

# INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE PROTEÍNA E CARBOIDRATO NA DIETA SOBRE OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE JUVENIS DE SURUBIM (*Pseudoplatystoma* sp) DESAFIADOS COM LPS

Luana Camargo Sousa<sup>1</sup>, Márcio Kazuaki Kishimoto<sup>2</sup>, Viviane Almeida Santana do Nascimento<sup>3</sup>, Basia Schlichting Moromizato<sup>4</sup>, Ubiracy Lopes Ribeiro Junior<sup>5</sup>, Leonardo Susumu Takahashi<sup>6</sup>, Jaqueline Dalbello Biller-Takahashi<sup>7</sup>

1 - CAUNESP Jaboticabal

2 - Unesp Dracena

3 - Unesp Dracena

4 - Unesp Dracena

5 - Unesp Dracena

6 - Unesp Dracena

7 - Unesp Dracena

8 - Unesp Dracena

RESUMO - O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência de dietas com diferentes níveis de proteína (P) e carboidratos (CH) nos parâmetros bioquímicos de juvenis de surubim (*Pseudoplatystomas* sp.), desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo extraído de *Escherichia coli*). O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da UNESP - Campus de Dracena, distribuído em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições (38P/22CH; 38P/26CH; 38P/30CH; 42P/22CH; 42P/26CH; 42P/30CH). A dieta 38P/30CH promoveu valores médios significativamente maiores para as concentrações de proteína e globulina, sem alterações após o desafio com LPS. Após serem desafiados, os peixes apresentaram concentrações mais baixas de albumina sérica. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Duncan (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

Palavras-chave: *Pseudoplatystoma* sp; lisozima; atividade hemolítica do complemento; globulina; albumina.

## INFLUENCE OF PROTEIN AND CARBOIDRATE LEVELS ON THE DIET ON THE IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SURUBIM JUVENILE (*Pseudoplatystoma* sp) CHALLENGED WITH LPS

ABSTRACT - The present work aims to evaluate the influence of diets with different levels of protein (P) and carbohydrates (CH) on the biochemical parameters of juveniles of surubim (*Pseudoplatystoma* sp.), challenged with LPS (Lipopolysaccharide extracted from *Escherichia coli*). The experiment was conducted in the Aquaculture Laboratory of UNESP - Dracena Campus, distributed in a completely randomized design with six treatments and four replicates (38P / 22CH, 38P / 26CH, 38P / 30CH, 42P / 22CH, 42P / 26CH, 42P / 30CH). The 38P / 30CH diet promoted significantly higher mean values for protein and globulin concentrations, without changes after challenge with LPS. After challenge, fish had lower serum albumin concentrations. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the Duncan Test (5%), using the statistical program SAS, version 9.0.

Keywords: *Pseudoplatystoma* sp; Lysozyme; Complement hemolytic activity; globulin; albumin

---

## Introdução

Devido às qualidades zootécnicas e organolépticas do surubim, a criação em cativeiro avançou significativamente nos últimos anos, e proporcional a este crescimento, o aparecimento de doenças e infecções bacterianas surgiram nestes sistemas, comprometendo a cadeia produtiva. Especificamente para os peixes carnívoros, a fração proteica tem grande importância em razão da disponibilidade de alimentos na natureza. No entanto, a inclusão de carboidratos não estruturais na formulação da dieta, como o amido pré-gelatinizado, pode apresentar ganho econômico e ambiental, minimizar a excreção de amônia e causar um efeito poupador de proteína, disponibilizando-a para seu crescimento (RAMÍREZ, 2005). Os metabólitos do sangue e as concentrações dos fluidos corporais também recebem influência da dieta, uma vez que o perfil metabólico do animal se altera no processo de digestão e absorção dos nutrientes. O metabolismo é uma ferramenta viável para analisar a relação entre os processos bioquímicos de digestão e seu resultado no organismo (LUNDSTEDT et al, 2004).

