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

Proteção antioxidante do colostro bovino em células intestinais de juvenis de
pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse

Mariana Caroline Furian Pontin

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

Piracicaba
2018

Mariana Caroline Furian Pontin
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Proteção antioxidante do colostro bovino em células intestinais de juvenis de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse

Orientadora:
Profa. Dra. **DEBORA BOTÉQUIO MORETTI**

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

Piracicaba
2018

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

Pontin, Mariana Caroline Furian

Proteção antioxidante do colostro bovino em células intestinais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse / Mariana Caroline Furian Pontin. - - Piracicaba, 2018.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Adensamento 2. Célula caliciforme 3. Caspase-3 4. Teleósteo I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus, Maria e ao meu anjo da guarda, por toda proteção, bênçãos, providências, zelo comigo e por serem minha fortaleza e fiéis companheiros.

À minha família, em especial, minha mãe, avó, avô (*in memorian*) e Flávio, por todo apoio, cuidado, amor, orações e incentivo.

A Débora, pela orientação, ensinamentos, oportunidades e pelas longas conversas sobre ciência.

Ao professor Raul pelos ensinamentos, cuidado, conselhos e por aceitar estar presente em mais um momento da minha vida, como membro da banca avaliadora.

Ao professor José Roberto pela competência em seu trabalho e pela gentileza de aceitar participar como membro da banca de defesa.

À professora Patrícia, por ensinar com dedicação e êxito, e pela gentileza de aceitar participar como membro da banca de defesa.

À professora Ouliana, pela orientação, acolhida, paciência e ensinamentos. À Mary, professor Marck, Sally, Aejin, Suzana, Priscila e Carlos, pelo convívio, acolhida, amizade e suporte.

À professora Sônia, por toda atenção, dedicação e orientação nas análises estatísticas.

Ao professor José Eurico, pelo direcionamento nos experimentos a campo.

Ao João Fernandes, pela formulação das rações e orientações durante o experimento a campo.

Aos técnicos do setor de piscicultura, Júnior e Sérgio, pela paciência, orientações e compartilhamento do conhecimento.

Aos funcionários da zoologia, José Luís e Rose, pelas ajudas, conversas e bom convívio.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente Airton, Paulo, Ronaldo, Thaís, Alex e Eliana por toda atenção, ajuda e boa convivência.

Aos colegas de laboratório, Wiolene, Jéssica, Helô, Isa, Eduardo, Carol e Natasha, pelo convívio, ensinamentos, almoços, comilanças.

Aos meus amigos de departamento e graduação, Dô-náufrago, Diana, Álvaro, Piazinho, Dani e Tiago, pela amizade, suporte e conversas.

À Tati e Nati pelo companheirismo, pela amizade, pelos conselhos, inúmeros cafés da tarde, risadas, orações, por sermos colo uma da outra e por estarem tão presentes na minha vida mesmo distantes.

Aos meus amigos da Renovação Carismática Católica (RCC) por cuidar de mim e de meus amigos como filhos, dar-nos apoio e serem amigos e, por todas as formações e encontros que nos aproximaram de Deus e Maria.

Aos meus amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR), pelo companheirismo, amor, perseverança e orações, Alisson, Bá, Babs, Bruna, Camila, Carol, Cláudia, Dani Castan, Daniel, Fábio, Fernando, Fly, Gabriel, Isabel, Iza, Josi, Ju, Lenise, Lucas, Márcio, Mari, Marininha, Pedrinho, Rebecca, Tami, Thainá.

Às irmãs do Cenáculo, pelo cuidado, atenção, carinho e gentileza.

Aos meus psicólogos, Renato e Faride, pelo cuidado, apoio e incentivo.

Aos meus professores pela dedicação, disponibilidade e pelo compartilhamento do conhecimento em sala de aula.

À Universidade de São Paulo pela excelência e competência em ensino, pesquisa e extensão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de mestrado e pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), na The Ohio State University.

“A amizade se expressa na ajuda mútua e na gratidão”

Santo Agostinho

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um vasto oceano.

O arranjo maravilhoso e a harmonia do universo

não poderiam senão sair de um

ser onísciente e onipotente.”

Newton

SUMÁRIO

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. FILOGENIA DO PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>)	13
2.2. SISTEMA DIGESTIVO DOS PEIXES	14
2.3. MORFOLOGIA E HISTOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO E RETO DE PEIXE	15
2.4. CÉLULAS CALICIFORMES	16
2.5. ESTRESSE E EPITÉLIO INTESTINAL	19
2.6. COLOSTRO	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	23
3.2. LOCAL DO EXPERIMENTO	23
3.3. FORMULAÇÃO E PREPARO DAS RAÇÕES PARA CADA TRATAMENTO	23
3.4. EXPERIMENTO DE ADENSAMENTO	27
3.5. COLETA E PREPARO DOS TECIDOS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS:	29
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	67

RESUMO

Proteção antioxidante do colostro bovino em células intestinais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse

O estresse causa modificações no epitélio intestinal, tais como o aumento de células caliciformes e da taxa de apoptose. O uso de alimentos nutracêuticos tem sido uma alternativa para amenizar essas modificações sobre o tecido epitelial. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se a inclusão de colostro bovino, o qual é constituído de fatores antioxidantes, imunes e de crescimento, seria capaz de amenizar as consequências do estresse crônico sob o intestino. Para isso, juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adensados a 50 kg/m³ foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade com ração peletizada e semi-purificada sem (0%CBL) e com a inclusão de colostro bovino liofilizado em concentrações crescentes (10, 20 e 30%CBL), (n=4). Após 28 dias, foram coletados segmentos do intestino médio, S1 e S2, e reto. Os tecidos foram marcados com corantes histológicos para a quantificação de células caliciformes contendo mucinas neutras, ácidas (incluindo sialo e sulfomucinas) e ácidas-neutras. Também foram mensurados o volume (V_v) e a densidade da superfície (S_v) da mucosa, por análise estereológica, e a espessura da camada muscular. A razão do número de cada tipo e subtipo de célula caliciforme sobre o V_v e S_v foi calculada para estimar a densidade de células caliciformes, D_v e D_s , respectivamente. A taxa apoptótica foi analisada qualitativamente através da intensidade (alta, média e baixa) da imunomarcação da caspase-3 nas células epiteliais. As dietas não influenciaram os parâmetros zootécnicos analisados ($P>0,05$). No reto, os grupos que receberam 20 e 30%CBL apresentaram menor número de células caliciformes contendo sulfomucinas e menor D_s em relação a 0 e 10% ($P=0,0148$ e $0,0198$, respectivamente). No RT, D_v total e D_v de células caliciformes contendo mucinas ácidas foi maior em 0 e 30%CBL em relação a 20%CBL ($P=0,0155$ e $0,225$, respectivamente). No S1, 10 e 30%CBL apresentaram maior D_v em relação a 20%CBL ($P=0,0540$). A espessura da camada muscular, o V_v e a S_v não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). No S2 e RT, a taxa de apoptose teve relação inversa à concentração de colostro bovino liofilizado adicionado na ração. Nos três segmentos, houve maior proporção de células caliciformes contendo mucinas ácidas do que neutras, sendo a maioria representada por sulfomucinas. Assim, a inclusão de colostro bovino liofilizado nas rações de juvenis de pacu adensados diminuiu a apoptose nos segmentos intestinais S2 e RT e também diminuiu o número de células caliciformes contendo sulfomucinas no RT, indicando que o colostro bovino liofilizado pode ser utilizado como alimento nutracêutico para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) adensados, a fim de diminuir a taxa apoptótica e proteger o intestino contra enzimas bacterianas, uma das principais funções das sulfomucinas.

Palavras-chave: Adensamento; Célula caliciforme; Caspase-3; Teleósteo

ABSTRACT

Antioxidant protection of bovine colostrum on intestinal cells of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to stress

The stress causes changes in the intestinal epithelium, such as the increase in the number of goblet cells and on the rate of apoptosis. The use of nutraceutical foods has been an alternative to soften these modifications on the epithelial tissue. Thus, this study aimed to evaluate if the inclusion of bovine colostrum, which is composed of antioxidant, immune and growth factors, would be able to attenuate the consequences of chronic stress on the intestine. For this, pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*), stocked at density of 50 kg/m³, were fed twice daily until satiety with pelleted and semi-purified diet without (0% LBC) and with the inclusion of lyophilized bovine colostrum in increasing concentrations (10, 20 and 30% LBC), (n = 4). After 28 days, segments of the middle gut, S1 and S2, and rectum (RT) were collected. The tissues were stained with histological dyes for the quantification of goblet cells containing neutral, acidic (including sialo and sulphomucins) and acid-neutral mucins. The volume (V_v) and surface density (S_v) of the mucosa were also measured by stereological analysis and the thickness of the muscular layer. The ratio between the number of each goblet cell type and subtype and the V_v or S_v was calculated to estimate the density of goblet cells, D_v and D_s , respectively. The apoptotic rate was analyzed qualitatively according to the intensity (high, medium and low) of caspase-3 immunostaining in epithelial cells. The diets did not influence the zootechnical parameters analyzed ($P > 0.05$). In the rectum, the groups that received 20 and 30% LBC presented lower number of goblet cells containing sulphomucins and lower D_s in relation to 0 and 10% ($P = 0.0148$ and 0.0198 , respectively). In RT, total D_v and D_v of goblet cells containing acid mucins were higher in 0 and 30% LBC in relation to 20% LBC ($P = 0.0155$ and 0.225 , respectively). In S1, 10 and 30% LBC presented higher D_v in relation to 20% LBC ($P = 0.0540$). Muscle layer thickness, V_v and S_v did not differ between treatments ($P > 0.05$). In S2 and RT, the rate of apoptosis was inversely related to the concentration of lyophilized bovine colostrum added in the diet. In the three segments, there was higher proportion of goblet cells containing acidic than neutral mucins, most of them being sulphomucins. Thus, the inclusion of lyophilized bovine colostrum in diets of pacu juveniles reduced apoptosis in the intestinal segments S2 and RT and also decreased the number of goblet-containing sulphomucins in the RT, indicating that lyophilized bovine colostrum can be used as a nutraceutical feed for pacus (*Piaractus mesopotamicus*) under high stocking density to decrease the apoptotic rate and protect the intestine against bacterial enzymes, one of the main functions of sulphomucins.

