K.; SAHU, A.K.; MUKHOPADHYAY, P.K. Nutrient digestibility and intestinal enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linn.) juveniles fed on dried fish and chicken viscera incorporated diets. **Bioresource Technology**, Barking, v. 71, p. 97-101, 2000.

GODLEWSKI, M.M.; SLUPECKA, M.; WOLINSKI, J.; SKRZYPEK, T.; SKRZYPEK, H.; MOTYL, T.; ZABIELSKI, R. Into the unknown – the death

pathways in the neonatal gut epithelium. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Jagiellonian, v.56, suppl. 3, p. 724, 2005.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil**: subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi-Guassu. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975. v. 1, n. 4, 216 p.

GWAK, W.S.; TANAKA, M. Developmental change in RNA: DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 59, p. 902–915, 2001.

GWAK, W.S.; TSUSAKI, T.; TANAKA, M. Nutritional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared Japanese flounder from hatch to release. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, p. 503–514, 2003.

HADJIPANAYIOTOU, M. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 18, p. 255-262, 1995.

HAKIM, Y.; UNI, Z., HULATA, G.; HARPAZ, S. Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 257, p. 420–428, 2006.

HAMMON, H.M.; BLUM, F.W. Feeding different amounts of colostrum or only milk replacer modify receptors of intestinal insulin-like growth factors and insulin in neonatal calves. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 22, p. 155–168, 2002.

HARPAZ, S.; UNI, Z. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, New York, v. 124, p. 155–160, 1999.

HARTREE, E.F. Determination of protein a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, p. 422-427, 1972.

HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits: proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 170, p. 267–283, 1999.

HONORATO, C.A.; ALMEIDA, L.C.; Da SILVA NUNES, C.; CARNEIRO, D.J.; MORAES, G. Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 91–99, 2010.

HOSSNER, K.L.; McCUSKER, R.H.; DODSON, M.V. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. **Animal Science**, Penicuik, v. 64, n. 1, p. 1-15, 1997.

HOULIHAN, D.F.; WARING, C.P.; MATHERS, E.; GRAY, C. Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 63, p. 735-756, 1990.

IMSLAND, A.K.; FOSS, A.; SVEINSBTQH, B.; JONASSEN, T.M.; STEFANSSON, S.O. Comparisons of RNA/DNA ratios, growth, and metabolism in different populations of juvenile turbot *scophthalmus maximus* reared at four temperatures. **Journal of the World Aquaculture Society**, Barton Rouge, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2001.

IMSLAND, A.K.; FOSS, A.; BONGA, S.W.; VAM HAM, E.; STEFANSSON, S.O. Comparison of growth and RNA: DNA ratios in three populations of juvenile turbot reared at two salinities. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, p. 288–300, 2002.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 47, p. 439-464, 1972.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 99–115, 1999.

JOHNSTON, I.A.; BOWER, N.I.; MACQUEEN, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 214, p. 1617-1628, 2011.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 99–115, 1999

KAWAGUCHI, K.; KANEKO, N.; FUKUDA, M.; NAKANO, Y.; KIMURA, S.; HARA, A.; SHIMIZU, M. Responses of insulin-like growth factor (IGF)-I and two IGF-binding protein-I subtypes to fasting and re-feeding, and their relationships with individual growth rates in yearling masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, New York, v. 165, p. 191–198, 2013.

KELLEY, K.W.; HAIGWOOD, J.T.; PEREZ, M.; GALIMA, M.M. Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 129, n. 2/3, p. 229–236, 2001.

KELLEY, K.W. From hormones to immunity: the physiology of immunology. **Brain, Behavior, and Immunity**, Orlando, v. 18, p. 95–113, 2004.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; MACHADO-NETO, R. Efeito do fornecimento adicional de colostro sobre as concentrações séricas de IgG, PT e IGF-I de bezerros neonatos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 375-385, 2007.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 9, p. 1309–1323, 2003.

KROGDAHL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A.M.; BAEVERFJORD, G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, p. 361-371, 2003.