---

## Revisão Bibliográfica

A utilização de carboidratos como fonte energética para carnívoros levanta uma série de questões a serem estudadas uma vez que estes peixes possuem baixa capacidade para utilizar este ingrediente. A alimentação tem influência direta no sistema imune dos peixes, bem como no sistema endócrino e na capacidade de resistência às infecções. Uma ferramenta favorável na avaliação do bem-estar e da saúde dos peixes é analisar as características bioquímicas, imunológicas e hematológicas assim como a resposta metabólica e fisiológica do peixe posteriormente ao fornecimento de uma dieta rica em carboidratos, a fim de averiguar quais benefícios e malefícios aquela dieta trouxe ao organismo do animal, a fim de contribuir para que as formulações se tornem mais precisas e atendam as demandas dos animais nos sistemas de produção (AZAZA et al., 2010). Para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, o sistema imune inato é extremamente importante, principalmente porque para muitas espécies, a resposta imunológica adquirida é lenta (MAGNADÓTTIR, 2006). As bactérias são as maiores causadoras de doenças por todo o mundo, inclusive nos peixes. Para resistir a estas invasões, os peixes dispõem de mecanismos inatos e específicos, humorais e celulares que são responsáveis por produzir uma série de compostos antibacterianos. Compõem os elementos humorais inatos o que chamamos de inibidores do crescimento das bactérias: as antiproteases, lisozima, proteínas do sistema complemento (ativada pela via alternativa e da lectina). Estes inibidores serão responsáveis por influenciar e potencializar a ação das células de defesa do organismo no hospedeiro. Para que uma bactéria consiga instalar a infecção no organismo é necessário que ela supere algumas respostas de defesa desencadeadas imediatamente à presença do patógeno, como os fagócitos (células de defesa representadas por neutrófilos e macrófagos, responsáveis por fagocitar o invasor) e a produção de EROs (que são responsáveis diretos pela destruição bacteriana). Essas respostas que inibem o crescimento bacteriano são importantes para evitar que qualquer colônia se dissemine por órgãos e tecidos causando danos mais graves ao organismo do animal (ELLIS, 2001).

---

## Materiais e Métodos

Os juvenis de surubim (216 animais) com peso médio de 23 g e aproximadamente 15 cm foram adquiridos de produtores comerciais. Foram formuladas seis dietas experimentais com suplementação mineral e vitamínica completa. As dietas foram:

38P/22CH; 38P/26CH; 38P/30CH; 42P/22CH; 42P/26CH; 42P/30CH. Durante 60 dias, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais, até a saciedade aparente, em três refeições diárias (19h; 22h e a 01h). Após 60 dias de experimento, os animais foram anestesiados com Eugenol (1g 10-l de água) e desafiados por meio de injeção intraperitoneal de 0,1 mL da endotoxina LPS por grama de peixe (500 µg kg<sup>-1</sup> PV). A substância utilizada no desafio dos peixes foi o lipopolissacarídeo extraído da parede celular de *Escherichia coli* (026:B6, Sigma, St. Louis, MO, USA). No terceiro dia após o desafio foi colhido sangue para posteriores análises dos parâmetros bioquímicos e imunológicos. A coleta do sangue foi realizada em três animais por repetição, totalizando 12 animais por tratamento. Foram realizadas duas amostragens, indicadas como AD (antes dos animais serem desafiados com LPS) e DD (depois dos animais serem desafiados com LPS). A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do Biureto (CAIN e SKILLETER, 1987) e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Albumina 19, Labtest, Lagoa Santa, MG). A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total. Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller et al. (2013). A determinação da atividade de lisozima foi baseada no método clássico de causar lise uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS e HARTSELL, 1949). A determinação da atividade hemolítica do complemento – via alternativa, foi determinada de acordo com metodologia previamente descrita por Biller et al (2012).