Keywords: Stocking density; Goblet cell; Caspase-3; Teleoste

1. INTRODUÇÃO

Com a importância comercial cada vez maior da aquicultura nos últimos anos, a criação em viveiros confinados tem se tornado uma prática crescente no setor da piscicultura. Contudo, nestes sistemas, os animais são expostos a diversas condições adversas, como alta densidade, baixa concentração de oxigênio dissolvido na água e alto pH. Essas situações de estresse causam perda de peso e maior predisposição a doenças, causando indesejáveis perdas produtivas no cultivo.

Essas situações estressantes, sejam elas físicas ou psicológicas, causam modificações na organização e fisiologia da barreira intestinal, como modificações nas proteínas das junções intercelulares e aumento do número de células caliciformes e produção de mucinas. Essas alterações resultam em maior permeabilidade intestinal, possibilitando a passagem de peptídeos bacterianos e de moléculas com potencial antigênico do lúmen para o endotélio, ocasionando possíveis doenças.

A via pela qual o estresse influencia a barreira intestinal ainda não foi elucidada. No entanto, diversos estudos relacionaram o estímulo de mastócitos e a presença de hormônio liberador de corticotropina (CRH) com a disfunção da barreira intestinal, evidenciando que haja estreita relação de células neurais com células imunes, controlando a integridade desta estrutura.

Diante disso, diversos estudos buscam alternativas para amenizar os danos do estresse na barreira intestinal e, assim, conferir melhor saúde ao animal e eficiente produção. Uma dessas alternativas seria suplementar a dieta de animais sob condições adversas com alimentos nutracêuticos, como o colostro, que, além de fatores nutricionais, possui altas concentrações de fatores antioxidantes, de crescimento e imunes, sendo um promissor alimento capaz de influenciar o epitélio intestinal.

Desta forma, com o crescimento da aquicultura no Brasil, suplementar as rações com esta secreção láctea seria uma possível alternativa para amenizar as mudanças ocorridas no epitélio intestinal de peixes cultivados em condições adversas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Filogenia do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, foi descrito por Homberg em 1887, pertence à ordem Characiformes, família Serrasalminae e gênero *Piaractus* (Figura 1). É encontrado na América do Sul, sendo uma espécie nativa no Brasil, onde é presente nas Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (URBINATI; CYRINO; BALDISSEROTTO, 2014). Alimenta-se de folhas, flores, frutos, sementes e, menos frequentemente, de insetos, moluscos e peixes, sendo assim, classificado como onívoros e eurípagos (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

Figura 1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Fonte: BRITSKI et al. (2007).

Para reproduzir-se, o pacu realiza migração rumo às nascentes dos rios, enquanto ocorre o amadurecimento das gônadas. Possui desova total, principalmente no mês de novembro, e fecundação externa (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

A maior parte da produção de aquicultura continental do Brasil deve-se às tilápias (47%) e ao grupo dos peixes redondos, como tambaqui, tambacu, pacu e tabatinga (36%). A produção de pacu ocupa a quinta posição nacional de produção de aquicultura continental (SEBRAE, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de espécies cultivadas no Brasil (toneladas)

Produção de espécies cultivadas no Brasil de 2007 a 2011 (toneladas)					
Espécie	2007	2008	2009	2010	2011
Tilápia	95.091,00	111.145,00	132.957,00	155.450,80	253.824,10
Tambaqui	30.598,00	38.833,00	46.454,00	54.313,10	111.084,10
Tambacu	10.854,00	15.458,00	18.492,00	21.621,40	49.818,00
Carpa	36.631,00	67.624,00	80.895,00	94.579,00	38.079,10
Pacu	12.397,00	15.189,00	18.171,00	21.245,10	21.689,30
Tabatinga	2.028,00	3.514,00	4.204,00	4.915,60	14.326,40
Pirapitinga	330	560	670	1.365,60	9.858,70
Pintado	1.592,00	1.777,00	2.126,00	2.486,50	8.824,30
Curimatã	2.721,00	3.736,00	4.469,00	5.226,00	7.143,10
Bagre	2.102,00	2.912,00	3.484,00	4.073,40	7.048,10
Matrinxã	2.899,00	2.131,00	2.550,00	2.981,90	5.702,10
Outros	5.222,00	8.121,00	9.715,00	11.359,60	5.372,20
Piau	3.491,00	5.227,00	6.252,00	7.227,60	4.309,30
Truta	2.196,00	3.662,00	4.381,00	5.122,70	3.277,20
Jundiá	667	911	1.089,00	1.274,30	1.747,30
Pirarucu	6	7	8	10,4	1.137,10
Traíra	140	190	227	266,3	926,5
Piraputanga	842	976	1.167,00	783,6	265
Cascudo	-	26	31	37,1	58
Total	209.807,00	281.999,00	337.342,00	394.340,00	544.489,90

Fonte: Adaptado de SEBRAE (2015).

2.2. Sistema digestivo dos peixes

O sistema digestivo dos peixes tem ampla variação anatômica, a qual pode estar relacionada à dieta e/ou ao comprimento do animal (KRAMER; BRYANT, 1995). Exemplos das diferenças que podem ocorrer são: presença ou ausência de estômago, presença, ausência e número de cecos pilóricos e intestino com diferentes comprimentos (KRAMER; BRYANT, 1995; URBINATI; CYRINO; BALDISSEROTTO, 2014). Também há diferença quanto aos órgãos acessórios, como o tamanho do fígado e a anatomia do pâncreas. Em alguns peixes, o pâncreas é um órgão compacto, mas na maioria deles encontra-se como um tecido difuso localizado ao longo da veia porta, podendo adentrar o fígado, sendo chamado de hepatopâncreas (URBINATI; CYRINO; BALDISSEROTTO, 2014).

No pacu, o sistema digestivo inicia na boca, com a presença de dentes molariformes adaptados a triturar alimentos duros, seguida pelo esôfago, estômago com cecos pilóricos, intestino e ânus (Figura 2). Possui vesícula biliar, fígado e pâncreas difuso pelo fígado,

formando o hepatopâncreas (URBINATI; CYRINO; BALDISSEROTTO, 2014) (Figura 2).

Figura 2. Sistema digestivo do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), mostrando o esôfago, estômago com cecos pilóricos, intestino e ânus.

Fonte: Autoria própria.

2.3. Morfologia e histologia do intestino médio e reto de peixe

O comprimento relativo do trato digestivo (razão do comprimento do trato digestivo sobre o comprimento do corpo) de peixes está diretamente relacionado com o tamanho corporal, entretanto, essas variações também estão relacionadas com o hábito alimentar dos mesmos. Em peixes de mesmo tamanho, herbívoros e detritívoros têm intestino consideravelmente mais longo em relação a um peixe onívoro, que por sua vez, é maior que de um peixe carnívoro (KRAMER; BRYANT, 1995).

O intestino é um órgão em forma de tubo, por onde passam os alimentos a serem digeridos e absorvidos, inicia-se na válvula pilórica e termina no reto e, diferentemente dos mamíferos, não é separado em intestino delgado e grosso. No entanto, o intestino dos teleósteos também pode ser separado em pelo menos dois segmentos intestinais. O primeiro é chamado de intestino médio, onde ocorre a absorção de nutrientes como

monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, e o segundo, é chamado de íntestino posterior ou reto, onde ocorre a absorção de macromoléculas por pinocitose (ROTTA, 2003). Este segmento é caracterizado pelo maior número de células caliciformes na mucosa e maior espessura da camada muscular em comparação ao íntestino médio. A presença da válvula íleo-retal, uma constrição no final do íntestino médio, caracteriza a classificação da região final do íntestino dos teleóteos em reto, como ocorre no pacu, e a sua ausência, em íntestino posterior (BERTIN, 1958). Morfologicamente, é possível observar pregas íntestinais, que são dobras da mucosa que conferem aumento da área de superfície. A intensidade e tamanho destas pregas variam de acordo com o hábito alimentar dos peixes, sendo maiores e mais frequentes em carnívoros e menores e menos frequentes em herbívoros (ROTTA, 2003).

O íntestino dos peixes, assim como dos demais mamíferos, é constituído por uma camada mucosa voltada para a luz íntestinal responsável pelos processos digestivos e absorptivos. As camadas musculares, constituídas de uma camada circular ínterna e outra longitudinal externa de músculo liso, são responsáveis pelos movimentos peristálticos. Por último, encontra-se a camada serosa, constituída de uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo e de epitélio pavimentoso simples denominado mesotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; RASKOVIC et al., 2011).