KUIKEN, K.A.; PEARSON, P.B. The essential amino acid (except tryptophan) content of colostrum and milk of the cow and ewe. **Nutrition**, Oxford, p.167-176, 1949.

KUPERMAN, B.I.; KUZ'MINA, V.V. The structure of the intestinal epithelium in fish with different types of feeding. **Journal of Fish Biology**, London, v. 44, n. 2, p.181-193, 1994.

KUZ'MINA, V.V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 148, p. 25-37, 1996.

LABARCA, C.; PAIGEN, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 102, p. 344-352, 1980.

LAURÀ, R.; GERMANÀ, G.P.; LEVANTI, M.B.; GUERRERA, M.C.; RADAELLI, G.; CARLOS, F.; SUÁREZ, A.A.; CIRIACO, E.; GERMANÀ, A. Rodlet Cells Development in the Intestine of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, p. 1321–1328, 2012.

LI, Z.H.; ZLABEK, V.; GRABIC, R.; VELISEK, J.; MACHOVA, J.; RANDAK, T. Enzymatic alterations and RNA/DNA ratio in intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, induced by chronic exposure to carbamazepine. **Ecotoxicology**, New York, v. 19, p. 872–878, 2010.

LIMA, A.L.; MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Electrophoretic profile of serum proteins of goat kids fed with bovine colostrum *in natura* and lyophilized. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 113, p. 278-282, 2013.

LOUGHNA, P.T.; GOLDSPIK, G. The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, London, v. 25, p. 223-230, 1984.

MA, H.; CAHU, C.L.; ZAMBONINO INFANTE, J.L.; YU, H.; DUAN, Q.; LE GALL, M.M.; MAI, K. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 245, p. 239–248, 2005.

MA, Q.; LIU, S.F.; ZHUANG, Z.M.; SUN, Z.Z.; LIU, C.L.; SU, Y.Q.; TANG, Q.S. Molecular cloning, expression analysis of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene and IGF-I serum concentration in female and male Tongue sole (*Cynoglossus*

*semilaevis*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B**, Oxford, v. 160, p. 208–214, 2011.

MACHADO-NETO, R.; GRIGOLO, I.H.; MORETTI, D.B.; KINDLEIN, L.; PAULETTI, P. Intestinal histology of Santa Ines lambs fed bovine or ovine colostrum. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 56, n. 10, p. 465–474, 2011.

MACHADO-NETO, R.; PONTIN, M.C.F.; NORDI, W.M.; LIMA, A.L.; MORETTI, D.B. Goblet cell mucin distribution in the small intestine of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p.125–131, 2013.

MALLOY, K.D.; TARGETT, T.E. The use of RNA: DNA ratios to predict growth limitation of juvenile summer flounder (*Paralichthys dentatus*) from Delaware and North Carolina estuaries. **Marine Biology**, Heidelberg, v. 118, p. 367-375, 1994.

MALZAHN, A.M.; CLEMMESSEN, C.; ROSENTHAL, H. Temperature effects on growth and nucleic acids in laboratory-reared larval coregonid fish. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 259, p. 285-293, 2003.

MANERA, M.; DEZFULI, B.S. Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. **Journal of Fish Biology**, London, v. 65, p. 597–619, 2004.

MARCHBANK, T.; DAVISON, G.; OAKES, J.R.; GHATEI, M.A.; PATTERSON, M.; MOYER, M.P.; PLAYFORD, R.J. The nutraceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v.300, p.477–484, 2011.

MAROUX, S.; LOUVARD, M.; BARATTI, J. The aminopeptidases from hog intestinal brush border. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 321, p. 282-295, 1973.

MCCORMICK, S.D; KELLEY, K. M.; YOUNG, G.; NISHIOKA, R.S.; BERN, H.A. Stimulation of Coho Salmon Growth by Insulin-like Growth Factor I. **General and comparative endocrinology**, San Diego, v.86, p.398-406, 1992.