---

## Resultados e Discussão

As exigências com relação à utilização de carboidratos nas dietas para peixes tropicais de água doce ainda não foram completamente estabelecidas. Entretanto, no presente trabalho foi possível observar que os surubins (*Pseudoplatystomasp*) alimentados com a dieta 38P/30CH apresentaram melhores resultados para proteína e globulina, quando comparados às demais dietas, como apresentados na Tabela 1. Para os mesmos índices, não houve influência do desafio com LPS. Em relação aos valores encontrados para albumina, não houve influência da dieta, somente do desafio, onde os peixes apresentaram valores significativamente piores após o desafio. Apesar de não haver diferenças estatísticas, numericamente os valores de proteína e globulina foram maiores após os peixes terem sido desafiados, indicando uma possível tentativa do organismo em responder ao estímulo antigênico, mesmo em uma condição fisiológica sub-ótima, ou seja, mobilizaram energia para manutenção dos parâmetros bioquímicos em uma situação estressante. Um possível fator que possa ter limitado a utilização dos carboidratos por parte dos peixes, é a hiperglicemia pós-prandial prolongada, normalmente observada em peixes carnívoros com uma dieta rica em carboidratos (WILSON, 1994, LEGATE et al, 2001). Muitos trabalhos têm discutido as respostas fisiológicas dos peixes, tais como as respostas hematológicas e imunológicas após a alimentação com diferentes proporções de nutrientes, além dos estudos relativos aos agentes químicos, manejo, densidades populacionais altas e à inoculação de patógenos (COSTA et al., 2004; GONÇALVES, 2009). No presente estudo, algumas respostas imunes foram avaliadas, dentre elas a atividade respiratória de leucócitos, que avalia a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos fagócitos competentes, para destruição de patógenos invasores; e foi possível observar que as diferentes concentrações de proteína/carboidrato não influenciaram a resposta de defesa oxidativa dos peixes. Os resultados para lisozima diferiram estatisticamente entre si comparando entre as dietas, sendo que a lisozima apresentou-se numericamente maior para as dietas com níveis de carboidrato maiores (em dietas isoproteicas). Já para as coletas, após os peixes serem desafiados, os valores na concentração de lisozima dobrou quando comparados antes do desafio, demonstrando a capacidade que os animais apresentaram em responder após o reconhecimento do patógeno, a fim de defender o organismo contra o invasor. Para o sistema complemento, no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre as dietas, mostrando que a inclusão de carboidratos dietéticos em níveis crescentes não influenciou este parâmetro do sistema imune dos peixes.

---

## Conclusões

As diferentes relações de proteína e carboidrato nas dietas resultaram em melhor resposta nos peixes que receberam a dieta 38P/30CH, reforçando a importância de um adequado balanceamento entre os componentes da dieta. Por outro lado não foi observado um comprometimento da condição fisiológica do animal, mostrando a capacidade desses animais em responder ao desafio com LPS.

---

## Referências

AZAZA, M. S.; DHRAIEF, M. N.; KRAIEM, M. M.; BARAS, E. Influences of food particle size on growth, size heterogeneity, feed efficiency and gastric evacuation of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758. *Aquaculture*, v.309, p. 193-202, 2010. BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C.; Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 2, p. 237-241, 2012. BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 73, n. 2, (in press). CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds), *Biochemical Toxicology*, Oxford, IRL Press, p.217-254, 1987. COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalmiinae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, v. 231, p. 627- 636, 2004. ELLIS, A. E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. *Development and Comparative Immunology*, v. 25, p. 827-839. 2001. GONÇALVES, A. Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina. 65f. Tese (doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009. LEGATE, N. J.; BONEN, A.; MOON, T. E. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla Anguilla*), and black bulhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology*, v. 122, p. 48-59, 2001. LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v. 137, p. 331 –339, 2004. MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 20, p. 137-151, 2006. RAMÍREZ, A. P. 2005. Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Tese (Doutorado), Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil. ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S. F.; MARTINO, R.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, v. 34, n. 1, p. 28-34, 2003. SMOLELIS, A.N. e HARTSELL. S. E. The determination of lysozyme. *Journal of Bacteriology*. 58(6): 731-736. 1949. WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, v.124, p. 67-80, 1994.