A mucosa do íntestino é composta por um tecido epitelial simples cilíndrico com um tecido conjuntivo frouxo subjacente a ele e pela camada muscular da mucosa (MADARA, 2011). Neste epitélio, estão presentes diferentes tipos de células, principalmente enterócitos e células caliciformes. Enterócitos são as células que compõem a maioria do epitélio, têm função de absorção e possuem microvilosidades em sua membrana celular apical, que assim como as pregas íntestinais, contribuem para o aumento da área de superfície. Entre os enterócitos é possível encontrar as células caliciformes, que são células produtoras de mucina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MADARA, 2011).

2.4. Células caliciformes

As células caliciformes são encontradas no epitélio do trato respiratório e digestivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No íntestino, situam-se dispersas entre os enterócitos e a principal função destas células é a produção de mucinas, que em contato com a água formam uma camada de muco que protege a mucosa íntestinal contra abrasão mecânica e a aderência de micro-organismos (FONTAINE; MESLIN; ANDRIEUX, 1996; NONOSE

et al., 2009; DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Estas células são chamadas de caliciformes por causa do seu formato semelhante a um cálice, com um ápice largo e base estreita (Figura 3). Na base da célula está presente o núcleo, e logo acima deste, comprimidos nas margens laterais das células, o retículo endoplasmático rugoso (RER), o complexo de Golgi (CG), a mitocôndria e os lisossomos. No ápice destas células, há grande quantidade de grânulos de mucina (BROWNING; TRIER, 1969; MADARA, 2011). Estes grânulos quando liberados, formam uma camada de muco que protege o epitélio da adesão de bactérias, agentes nocivos, ação de enzimas digestivas e abrasão mecânica (FONTAINE; MESLIN; ANDRIEUX, 1996; NONOSE et al., 2009; MADARA, 2011; MELLO et al., 2012). Além das mucinas, a secreção é composta por moléculas bioativas, como o peptídeo trefoil, a molécula β semelhante à resistina (resistin-like molecule β) (RELM β) e a proteína ligadora Fc- γ (Fc- γ binding protein) (KIM; HO, 2010).

Figura 3. Eletrofotomicrografia de célula caliciforme, mostrando os grânulos de mucina, em branco, na parte apical da célula, e o núcleo e as organelas acomodados na parte basal. (B) Desenho representando a eletrofotomicrografia ao lado.

Fonte: Adaptado de MADARA, 2011.

Há 20 genes de mucinas identificados, MUC 1 a MUC 20, que podem expressar dois diferentes tipos de mucinas, as associadas à membrana e as secretoras. As mucinas associadas à membrana são expressas na membrana apical das células caliciformes e dos enterócitos, como por exemplo, MUC 1, MUC 3, MUC 4 e MUC 5. As mucinas secretoras, MUC 2, MUC 5AC, MUC 5B, MUC 6, são sintetizadas e secretadas por exocitose pelas células caliciformes (DEPLANCHE; GASKINS, 2001; KIM; HO, 2010). A liberação das mucinas secretoras ocorre através de duas vias, a secreção basal (ou exocitose simples) e a exocitose composta. Na primeira, ocorre exocitose constitutiva dos grânulos apicais e na segunda, dos grânulos centrais, marcando uma secreção aguda de mucinas, a qual é estimulada por secretagogos como fatores bioativos, hormônios, neuropeptídeos, bactérias, toxinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DEPLANCHE; GASKINS, 2001; KIM; HO, 2010; MADARA, 2011). A secreção de mucina está relacionada ao aumento da síntese de mucinas, no entanto, quando a secreção ocorre em altas concentrações, pode ocorrer a depleção das células caliciformes (KIM; HO, 2010).

As mucinas têm um esqueleto peptídico altamente glicosilado, o que as classifica como glicoproteínas (DEPLANCHE; GASKINS, 2001; MADARA, 2011). Podem ser divididas em dois tipos, neutras e ácidas, estas sendo divididas em dois subtipos, sialomucinas e sulfomucinas. Nas sialomucinas, os esqueletos de carbono estão ligados a ácido siálico, nas sulfomucinas a sulfato e nas neutras, não há ligações com estas substâncias (FONTAINE; MESLIN; ANDRIEUX, 1996; DEPLANCHE; GASKINS, 2001;). A presença de ácido siálico e sulfato deixam estas mucinas mais viscosas e ácidas do que as neutras, conferindo maior resistência a enzimas bacterianas (FONTAINE; MESLIN; ANDRIEUX, 1996).

O muco formado sob o epitélio gastrointestinal é composto por duas camadas, uma interna, aderida mais fortemente, e a externa, aderida mais frouxamente. Bactérias e protozoários são encontrados ligados às glicoproteínas principalmente da camada de muco frouxo, mostrando que a camada interna de muco é uma barreira protetora crítica (KIM; HO, 2010). Essas glicoproteínas servem como fonte de energia para os micro-organismos, e ao ligarem-se nelas, o muco envolve-os impedindo a expressão da sua capacidade patogênica, o que evita a colonização de micro-organismos patogênicos no epitélio intestinal (MADARA, 2011). Apesar das camadas protegerem o epitélio contra micro-organismos, toxinas e abrasão mecânica, ela é permeável aos nutrientes (KIM; HO, 2010).

2.5. Estresse e epitélio intestinal

O estresse físico e psicológico podem causar alterações no epitélio intestinal levando a um aumento na permeabilidade para e transcelular e, consequentemente, possibilitando a passagem de pequenas moléculas, como peptídeos de bactérias, e de macromoléculas com potencial antigênico (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001).

O aumento da permeabilidade intestinal paracelular resulta da modificação de proteínas das junções intercelulares, como as claudinas, ocludinas e zônulas ocludentes (MAZZON et al., 2002; ZEISSIG et al., 2007). Adicionalmente, outras modificações no trato gastrointestinal de animais sob estresse são descritas, como o aumento da secreção de mucinas pelas células caliciformes (CASTAGLIUOLO et al., 1996, 1998), da secreção colônica de íons e da permeabilidade para íons no cólon (SANTOS et al., 1999). Castagliuolo et al. (1998) relatam que 30 minutos de estresse por imobilização aumenta a liberação de mucinas na luz intestinal, além de causar depleção de células caliciformes no cólon.

Em um estudo para avaliar o efeito do estresse psicológico no epitélio intestinal, Santos et al. (2000) submeteram ratos a sessões repetidas de evasão da água por uma hora por dia, durante cinco dias. Estes animais apresentaram, no jejuno, maior condutância epitelial e fluxo de horse radish peroxidase (HRP), proteína modelo para estudar fluxo e rotas de passagem pelo epitélio intestinal. Além disso, os ratos sob estresse diminuíram a ingestão alimentar e perderam peso. No entanto, ratos deficientes em mastócitos, apesar de também perderem peso, mantiveram uma barreira intestinal semelhante a de ratos não estressados, sugerindo um importante papel destas células nas modificações da barreira intestinal durante o estresse (SANTOS et al., 2000). A relevância dos mastócitos como mediador do estresse sobre as modificações ocorridas no epitélio intestinal é relatada em estudos com estabilizadores de mastócitos. Castagliuolo et al. (1996), aplicando o estabilizador lodoxamida em ratos, inibiu o aumento de secreção de mucina no cólon. O fluxo de HRP, no cólon de ratos, também foi diminuído quando doxantrazole, outro estabilizador de mastócitos, foi aplicado em animais sob estresse por restrição. As vias e os mediadores químicos que ativam os mastócitos não são totalmente conhecidos, no entanto sabe-se que há uma interação destas células com células neurais, que resultam na regulação da permeabilidade intestinal (SANTOS et al., 1999).

A exposição do epitélio a espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas durante situações de estresse, também contribuem para o aumento da permeabilidade intestinal. A

presença de ROS resulta no aumento da peroxidação lipídica que, aliada a níveis reduzidos de glutathione, um antioxidante endógeno, prejudicam a integridade das células intestinais (ALPTEKIN et al., 1996). Estudos em carcinomas humanos demonstrou que MUC 1 diminui a apoptose e regula os níveis de oxidantes intracelular (YIN et al., 2003). A disfunção da barreira intestinal pode aumentar a exposição dos animais a antígenos, causando patologias (SANTOS et al., 1999; KIM; HO, 2010), perda de peso e, consequentemente, da eficiência produtiva (SANTOS et al., 2000).

Com a importância comercial cada vez maior da aquicultura, a criação em viveiros confinados tem se tornado uma prática crescente no setor da piscicultura. Entretanto, a produção destas espécies intensivamente pode ser estressante para os animais e, encontrar alternativas, como alimentos nutracêuticos, que possam minimizar os efeitos desta condição no trato gastrointestinal é de grande valia para a produção animal.

2.6. Colostro

O colostro é a primeira secreção láctea produzida na glândula mamária, sendo constituído de substâncias produzidas pelo próprio epitélio e elementos advindos do soro sanguíneo (BRAMBELL et al., 1958). Esta secreção contém elevadas concentrações de proteínas, imunoglobulinas, hormônios, fatores de crescimento, substâncias de defesa contra agentes patogênicos, vitaminas, minerais e citocinas pró e anti-inflamatórias (BOUDRY; THEWIS, 2009; PANDEY et al., 2011). Estas substâncias diminuem consideravelmente com o passar das horas após o parto e, em cerca de três dias, a secreção láctea passa ser chamada de leite (BRAMBELL et al., 1958; ODLE; ZIJLSTRA; DONOVAN, 1996; BOUDRY; THEWIS, 2009; PANDEY et al., 2011).