MERCALDO-ALLEN, R.; KUROPAT, C.; CALDARONE, E. M. An RNA: DNA-based growth model for young-of-the-year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). **Journal of Fish Biology**, London, v. 72, p. 1321–1331, 2008.

MITTAKOS, I.; AYALA, M.D.; LÓPEZ-ALBORS, O.; GRIGORAKIS, K.; LENAS, D.; KAKALI, F.; NATHANAILIDES, C. Muscle cellularity, enzyme activities, and nucleic acid content in meagre (*Argyrosomus regius*). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 90, p. 1270-1277, 2012.

MORETTI, D.B.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; MACHADO-NETO, R. Enteric cell proliferation in newborn lambs fed bovine and ovine colostrum. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 127, p. 262–266, 2010.

MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Enzyme activity in the small intestine of goat kids during the period of passive immunity acquisition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 105, p. 321–328, 2012a.

\_\_\_\_\_. Lyophilized bovine colostrum as a source of immunoglobulins and insulin-like growth factor for newborn goat kids. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 145, p. 223–229, 2012b.

\_\_\_\_\_. Goat kids' intestinal absorptive mucosa in period of passive immunity acquisition. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 144, p. 1–10, 2012c.

\_\_\_\_\_. Enteric, hepatic and muscle tissue development of goat kids fed with lyophilized bovine colostrum. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, p. 201–208, 2014a.

MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; CRUZ, T.M.P.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Histochemical distribution of intestinal enzymes of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed lyophilized bovine colostrum. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 1487–1493, 2014b.

MORIYAMA, S. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. **Biosciency Biotechnology Biochemistry**, v. 64, p. 1553-1562, 2000.

NAGATSU, T.; HINO, M.; FUYAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; SAKAKIBARA, S.; NAKAGAWA, Y.; TAKEMOTO, T. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 74, p. 466-476, 1976.

NORDI, W.M.; MORETTI, D.B.; LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Intestinal IgG uptake by small intestine of goat kid fed goat or lyophilized bovine colostrum. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 144, p. 205–210, 2012.

\_\_\_\_\_. Intestinal histology of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 58, n. 5, p. 232–241, 2013.

OLIVAR, M.P.; DIAZ, M.V.; CHÍCHARO, M.A. Tissue effect on RNA: DNA ratios of marine fish larvae. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 73, p. 171-182, 2009.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; FANTA, E. Microscopic morphology and histochemistry of the digestive system of a tropical freshwater fish *Trichomycterus brasiliensis* (U. itken) (Siluroidei, Trichomycteridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 17, p. 953-971, 2000.

OSTAZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; KWASEK, K.; VERRI, T.; KAMASZEWSKI, M.; SLIWINSKI, J.; NAPORA-RUTKOWSKI, L. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu

(*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**, Oxford, v. 245, p. 273–286, 2005.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Águas doces no Brasil: capital ecológico uso e conservação. In: REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Escrituras Editora, 2002. p. 451-471.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W.A.; CHAMMAS, M.A. Potencial para o desenvolvimento da aqüicultura no Brasil. In: OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J. R., SOTO, D. (Ed.). **Estudo setorial para consolidação de uma aqüicultura sustentável no Brasil**. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2007. cap. 11, p. 198-222.

PANDEY, N.N.; DAR, A.A.; MONDAL, D.B.; NAGARAJA, L. Bovine colostrum: a veterinary nutraceutical. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, Nairibi, v. 3, p. 31-35, 2011.

PÁRRIZAS, M.; PLISETSKAYA, E.M.; PLANAS, J.; GUTIÉRREZ, J. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 16-25, 1995.

PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; BAGALDO, A. R.; RODRIGUES, A.P.O.; DELGADO, E. F.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Feeding juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) with lyophilized bovine colostrum: Growth and protein, RNA and DNA content in liver and intestine. In: ADSA PSA AMPA ASAS JOINT ANNUAL MEETING. **Journal of Animal Science**, San Antonio, v. 85, suppl. 1, p. 89, 2007a.

\_\_\_\_\_. Growth performance and muscle protein, RNA and DNA content in juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) fed lyophilized bovine colostrum. In: ADSA PSA AMPA ASAS JOINT ANNUAL MEETING. **Journal of Animal Science**, San Antonio, v. 85, suppl. 1, p. 89, 2007b.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; KINDLEIN, L.; MACHADO-NETO, R. Insulin-like growth factor-I, passive immunity transfer, and stereological characteristics of small intestine of newborn calves. **Animal Science Journal**, Oxford, v. 78, p.631–638, 2007c.

PAYE, J.M.D.; FORSTEN-WILLIAMS, K. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) delivery by IGF binding proteins and receptors. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v. 34, p. 618–632, 2006.

PECK, M.A.; BUCKLEY, L.J.; CALDARONE, E.M.; BENGTON, D.A. Effects of food consumption and temperature on growth rate and biochemical-based indicators of growth in early juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus*. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 251, p. 233–243, 2003.



- PENCHEV GEORGIEV, I. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 11, p. 3–12, 2008.
- PEREZ-SANCHEZ, J.; MARTI-PALANCA, H.; KASHIK, S.J. Ration Size and Protein Intake Affect Circulating Growth Hormone Concentration, Hepatic Growth Hormone Binding and Plasma Insulin-Like Growth Factor-I Immunoreactivity in a Marine Teleost, the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). **Nutrition**, Oxford, v.125, p. 546-552, 1995.
- PERIAGO, M.J.; AYALA, M.D.; LÓPEZ-ALBORS, O.; ABDEL, I.; MARTÍNEZ, C.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ROS, G.; GIL, F. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, p. 175–188, 2005.
- PETERSON, B.C.; WALDBIESER, G.C.; BILODEAU, L. IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 139, p. 317-323, 2004.
- PICHA, M.E.; TURANO, M.J.; BECKMAN, B.R.; BORSKI, R.J. Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: A minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF binding proteins as potential growth indicators in fish. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 70, p. 196–211, 2008.
- PLANAS, J.V.; MÉNDEZ, E.; BAÑOS, N.; CAPILLA, E.; CASTILLO, J.; NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors: A phylogenetic approach. **American Zoologist**, Madison, v. 40, p. 223–233, 2000.
- PRZYBYLSKA, J.; ALBERA, E.; KANKOFER, M. Antioxidants in bovine colostrum. **Reproduction in Domestic Animal**, Oxford, v. 42, p. 402–409, 2007.
- RADAELLI, G.; DOMENEGHINI, C.; ARRIGHI, S.; BOSI, G.; PATRUNO, M.; FUNKENSTEIN, B. Localization of IGF-I, IGF-I receptor, and IGFBP-2 in developing *Umbrina cirrosa* (Pisces: Osteichthyes). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 130, p. 232-244, 2003.
- RAŠKOVIĆ, B.S.; STANKOVIĆ, M.B.; MARKOVIĆ, Z.Z.; POLEKSIĆ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, Belgrade-Zemun, v. 56, p. 87-100, 2011.
- REIFEL, C.W.; TRAVILL, A.A. Gross morphology of the alimentary of the alimentary canal in teleostean species. **Anatomischer Anzeiger**, Deerfield Belt, v. 144, p. 441-449, 1978.
- REINECKE, M.; SCHMID, A.; ERMATINGER, R.; LOFFING-CUENI, D. Insulin-like growth factor i in the teleost *oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene

sequence, tissue expression, and cellular localization. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, p. 3613, 1997.

REINECKE, M. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone–insulin-like growth factor-I system. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, p. 1233–1254, 2010.

REITE, O.B.; EVENSEN, Ø. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, p. 192–208, 2006.