Os mais importantes componentes do colostro incluem fatores imunes, de crescimento e antimicrobianos. Imunoglobulinas como IgG, IgM, IgA, presentes no colostro bovino estão relacionadas com a imunidade do recém-nascido, mas podem desempenhar proteção local no intestino, ligando-se e aglutinando patógenos como vírus, bactérias e fungos (HURLEY; THEIL, 2011). Os fatores de crescimento, como insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e II) e fator de crescimento epidermal (EGF) têm efeitos estimulantes no crescimento e desenvolvimento do intestino (ODLE; ZIJLSTRA; DONOVAN, 1996), particularmente do músculo liso presente na camada muscular do trato gastrintestinal (KUEMMERLE, 2012).

Fatores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos também podem ser encontrados no colostro. Entre os enzimáticos pode-se citar a lactoperoxidase, lisozima, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Entre os não enzimáticos estão as vitaminas E, A e C, o selênio e a lactoferrina (PRZYBYLSKA; ALBERA; KANKOFER, 2007; BOUDRY; THEWIS, 2009; PANDEY et al., 2011).

A lactoperoxidase é uma enzima que tem capacidade bactericida contra bactérias patogênicas gram-negativas e, bacteriostática contra muitas gram-positivas (BOUDRY; THEWIS, 2009; KORHONEN, 2010). A lisozima é uma enzima que se liga à camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana, causando a lise das bactérias (PANDEY et al., 2011). Além disso, esta enzima interage com outros fatores do colostro, como a lactoperoxidase, ativando-a parcialmente (HULEA; MOGOS; MATEI, 1989). A lactoferrina é uma glicoproteína que tem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora. Sua atividade antimicrobiana deve-se a sua ligação com o ferro do meio, indisponibilizando-o para as bactérias durante seu crescimento. Esta proteína também tem ligação direta com a parede celular das bactérias gram-negativas, causando danos em suas membranas (KORHONEN, 2010).

Por causa de seus componentes com funções protetoras, o colostro tem sido utilizado com propósitos nutracêuticos para diversos animais, inclusive por humanos (SETH, DAS, 2011). Em roedores, de acordo com Godhia e Patel (2013), o colostro pode ser utilizado para diversas funções, como melhora do desempenho atlético, manutenção da integridade e permeabilidade intestinal, da imunidade local e sistêmica e, do controle de antígenos. Em roedores, Kwon et al. (2010) observaram efeito antioxidante e anticitocina do fornecimento oral de colostro bovino na isquemia/reperfusão intestinal. Choi et al. (2010) relatam que o colostro bovino protege contra lesão por isquemia/reperfusão cerebral, sugerindo que a ingestão deste alimento após a lesão pode prevenir lesões cerebrais secundárias e promover a recuperação e, Appukutty et al. (2012) afirmam que a suplementação com colostro bovino protege o tecido muscular esquelético de camundongos do estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Em peixes, Sakai et al. (2006) observaram que o fornecimento oral de lactoferrina bovina à truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) determina maior resistência contra a infecção bacteriana por meio da ativação dos fagócitos e, Kumari, Swain e Sahoo (2003) relatam que a inclusão da mesma na dieta do peixe-gato asiático (*Clarias batrachus*) é capaz de aumentar a imunidade não específica e a resistência a doenças, apoiando a possível utilização da lactoferrina como um imunoestimulante. Em Tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*), a inclusão de lisozima bovina na dieta melhorou a imunidade inespecífica e a resistência a doenças, além de diminuir a mortalidade dos peixes após desafio com *Aeromonas hydrophila* (EL-ASHRAM; EL-BOSHY, 2008). Desta forma, tais trabalhos revelam que as moléculas biologicamente ativas presentes no colostro bovino podem influenciar a higidez de outras espécies, incluindo peixes. Assim, os efeitos do colostro na saúde e bem-estar animal precisam ser mais explorados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais- CEUA, do campus Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, registrado como nº 2015- 13 (Apêndice A).

3.2. Local do experimento

A coleta de colostro bovino foi realizada na Fazenda Santo Antônio, localizada no Bairro Limoeiro, 13411-040, Piracicaba, São Paulo, com a cooperação do administrador da fazenda, Jerson Rodrigo Jacinto. A liofilização do mesmo foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Análise de Alimentos, pertencente ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, sob coordenação da Profª. Drª. Joclem Mastrodi Salgado. A análise bromatológica do colostro bovino liofilizado foi efetuada no Laboratório CBO, em Campinas, São Paulo.

O experimento a campo foi realizado no Setor de Piscicultura, do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino.

O preparo dos tecidos coletados, as análises histológicas e a técnica de ORAC (oxygen radical absorbance capacity) das dietas experimentais foram realizados no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal, do Departamento de Zootecnia, do campus Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, com a colaboração do prof. Dr. Raul Machado Neto.

As imagens de intestino foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA), do campus Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima.

3.3. Formulação e preparo das rações para cada tratamento

Após o parto de 20 vacas holandesas, entre os meses de janeiro a julho de 2015, foram coletados 50 litros de colostro, que posteriormente foram congelados a -20°C e liofilizados. O colostro bovino na forma de pó foi homogeneizado e armazenado a -20° C

até inclusão nas dietas. Uma amostra foi separada para a análise bromatológica (Figura 4), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Figura 4. Colostro bovino liofilizado sendo homogeneizado.

Fonte: LAFA.

Tabela 2. Análise bromatológica do colostro bovino liofilizado

Análises	Matéria Original	Matéria Seca
Matéria Seca (%)	96,18	-
Proteína Bruta (%)	68,40	71,12
Extrato Etéreo (%)	11,25	11,70
Energia Bruta (caloria/g)	5531,00	5750,68

Fonte: Autoria própria.

Quatro dietas semi-purificadas, isoproteicas (32% de proteína bruta) e isoenergéticas (4000 Kcal/kg) foram formuladas considerando 0, 10, 20 e 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado. Assim, foram estabelecidos quatro tratamentos, de acordo com esta porcentagem, 0%CBL, 10%CBL, 20%CBL e 30%CBL. A Tabela 3 apresenta a composição química de cada dieta experimental.

Após a mistura dos ingredientes, a ração foi peletizada e, em seguida, seca a 50°C por 24 horas em estufa com circulação de ar forçada (Figura 5). Posteriormente, as rações foram resfriadas à temperatura ambiente e armazenadas em câmara fria. As rações foram quebradas utilizando um moedor de grãos manual, de modo que ficassem com cerca de 0,8 cm.

Tabela 3. Composição química das dietas fornecidas aos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Ingredientes (%)	Dietas			
	0%CBL	10%CBL	20%CBL	30%CBL
Albumina	20,2	18,35	12	5,82
Gelatina	15	9,47	7,9	6
Colostro	-	10	20	30
Amido	46,58	45,65	43,5	42,5
Óleo de soja	8	5,3	3,7	1,4
Fosfato bicálcico	4	3,17	4,75	5,94
Celulose	6	6,9	6,9	7
Triptofano	-	0,04	0,13	0,22
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix vit/min ¹	1	1	1	1
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Informações Nutricionais				
Matéria seca (%)	82	85	87	90
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	3967	3974	4010	4019
Proteína bruta (%)	32	32	32	32
Fibra bruta (%)	5	5	5	5
Extrato etéreo (%)	8	6	6	5

⁽¹⁾ Premix (Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo) suplementação de 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; 4.00 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. 0%CBL - juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 10%CBL - juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 20%CBL - juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 30%CBL - juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5. (A) Ração sendo peletizada. (B) Rações colocadas na estufa com circulação forçada, a 50°C por 24 horas.

Fonte: LAFA.

Para avaliação da capacidade antioxidante, as dietas contendo 0, 10, 20 e 30% de CBL foram avaliadas quanto à capacidade de absorção de radicais oxigenados pela técnica ORAC (oxygen radical absorbance capacity), de acordo com Melo et al., (2011). Os valores da capacidade de absorção de radicais oxigenados são expressos como equivalente de trolox em μM por mg de sólidos totais (Tabela 4).

Tabela 4. Capacidade antioxidante das dietas experimentais

Dietas	ORAC
	(μmol equivalente Trolox/mg de sólidos totais)
0% CBL	140
10% CBL	2115
20% CBL	3633
30% CBL	5801

ORAC (oxygen radical absorbance capacity). 0%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 10%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 20%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado; 30%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

3.4. Experimento de adensamento

O experimento de adensamento ocorreu em um tanque com 10000 litros de água com circulação fechada e controle de temperatura. Como os dois lados do tanque tinham as mesmas condições ambientais de luz e oxigênio dissolvido, o delineamento usado foi o inteiramente casualizado. Foram utilizados quatro tratamentos, de acordo com a porcentagem de colostro bovino liofilizado presente nas rações (0, 10, 20 ou 30%), com quatro repetições, representadas por gaiolas. Segue abaixo, o croqui do experimento (Figura 6).

Figura 6. Croqui do experimento de estresse por adensamento (50 kg de peixe/m³). Os retângulos internos representam as gaiolas com seus respectivos tratamentos (dietas com 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado).

Fonte: Autoria própria.

As laterais e a parte superior das gaiolas eram confeccionadas de tela plástica azul e, o fundo era fechado por um plástico compacto na mesma cor. Foi colocado um cano em cada aresta vertical da gaiola para sustentar a mesma e evitar que esta se dobrasse, reduzindo o espaço dos peixes. O volume da gaiola era de 32 litros e, como a densidade escolhida para assegurar uma condição adversa foi de 50 kg/m³ (MEROLA; DE SOUZA, 1988), foi necessário que tivesse 1,6 kg de peixe por gaiola.

Para isso, os peixes, que estavam soltos em um tanque de concreto de 10000 litros e estavam sendo alimentados, duas vezes ao dia, com ração comercial contendo 36% de proteína bruta foram selecionados de acordo com o tamanho, escolhendo aqueles que tinham de 15 a 18 cm. Assim, juvenis de pacu foram selecionados de acordo com a hígidez e homogeneidade de porte e distribuídos ao acaso em 16 gaiolas de 32 litros (0,032m³, aproximadamente 13 peixes por gaiola), perfazendo 50 kg de peixe/m³.

As gaiolas foram dispostas em duas fileiras paralelas e entre elas foram instalados dois canos, um com passagem de água e outro, de oxigênio. As gaiolas foram amarradas em ripas de madeira para restringir a movimentação das mesmas (Figura 7).

Figura 7. Fotografia da área experimental, localizada no Setor de Piscicultura, do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo.

Fonte: Autoria própria.

Cada gaiola possuía um recipiente com sua respectiva ração (tratamento), o qual era pesado uma vez por semana para que ao final do experimento fosse analisado o desempenho zootécnico, através do cálculo do ganho de peso, taxa de crescimento, conversão alimentar e sobrevivência, conforme descrito na Tabela 5, em resultados.

Ganho de peso (%):

$$\mathbf{GP} = \frac{\mathbf{BF} - \mathbf{BI}}{\mathbf{BI}} \times 100$$

Taxa de crescimento (%):

$$\mathbf{TCE} = \frac{\ln \mathbf{BF} - \ln \mathbf{BI}}{\mathbf{d}} \times 100$$

Conversão alimentar (kg kg^{-1}):

$$\mathbf{CA} = \frac{\text{Ingestão de ração}}{\mathbf{GP}} \times 100$$

Sobrevivência (%):

$$S = \frac{NF}{NI} \times 100$$

Em que: GP= ganho de peso (%); BF= biomassa final (g); BI= biomassa inicial (g); TCE= taxa de crescimento (%); ln= logaritmo natural; d= dias de experimento; CA= conversão alimentar (kg kg⁻¹); NF= número de animais final e NI= número de animais inicial.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente, às 8h30 e às 16h30, durante 28 dias. Uma vez por semana, usava-se uma sonda eletrônica Horiba U52 para medir o oxigênio dissolvido, pH e temperatura, que em média foram $4,0 \pm 0,5$ mg/l; $7,9 \pm 0,2$ e $25,4 \pm 0,2$ °C, respectivamente. A amônia foi medida uma vez por semana utilizando o kit de teste de amônia tóxica, da LabconTest®, cujos resultados mostraram uma concentração $\leq 0,5$ mg/l. Tais dados, demonstram que todos os parâmetros estão dentro das condições favoráveis à vida dos peixes (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

No 29º dia experimental, os juvenis de pacu foram submetidos a jejum de 36 horas. No 30º dia, os mesmos foram anestesiados e eutanaziados com benzocaína (0,5 g/l).

3.5. Coleta e preparo dos tecidos para análises histológicas:

Para a coleta do intestino, foi retirado o excesso de tecido adiposo que cobria esse órgão e, em seguida, foram seccionados três segmentos intestinais: S1, S2 e reto (RT). Sendo S1 a parte cranial do intestino médio, S2 a parte intermediária e, o reto, a porção entre a válvula íleo-retal e o ânus (Figura 8).

Figura 8. (A) Imagem de juvenil de pacu mostrando o trato gastrointestinal ligado ao ânus. (B) Trato gastrointestinal retirado do peixe: (1) esôfago, (2) estômago com cecos pilóricos e (3) intestino. (C) Intestino com suas divisões em S1, S2, S3 e reto. Da válvula pilórica até a válvula íleo-retal (seta preta), é classificado como intestino médio, sendo a parte cranial denominada S1, a intermediária S2 e a caudal, S3. O reto é a porção compreendida entre a válvula íleo-retal até o ânus. Seta: válvula íleo-retal.

Fonte: Autoria própria.

Após a coleta dos segmentos S1, S2 e RT, os mesmos foram seccionados longitudinalmente e esticados em placas de parafina com alfinetes. Foram fixados por 4 horas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2. Na sequência, os segmentos foram armazenados em cassetes histológicos e fixados em paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M pH 7,2 *overnight*.

No dia seguinte, os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS 0,1M pH 7,2 com cada lavagem durando 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (30, 50 e 70%), por 10 minutos em cada concentração. As amostras foram armazenadas em álcool 70% a 4°C.

Parte das amostras armazenada em álcool 70% foi pré-infiltrada em resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.) para a contagem de células caliciformes neutras, ácidas (sulfo e sialomucinas), ácidas-neutras, estereologia e mensuração da espessura da camada muscular. A outra parte foi infiltrada em parafina para inferir a taxa de apoptose, através da marcação de caspase-3 por anticorpo, técnica conhecida como imunohistoquímica.

Para infiltrar as amostras em resina plástica, as amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas por 10 minutos em etanol 90% e duas vezes em etanol 100% por 10 minutos, pré-infiltradas em resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.) e diluídas em etanol puro na proporção 1:3 e 1:1, por três e quatro horas, respectivamente. Em seguida, os tecidos foram armazenados em resina glicol metacrilato pura a 2°C e, em um período de 20 dias, a resina pura foi trocada duas vezes.

As amostras pré-infiltradas em resina JB-4 foram incluídas em resina para polimerização (JB-4, Polyscience Inc.) em estado de anaerobiose a 3°C. Após o endurecimento, os blocos de resina foram fixados em suportes de madeira e cortados em micrótomo Leica RM2125RT, obtendo-se cortes de cinco µm de espessura. Cada amostra continha duas lâminas com dez cortes não sequenciais, com espaçamento de 50 µm entre cada secção intestinal. Uma das lâminas foi usada para diferenciar células caliciformes contendo mucinas neutras, ácidas e ácidas-neutras, análise estereológica e morfometria da camada muscular e, a outra para diferenciar os dois subtipos de mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas).

Para infiltração em parafina, as amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas à temperatura ambiente, duas vezes em álcool etílico 95%, três vezes em álcool etílico 100% e duas vezes em xilol, por 45 minutos cada. Em seguida, foram infiltradas três vezes em parafina, a 55°C, por 30 minutos, 45 minutos e uma hora, respectivamente. Em seguida, os cortes foram colocados em formas histológicas e nestas, adicionada parafina.

Os moldes foram armazenados a 2°C *overnight* e os blocos foram cortados em micrótomo Leica RM2125RT, obtendo-se cortes de cinco µm de espessura. Cada amostra

continha dez cortes sequenciais. A lâmina foi usada para marcação de caspase-3 por imunohistoquímica.

3.5.1. Quantificação do número de células caliciformes contendo mucinas ácidas, neutras e ácidas-neutras

Para a contagem de células caliciformes contendo mucinas ácidas, neutras e ácidas-neutras, as lâminas foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS)/Alcian Blue (AB) 1% pH 2,5, método que marca as mucinas neutras de rosa e as ácidas, de azul. Contudo, uma mesma célula caliciforme pode conter grânulos com mucina ácida e neutra, e desta forma, corar-se-a de variações de roxo (BRANCROFT, J.D.; GAMBLE, 2008). Estas células também foram contabilizadas e estão descritas como ácidas-neutras no presente trabalho.

Primeiramente, foram preparadas as soluções de AB 1% pH 2,5 (1 g de Alcian blue em 100 ml de ácido acético glacial 3%) e de ácido periódico (1 g de ácido periódico em 100 ml de água destilada). Em seguida, as lâminas foram coradas por AB por 30 minutos, lavadas em água destilada por cinco minutos, oxidadas em ácido periódico por dez minutos, lavadas em água destilada por cinco minutos, colocadas no Reagente de Schiff por dez minutos e, por fim, lavadas em água destilada por dez minutos. As lâminas secaram à temperatura ambiente e foram montadas com DPX[®].

Uma imagem de cada corte (dez imagens) foi fotografada através do microscópio Imager.D2-Zeiss, utilizando um aumento de 100X. As células caliciformes com grânulos marcados em rosa foram contadas como células produtoras de mucinas neutras, os marcados em azuis, como produtoras de mucinas ácidas e, os marcados em roxo, como ácidas-neutras (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Fotomicrografia do segmento S1 de juvenil de pacu corado com ácido periódico de Schiff/Alcian Blue pH 2,5, mostrando as pregas intestinais com os grânulos de mucinas das células caliciformes corados. Em azul, são os grânulos contendo mucinas ácidas, em rosa, as neutras e, em roxo, a mistura dos dois tipos de mucinas. Barra= 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Fotomicrografia do ápice de uma prega intestinal corada com ácido periódico de Schiff/Alcian Blue pH 2,5, mostrando os grânulos das células caliciformes corados. Grânulos com mucinas ácidas estão corados em azul (1), com mucinas neutras, em rosa (2), e aqueles que contêm os dois tipos, em roxo (3). Barra= 20 µm.

Fonte: Autoria própria.

3.5.2. Quantificação do número de células caliciformes contendo sulfo e sialomucinas

Para a diferenciação das células caliciformes produtoras dos dois subtipos de mucinas ácidas, as lâminas foram coradas com Alcian Blue (AB) pH 0,4, que marca as sulfomucinas em azul e com AB pH 2,5 que marca todas as mucinas ácidas, sulfo e sialomucinas, em azul (Figura 11).