REZENDE, K.F.O.; SANTOS, R.M.; SANTOS, R.M.; SHIMADA, J.C.B.; SILVA, J.R.M.C.; MUNIZ, C.A.S.D. Histopatologia das brânquias de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, provenientes da represa Billings, área de proteção ambiental Bororé-Colônia. **Atas de Saúde Ambiental**, Colômbia, v. 1, n. 1, p. 58-58, 2013.

RIBEIRO, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; CAHU, C.; DINIS, M.T. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, p. 465–473, 1999.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 65-75, 2008.

RODRIGUES, A.P.O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; CYRINO, J.E.P.; DELGADO, E.F.; MACHADO-NETO, R. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 55-563, 2009.

RODRIGUES, A.P.O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; DELGADO, E.F.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Intestinal histomorphology in *Pseudoplatystoma fasciatum* fed bovine colostrum as source of protein and bioactive peptides. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 5, p. 524-530, 2010.

ROOKER, J.R.; HOLT, G.J. Application of RNA: DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Marine and Freshwater Research**, East Melbourne, v. 47, n. 2, p. 283–290, 1996.

ROSENZWEIG, S.A. What's new in the IGF-binding proteins? **Growth Hormone & IGF Research**, Philadelphia, v. 14, p. 329 –336, 2004.

ROTWEIN, P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. **Growth factors**, v.5, p. 3-18, 1991.

RYAN, J.T.; ROSS, R.P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, Basel, v. 3, p. 765-791, 2011.

SAMPAIO-OLIVEIRA, A.M.B.M.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, 2004. cap. 8, p. 217-238.

SCHEP, L.J.; TUCKER, I.G.; YOUNG, G.; LEDGER, R.; BUTT, A.G. Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 59, p. 1–14, 1999.

SCHMACHTENBERG, O. Epithelial sentinels or protozoan parasites? Studies on isolated rodlet cells on the 100th anniversary of an enigma. **Revista Chilena de Historia Natural**, Santiago de Chile, v. 80, p. 55-62, 2007.

SCHÜTZ, J.H.; NUÑER, A.P.O. Growth and survival of Dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 435-444, 2007.

SEIXAS FILHO, J.T.; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A.T.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; MENIN, E. Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.

\_\_\_\_\_. Anatomia funcional e morfometria do intestino no teleostei (Pisces) de água doce surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* - Agassiz, 1829). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1670-1680, 2001.

SENA, M.F.; AZEVEDO, R.V.; RAMOS, A.P.S.; CARVALHO, J.S.O.; COSTA, L.B.; BRAGA, L.G.T. Farelos da vagem da algaroba e da folha da mandioca em rações para tilápia do Nilo em crescimento. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 3, p. 116-1125, 2012.

SILVERSTEIN, J.T.; WOLTERS, W.R.; SHIMIZU, M.; DICKHOFF, W.W. Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels, feed intake and efficiency and body composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 190, p. 77–88, 2000.

SIVARAMAN, G.K.; RAJEEV KAPILA; MAHANTA, P.C. RNA-DNA ratios as an indicator of fish growth in golden mahseer (*Tor putitora*). **Asian Fisheries Science**, Selangor, v. 22, p. 117-123, 2009.

SHIMIZU, M.; BECKMAN, B.R.; HARA, A.; DICKHOFF, W.W. Measurement of circulating salmon IGF binding protein-1: assay development, response to feeding ration and temperature, and relation to growth parameters. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 188, p. 101–110, 2006.

SHVED, N.; BAROILLER, J.F.; EPPLER, E. Further insights into the insulin-like growth factor-i system of bony fish pituitary with special emphasis on reproductive

phases and social status. **Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology**, New York, v. 1163, p. 517–520, 2009.

SKRZYPEK, T.; VALVERDE PIEDRA, J.L.; SRZYPEK, H.; WOLIŃSKI, J.; KAZIMIERCZAK, W.; SZYMANCZYK, S.; PAWLOWSKA, M.; ZABIELSK, R. Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Grzegorzeczka, v. 56, p. 71-87, 2005.