Figura 11. Fotomicrografia do segmento S1 de juvenil de pacu corado com Alcian blue pH 0,4 e 2,5, mostrando as pregas intestinais com as células caliciformes ácidas (sialo e sulfomucinas) com seus grânulos de mucinas corados em azul. Barra= 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Para isso, as lâminas foram colocadas em ácido hidrocloreídrico-fosfato por três minutos, em AB pH 0,4 por 30 minutos e lavadas em água destilada por dez minutos. Dez cortes de cada amostra foram fotografados através do microscópio Axioskop2-Zeiss, utilizando um aumento de 100X. As células caliciformes com grânulos marcados em azul foram contadas como células produtoras de sulfomucinas.

Em seguida, as mesmas lâminas foram coradas com AB pH 2,5 por 30 minutos e lavadas em água destilada por cinco minutos. Dez cortes de cada amostra foram fotografados através do Axioskop2-Zeiss, utilizando um aumento de 100X. As células caliciformes com grânulos marcados em azul foram contadas como células produtoras de mucinas ácidas.

Para calcular a quantidade de células caliciformes contendo sialomucinas, foi subtraído o número de células caliciformes contendo sulfomucinas (marcadas por AB pH 0,4) do total de células caliciformes contendo mucinas ácidas (marcadas por AB pH 2,5) (Figura 11).

3.5.3. Análise estereológica

A estereologia é uma técnica utilizada para calcular a densidade de superfície e o volume de um tecido de interesse. Para calcular a densidade de superfície da mucosa intestinal (S_v) e o seu volume (V_v), foi utilizado o Grid desenvolvido por Baddeley, Gundersen e Cruz-Orive (1986) (Figura 12). Como o intestino é uma superfície anisotrópica, é necessário que a imagem de intestino fotografada seja colocada em um plano horizontal com o grid utilizado, neste caso, o plano horizontal considerado foi a camada muscular. Neste grid, há distribuídos 70 pontos e 35 arcos e, a técnica consiste em sobrepor o grid nas imagens a serem analisadas e contar o número de pontos e arcos que se situam sobre a mucosa intestinal (Figura 13). As quantidades de pontos e arcos foram substituídas na fórmula (1), obtendo-se a densidade da superfície da mucosa, e a quantidade de pontos, na fórmula (2), para calcular o volume da mucosa. O comprimento do arco foi medido no grid impresso, sendo igual a 17 mm.

Neste experimento, foram analisadas dez imagens de cada amostra, e o número de pontos e arcos considerados de cada amostra foi a média das dez imagens.

Figura 12. Grid contendo pontos e arcos ciclóides para cálculo da densidade de superfície da mucosa (S_v) e volume da mucosa (V_v), segundo Baddeley et.al, 1986.

Figura 13. Grid porposto por Baddeley et.al (1986) sobreposto à fotomicrografia do intestino de juvenil de pacu corado com Ácido periódico de Schiff/Alcian blue pH2,5. Para o cálculo da densidade de superfície da mucosa (S_v) e volume da mucosa (V_v) são contabilizados os pontos e arcos ciclóides que sobrepõem a mucosa intestinal. Neste exemplo, temos 44 pontos e 25 arcos ciclóides sobrepondo a muscosa intestinal. Barra na fotomicrografia do intestino= 100 μ m.

Fonte da imagem: Autoria própria. Fonte do grid: Baddeley et.al, 1986.

$$S_v = \frac{2 \times \sum I (mucosa)}{I(p) \times \sum P (mucosa)} \quad (1)$$

Em que,

S_v = densidade de superfície da mucosa absorvida

$\sum I (mucosa)$ = número de arcos ciclóides do grid sobre a camada específica em análise (mucosa)

$I(p)$ = comprimento do arco ciclóide em mm (17 mm)

$\sum P (mucosa)$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise (mucosa)

$$V_v = \frac{\sum P (mucosa)}{\sum P (volume referencial)} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

Vv = Volume parcial da mucosa

$\sum P (mucosa)$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise (mucosa)

$\sum P (volume\ referencial)$ = número total de pontos da grade (70)

3.5.4. Análise morfométrica da camada muscular

A camada muscular foi medida utilizando o Programa ImageJ[®]. Foram usadas duas medidas de cada imagem e dez imagens de cada amostra para compor uma média. Para cada gaiola, foram utilizadas duas amostras, e destas a média foi usada para a comparação entre os tratamentos (Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografia do segmento S2 de juvenil de pacu, mostrando o intestino corado com Ácido periódico de Schiff/Alcian blue pH 2,5. As camadas musculares estão coradas em rosa, logo abaixo da mucosa. As setas verticais exemplificam as duas medidas realizadas neste tecido, utilizando o Software ImageJ[®]. Nas pregas intestinais, estão marcados os grânulos das células caliciformes. Em azul, são os grânulos contendo mucinas ácidas, em rosa, as neutras e em roxo, a mistura dos dois tipos de mucinas. Barra= 100 µm.

Fonte: Autoria própria.

3.5.5. Densidade do número de células caliciformes

Analisando as fotomicrografias dos segmentos intestinais de pacu, foi possível observar que certas amostras, à primeira vista, possuíam maior número de células caliciformes que outras amostras. No entanto, ao fazer a contagem, a quantidade destas células não diferiu entre essas amostras aparentemente diferentes. Nesta mesma linha, observou-se que alguns segmentos possuíam maior número de pregas intestinais que outros, sendo que geralmente S1 e S2 tinham mais pregas que o RT (Figura 15).

Desta forma, elucidou-se calcular também a densidade destas células, através da razão do número de células caliciformes pela densidade de superfície da mucosa (S_v) e da razão do número de células caliciformes pelo volume da mucosa (V_v). Para isso, as densidades de células caliciformes, D_v e D_s , respectivamente, foram calculadas conforme fórmulas demonstradas abaixo.

Demonstração de D_s :

$$D_s = \frac{\text{número de células}}{S_v}$$

Como,

$$S_v = \frac{2 \times \sum I (\text{mucosa})}{I(p) \times \sum P (\text{mucosa})}$$

Concluimos que,

$$D_s = \frac{\text{número de células} \times I(p) \times \sum P (\text{mucosa})}{2 \times \sum I (\text{mucosa})}$$

Na qual:

D_s = densidade de células caliciformes considerando a densidade de superfície da mucosa

S_v = densidade de superfície da mucosa absorvida

$\sum I (\text{mucosa})$ = número de arcos ciclóides do grid sobre a camada específica em análise (mucosa)

$I(p)$ = comprimento do arco ciclóide em mm (17 mm)

ΣP (*mucosa*)= número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise
(*mucosa*)

Demonstração de Dv :

$$Dv = \frac{\text{número de células}}{Vv}$$

Como,

$$Vv = \frac{\Sigma P (\text{mucosa})}{\Sigma P (\text{volume referencial})} \times 100$$

Concluimos que,

$$Dv = \frac{\text{número de células} \times \Sigma P (\text{volume referencial})}{\Sigma P (\text{mucosa}) \times 100}$$

Na qual:

Dv = densidade de células caliciformes considerando a volume parcial da mucosa

Vv = Volume parcial da mucosa

ΣP (*mucosa*)= número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise
(*mucosa*)

ΣP (*volume referencial*)= número total de pontos da grade (=70)

Figura 15. Fotomicrografias de intestino de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), mostrando as diferenças nas densidades aparente de células caliciformes nos segmentos intestinais S1 (A e D), S2 (B e E) e RT (C e F), assim como a diferença entre a quantidade de pregas intestinais em cada segmento. As células caliciformes estão marcadas. Em azul, são grânulos de mucina ácida, em rosa, grânulos com mucina neutra e, em roxo, grânulos com mucina ácida-neutra. Coloração: ácido periódico de Schiff/Alcian blue pH 2,5. Barra= 100µm

Fonte: Autoria própria.

3.5.6. Marcação de caspase-3 por imunohistoquímica

A caspase-3, enzima envolvida no processo apoptótico, foi marcada por imunohistoquímica para a avaliação de células em apoptose.

Para isso, os cortes em parafina foram desparafinados, lavando-os duas vezes, por quatro minutos em xilol, duas vezes por dois minutos em etanol 100%, uma vez em etanol 95%, 80%, 70% e 50% por dois minutos em cada concentração e lavados três vezes em água destilada (H₂Od), por cinco minutos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 em banho-maria, a 100°C por 45 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos, as lâminas foram lavadas em H₂Od três vezes de cinco minutos, colocadas por 30 minutos em solução de 3% de peróxido em metanol e lavadas três vezes em água destilada por cinco minutos.

As lâminas foram bloqueadas com 5% de soro normal de cabra em PBS 0,01M pH 7,4 por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, 40 µl de anticorpo primário Anti-Caspase-3 (Anticorpo policlonal de coelho para Caspase-3, ab13847, abcam, 1:100 em bloqueador) foi dispensado nos cortes e incubados overnight a 2°C em câmara úmida.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos em PBS 0,01M pH 7,4, sendo adicionado, então, o anticorpo secundário contra anticorpo de coelho (1:200, 4001, Vectastain Kit) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes de cinco minutos em PBS 0,01 M pH 7,4, colocadas no reagente ABC (avidina/biotina) por 30 minutos, lavadas três vezes de cinco minutos em PBS 0,01 M pH 7,4 e colocadas na solução de substrato da peroxidase diaminobenzidina (DAB, Vectastain kit) por exatamente dois minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas rapidamente em H₂Od, coradas com hematoxilina por um minuto, lavadas rapidamente em H₂Od e por 30 segundos em PBS 0,01 M pH 7,4. Por fim, os cortes foram colocados em H₂Od (30 s); etanol 50% (30 s); etanol 70% (30 s); etanol 80% (30 s); etanol 95% (30 s); duas vezes em etanol 100% (2 min); três vezes em xilol (3 min). As lâminas foram montadas com DPX[®] e os cortes foram fotografados, duas imagens para cada amostra de tecido, utilizando o microscópio Imager.D2-Zeiss, em aumento de 100 e 200X. As imagens foram classificadas de acordo com a intensidade da marcação em marrom, sendo classificadas em três intensidades: baixa, média e alta (Figura 16).