SKRZYPEK, T.; VALVERDE PIEDRA, J.L.; SRZYPEK, H.; KAZIMIERCZAK, W.; BIERNAT, M.; ZABIELSK, R. Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Grzegorzeczka, v. 58, p. 87-95, 2007.

SMEATON, T.C.; SIMPSON-MORGAN, M.W. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the foetal and neonatal lamb. **Australian Journal Experimental Biology Medical Science**, Adelaide, v. 63, p. 41-51, 1985.

SPARKS, A.L.; KIRKPATRICK, J.G.; CHAMBERLAIN, C.S.; WALDNER, D.; SPICER, L.J. Insulin-like growth factor-I and its binding proteins in colostrum compared to measures in serum of Holstein neonates. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 6, p. 2022-2029, 2003.

SPARRE, P.; VENEMA, S.C. **Introduction to tropical fish stock assessment**, part 1: manual. Rome: FAO. 1998. 407 p. (FAO Fisheries Technical Paper).

STEFANI, C.; LIVERANI, C.A.; BIANCO, V.; PENNA, C.; GUARNIERI, T.; COMPARETTO, C.; MONTI, E.; VALENTE, I.; PIERALLI, A.L.; FIASCHI, C.; ORIGONI, M. Spontaneous regression of low-grade cervical intraepithelial lesions is positively improved by topical bovine colostrum preparations (GINEDIE®). A multicentre, observational, italian pilot study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 18, p. 728-733, 2014.

STIERHOFF, K.L.; TARGETT, T.E.; POWER, J.H. Hypoxia-induced growth limitation of juvenile fishes in an estuarine nursery: assessment of small-scale temporal dynamics using RNA: DNA. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 66, p. 1033–1047, 2009.

STREIT, A.A.R. **Efeito da exposição crônica a amônia (NH<sub>3</sub>) no crescimento e nas aminotransferases de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis***. 2006. 34 p. Dissertação. (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

STROBAND, H.W.J.; van der VEEN, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Journal of Experimental Zoology**, Muzaffarnagar, v. 218, p. 149-156, 1981.

SWAIN, P.; NAYAK, S.K. Role of maternally derived immunity in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 27, p. 89–99, 2009.

TESSER, M.B.; TERJESEN, B.F.; ZHANG, Y.; PORTELLA, M.C.; DABROWSKI, K. Free- and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, p. 443–453, 2005.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T.; SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, p. 317–327, 2000.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; SMITH, S.A.; CHATREEWONGSIN, U. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p. 241–251, 2002.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. cap. 8, p. 205-244.

VALENTI, W.C. **A aqüicultura brasileira é sustentável?** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE Aqüicultura, MARICULTURA E PESCA, 4., 2008, Florianópolis. p. 1-11. Disponível em: <<http://www.avesui.com/anais>>. Acesso em: 07 out. 2013.

XIAN, C.J.; SHOUBRIDGE, C.A.; READ, L.C. Degradation of IGF-I in the adult rat gastrointestinal tract is limited by a specific antiserum or the dietary protein casein. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.146, p. 215–225, 1995.

XIONG, D.; ZHANG, L.; YU, H.; XIE, C.; KONG, Y.; ZENG, Y.; HUO, B.; LIU, Z. A study of morphology and histology of the alimentary tract of *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 92, p. 161–169, 2011.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 257-286.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L.; PERES, A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *dicentrarchus labrax* larval development. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, p. 608–614, 1997.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v.130, n.4, p.477-487, 2001.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. **Aquaculture**, Oxford, v. 268, p.98–105, 2007.

ZÁNDOKI, R.; CSAPÓ, J.; CSAPÓ-KISS, Z.; TÁBORI, I.; DOMOKOS, Z.; SZÚCS1, E.; TÓZSÉR, J. Change of amino acid profile in Charolais cows'

colostrum and transient milk during the first week post partum. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 51, p. 375–382, 2006.

ZOUITEN, D.; KHEMIS, I.B.; BESBES, R.; CAHU, C. Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in “mesocosms”. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 279, p. 166-172, 2008.