Figura 16. Fotomicrografia do segmento S2 de juvenil de pacu, marcado por imunohistoquímica com Anti-Caspase-3, que marca em marrom a caspase-3, enzima relacionada à apoptose. (A) Amostra classificada como baixa intensidade de marcação. (B) Amostra classificada como média intensidade de marcação. (C) Amostra classificada como alta intensidade de marcação. Barra= 50 µm.

Fonte: Autoria própria.

3.6. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (0, 10, 20 e 30% CBL) e quatro repetições (gaiolas). Com exceção da análise de imunohistoquímica, em todas as análises foram utilizadas dez imagens diferentes de cada amostra de intestino (S1, S2 e RT) e a média entre elas foi considerada o dado de um segmento. Por gaiola, foram coletados dois peixes e o dado final de cada um foi utilizado para compor a média da gaiola.

Para a análise de imunohistoquímica, foi considerado um peixe por gaiola e avaliadas, qualitativamente, duas fotos de cada segmento em três intensidades de marcação: baixa, média e alta.

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento PROC GLM do programa SAS[®] 9.4, considerando quatro tratamentos. O peso e o comprimento iniciais não tiveram diferença significativa ($P=0,3112$ e $P= 0,5245$), por isso foram desconsiderados como co-variáveis. A análise de variância foi feita pelo ANOVA e a comparação de médias pelo teste de Duncan, considerando a probabilidade de 5%. Quando necessário, foram realizadas transformações para normalidade, utilizando o BOX-COX.

4. RESULTADOS

O desempenho zootécnico dos juvenis de pacu foi semelhante nos quatro tratamentos, já que não foram observadas diferenças para os parâmetros de desempenho calculados ($P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Indicadores de desempenho de juvenis de pacus, *Piaractus mesopotamicus*, (média±erro padrão).

Desempenho	Dieta				Probabilidade
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Biomassa inicial (g)	1604 ± 14	1624 ± 10	1604 ± 7	1604 ± 19	0,66
Biomassa final (g)	1773 ± 26	1783 ± 29	1805 ± 21	1785 ± 28	0,85
Ganho de peso (g)	169 ± 23	159 ± 25	201 ± 24	181 ± 13	0,56
Ganho de peso relativo (%)	10 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	0,55
Consumo total (g)	532 ± 23	546 ± 30	538 ± 33	554 ± 27	0,95
Conversão alimentar	3,27 ± 0,35	3,67 ± 0,48	2,75 ± 0,21	3,10 ± 0,09	0,28
Taxa de crescimento específico (%)	0,37 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,54
Sobrevivência (%)	100	100	100	100	-

**0%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado;
10%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de colostro bovino liofilizado;
20%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado;
30%CBL-juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado.**
Fonte: Autoria própria.

O número de células caliciformes contendo mucinas ácidas, neutras e ácidas-neutras não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$), Tabela 6. Entre os subtipos de mucinas ácidas, o número de células caliciformes produtoras de sialomucinas também não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$). No entanto, no segmento RT, o número de células caliciformes produtoras de sulfomucinas foi maior em 0 e 10%CBL ($208,65 \pm 29,43$ e $203,31 \pm 18,37$, respectivamente) em relação à 20 e 30%CBL ($123,63 \pm 16,67$ e $126,14 \pm 13,45$, respectivamente), sendo $P= 0,0148$. Considerando a probabilidade de erro de 5,59%, foi possível observar que no reto houve maior número de células caliciformes com mucinas ácidas em 0 e 10%CBL ($235,98 \pm 46,89$ e $236,81 \pm 19,69$, respectivamente) do que em 20%CBL ($135,22 \pm 18,03$).

Tabela 6. Média do número de células caliciformes contendo mucinas ácidas, neutras, ácidas-neutras e os subtipos de mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas) presente em 10 imagens de intestino de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adensados a 50 kg/m³ e alimentados com dietas sem ou com inclusão de colostro bovino liofilizado em diferentes concentrações (média ± erro padrão).

Número de células caliciformes							
Tipos de mucinas	Segmentos	Dietas				Média geral	Probabilidade
		0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL		
Ácida	S1	207,54 ± 7,08	220,14 ± 17,32	177,01 ± 7,93	196,34 ± 20,94	200,26 ± 7,70	0,2473
	S2	178,88 ± 28,28	154,57 ± 18,29	153,25 ± 22,90	170,21 ± 36,48	164,23 ± 12,54	0,8945
	RT	235,98 ± 46,89 a	236,81 ± 19,69 a	135,22 ± 18,03 b	153,17 ± 23,33 ab	190,30 ± 17,81	0,0559
Neutra	S1	44,14 ± 2,10	56,39 ± 15,17	33,45 ± 6,29	55,03 ± 10,65	47,25 ± 5,01	0,3568
	S2	45,96 ± 4,68	52,03 ± 13,26	34,83 ± 5,11	72,78 ± 21,46	51,40 ± 6,85	0,2685
	RT	51,06 ± 6,13	59,68 ± 9,14	39,95 ± 10,06	51,35 ± 9,07	50,51 ± 4,30	0,4879
Ácida-Neutra	S1	18,21 ± 4,09	15,18 ± 4,38	12,68 ± 2,02	18,41 ± 4,90	16,12 ± 1,89	0,7123
	S2	14,99 ± 4,27	11,78 ± 2,24	11,86 ± 1,74	15,28 ± 2,52	13,47 ± 1,35	0,7212
	RT	11,50 ± 2,44	11,79 ± 0,95	11,52 ± 2,70	10,91 ± 0,97	11,43 ± 0,87	0,9904
Sialomucina	S1	11,96 ± 5,26	20,51 ± 6,72	12,40 ± 4,39	10,76 ± 6,68	13,91 ± 2,80	0,6391
	S2	14,53 ± 5,59	9,09 ± 1,97	5,49 ± 2,28	10,29 ± 6,58	9,85 ± 2,21	0,5902
	RT	18,49 ± 7,15	18,68 ± 8,93	13,43 ± 5,25	13,14 ± 6,00	15,93 ± 3,19	0,8992
Sulfomucina	S1	173,15 ± 9,43	171,83 ± 18,71	145,51 ± 2,01	158,88 ± 4,18	162,34 ± 5,60	0,2764
	S2	137,16 ± 27,50	124,76 ± 26,59	138,71 ± 18,07	135,47 ± 33,41	134,03 ± 12,14	0,9009
	RT	208,65 ± 29,43 a	203,31 ± 18,37 a	123,63 ± 16,67 b	126,14 ± 13,45 b	165,43 ± 13,89	0,0148 *
Número Total	S1	251,68 ± 9,09	276,54 ± 26,22	210,46 ± 10,66	251,38 ± 28,31	247,51 ± 11,03	0,2047
	S2	224,84 ± 30,66	206,60 ± 29,12	188,07 ± 23,30	242,99 ± 56,14	215,62 ± 17,38	0,7381
	RT	287,04 ± 52,65	296,49 ± 25,00	175,04 ± 26,35	204,52 ± 27,39	240,77 ± 20,58	0,0730

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os tratamentos pelo teste de Duncan ($P < 0,05$); * Probabilidade significativa pela análise de variância ($P < 0,05$).

S1- segmento cranial do intestino médio do pacu; **S2-** segmento medial do intestino médio do pacu; **RT-** reto do pacu. **0% CBL-** grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; **10% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; **20% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; **30% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

A densidade de superfície da mucosa intestinal (S_v), o volume da mucosa intestinal (V_v) e a espessura da camada muscular não diferiram entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$), Tabela 7.

A densidade de células caliciformes, calculada através da razão do número de células caliciformes pela densidade de superfície de mucosa, D_s , contendo mucinas ácidas, neutras e ácidas-neutras não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$), Tabela 8. Entre os subtipos de mucinas, a densidade de células caliciformes produtoras de sialomucinas também não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$), no entanto, no reto (RT), a densidade de células caliciformes produtoras de sulfomucinas foi maior nos animais que receberam as dietas CBL 0 e 10% ($2672,32 \pm 456,22$ e $2669,18 \pm 258,05$, respectivamente) em relação aos juvenis que receberam as dietas CBL 20 e 30% ($1588,51 \pm 212,76$ e $1467,16 \pm 206,06$ respectivamente. $P=0,0198$) (Tabela 8).

A densidade de células caliciformes, calculada através da razão do número de células caliciformes pelo volume da mucosa, D_v , contendo mucinas neutras e ácidas-neutras não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos segmentos intestinais ($P>0,05$), Tabela 8. No entanto, a densidade de células caliciformes contendo mucinas ácidas, no RT, foi maior em 0 e 30%CBL ($9,24 \pm 0,63$ e $8,32 \pm 0,23$, respectivamente) em relação a 20%CBL ($5,73 \pm 0,30$, $P=0,0225$). A densidade total de células caliciformes no RT também foi maior em 0 e 30%CBL ($11,34 \pm 0,69$ e $11,26 \pm 0,32$, respectivamente) em relação a 20%CBL ($7,40 \pm 0,51$, $P=0,0155$). Considerando a probabilidade de erro de 5,54%, foi possível observar que no S1 houve maior densidade total de células caliciformes em 10 e 30%CBL ($4,60 \pm 0,29$ e $4,66 \pm 0,32$, respectivamente) do que em 20%CBL ($3,65 \pm 0,16$) (Tabela 9).

Tabela 7. Média da densidade de superfície da mucosa intestinal (S_v), volume da mucosa intestinal (V_v) e espessura da camada muscular, presente em 10 imagens de intestino de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adensados a 50 kg/m³ e alimentados com dietas sem ou com inclusão de colostro bovino liofilizado em diferentes concentrações (média $\pm$ erro padrão).

Estereologia e morfometria							
Tipos de mucinas	Segmentos	Dietas				Média geral	Probabilidade
		0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL		
Densidade de superfície da mucosa (mm ² /mm ³)	S1	0,0714 $\pm$ 0,0008	0,0703 $\pm$ 0,0015	0,0713 $\pm$ 0,0007	0,0726 $\pm$ 0,0015	0,0714 $\pm$ 0,0006	0,6256
	S2	0,0708 $\pm$ 0,0004	0,0729 $\pm$ 0,0026	0,0708 $\pm$ 0,0019	0,0747 $\pm$ 0,0014	0,0723 $\pm$ 0,0009	0,3710
	RT	0,0794 $\pm$ 0,0035	0,0764 $\pm$ 0,0018	0,0780 $\pm$ 0,0021	0,0875 $\pm$ 0,0037	0,0804 $\pm$ 0,0017	0,0759
Volume da mucosa (%)	S1	63,85 $\pm$ 4,27	60,28 $\pm$ 4,78	58,04 $\pm$ 3,94	53,52 $\pm$ 3,57	58,92 $\pm$ 2,10	0,3953
	S2	62,89 $\pm$ 6,02	56,82 $\pm$ 8,81	62,37 $\pm$ 5,82	56,12 $\pm$ 2,83	59,55 $\pm$ 2,90	0,8053
	RT	25,62 $\pm$ 4,85	33,68 $\pm$ 6,93	23,74 $\pm$ 3,22	18,26 $\pm$ 2,52	25,32 $\pm$ 2,54	0,1922
Espessura da camada muscular (μ m)	S1	122,31 $\pm$ 10,48	113,41 $\pm$ 3,78	142,46 $\pm$ 9,76	120,77 $\pm$ 8,61	124,74 $\pm$ 4,73	0,1526
	S2	109,70 $\pm$ 8,64	103,39 $\pm$ 14,57	116,13 $\pm$ 12,57	113,73 $\pm$ 5,63	110,74 $\pm$ 5,04	0,8524
	RT	124,51 $\pm$ 6,75	139,48 $\pm$ 18,70	106,14 $\pm$ 18,11	103,51 $\pm$ 10,68	118,41 $\pm$ 7,49	0,3021

S1- segmento cranial do intestino médio do pacu; **S2-** segmento medial do intestino médio do pacu; **RT-** reto do pacu. **0% CBL-** grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; **10% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; **20% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; **30% CBL-** grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8. Média da densidade de células caliciformes (*Ds*) contendo mucinas ácidas, neutras, ácidas-neutras e os subtipos de mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas) presente em 10 imagens de intestino de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adensados a 50 kg/m³ e alimentados com dietas sem ou com inclusão de colostro bovino liofilizado em diferentes concentrações (média ± erro padrão).

Densidade de células caliciformes (<i>Ds</i>)							
Tipos de mucinas	Segmentos	Dietas				Média geral	Probabilidade
		0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL		
Ácida	S1	2912,06 ± 124,66	3148,69 ± 308,01	2481,94 ± 110,06	2723,34 ± 348,03	2816,51 ± 127,22	0,3153
	S2	2527,59 ± 399,95	2137,08 ± 272,64	2175,61 ± 351,64	2278,71 ± 483,18	2279,74 ± 176,39	0,8883
	RT	3060,75 ± 711,29	3107,19 ± 270,29	1744,30 ± 246,24	1789,97 ± 319,40	2425,55 ± 256,94	0,0662
Neutra	S1	619,70 ± 35,65	808,38 ± 229,56	470,81 ± 91,97	758,88 ± 144,80	664,44 ± 72,95	0,3850
	S2	648,38 ± 63,72	708,28 ± 168,74	496,37 ± 79,46	973,40 ± 283,00	706,61 ± 89,03	0,3101
	RT	655,45 ± 102,10	784,19 ± 123,12	510,63 ± 124,58	595,59 ± 122,26	636,47 ± 58,86	0,4499
Ácida-Neutra	S1	255,53 ± 56,92	218,36 ± 66,67	178,41 ± 29,49	251,31 ± 64,22	225,90 ± 26,42	0,7533
	S2	211,78 ± 60,16	160,22 ± 28,07	169,19 ± 27,89	205,43 ± 34,93	186,65 ± 18,80	0,7462
	RT	144,34 ± 31,54	154,84 ± 13,83	146,87 ± 33,19	125,88 ± 14,55	142,98 ± 11,51	0,8668
Sialomucina	S1	169,31 ± 75,30	292,09 ± 96,58	174,41 ± 61,42	153,78 ± 97,74	197,39 ± 40,24	0,6431
	S2	205,78 ± 79,27	126,19 ± 28,66	79,34 ± 32,65	135,66 ± 86,16	136,74 ± 30,26	0,5705
	RT	245,54 ± 97,74	241,04 ± 114,47	175,76 ± 69,30	154,69 ± 75,47	204,26 ± 41,99	0,8567
Sulfomucina	S1	2430,52 ± 151,96	2457,96 ± 306,01	2040,72 ± 38,88	2187,76 ± 34,65	2279,24 ± 89,30	0,3075
	S2	1934,87 ± 382,97	1704,86 ± 339,07	1960,41 ± 258,24	1811,58 ± 440,51	1852,93 ± 163,76	0,8314
	RT	2672,32 ± 456,22 a	2669,18 ± 258,05 a	1588,51 ± 212,76 b	1467,16 ± 206,06 b	2099,29 ± 200,04	0,0198 *
Densidade Total	S1	3531,74 ± 159,53	3957,05 ± 449,25	2952,74 ± 159,95	3482,20 ± 445,13	3480,93 ± 176,13	0,2639
	S2	3175,97 ± 432,10	2845,35 ± 395,08	2671,94 ± 369,99	3252,13 ± 742,52	2986,35 ± 235,17	0,8308
	RT	3716,22 ± 809,36	3891,38 ± 345,29	2254,95 ± 343,30	2385,56 ± 393,04	3062,03 ± 299,02	0,0830

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os tratamentos pelo teste de Duncan ($P < 0,05$); * Probabilidade significativa pela análise de variância ($P < 0,05$). S1- segmento cranial do intestino médio do pacu; S2-segmento medial do intestino médio do pacu; RT- reto do pacu. 0% CBL- grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; 10% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL-grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9. Média da densidade de células caliciformes (*Dv*) contendo mucinas ácidas, neutras, ácidas-neutras e os subtipos de mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas) presente em 10 imagens de intestino de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adensados a 50 kg/m³ e alimentados com dietas sem ou com inclusão de colostro bovino liofilizado em diferentes concentrações (média $\pm$ erro padrão).

Densidade de células caliciformes (<i>Dv</i>)							
Tipos de mucinas	Segmentos	Dietas				Média geral	Probabilidade
		0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL		
Ácida	S1	3,29 $\pm$ 0,23	3,67 $\pm$ 0,20	3,07 $\pm$ 0,16	3,64 $\pm$ 0,17	3,42 $\pm$ 0,11	0,1349
	S2	2,83 $\pm$ 0,31	2,99 $\pm$ 0,76	2,47 $\pm$ 0,29	3,01 $\pm$ 0,56	2,82 $\pm$ 0,24	0,8240
	RT	9,24 $\pm$ 0,63 a	7,71 $\pm$ 1,17 ab	5,73 $\pm$ 0,30 b	8,32 $\pm$ 0,23 a	7,75 $\pm$ 0,45	0,0225 *
Neutra	S1	0,70 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,21	0,57 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,19	0,81 $\pm$ 0,08	0,1929
	S2	0,75 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,47	0,55 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,37	0,92 $\pm$ 0,15	0,3373
	RT	2,10 $\pm$ 0,19	1,95 $\pm$ 0,40	1,66 $\pm$ 0,30	2,95 $\pm$ 0,53	2,16 $\pm$ 0,21	0,1486
Ácida-Neutra	S1	0,29 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,03	0,5252
	S2	0,23 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02	0,6960
	RT	0,52 $\pm$ 0,16	0,38 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,09	0,64 $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,05	0,4710
Sialomucina	S1	0,19 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,11	0,20 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,11	0,23 $\pm$ 0,05	0,5971
	S2	0,22 $\pm$ 0,08	0,16 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,04	0,6694
	RT	0,62 $\pm$ 0,22	0,64 $\pm$ 0,30	0,51 $\pm$ 0,21	0,71 $\pm$ 0,26	0,62 $\pm$ 0,11	0,9515
Sulfomucina	S1	2,75 $\pm$ 0,24	2,88 $\pm$ 0,30	2,54 $\pm$ 0,19	3,02 $\pm$ 0,27	2,80 $\pm$ 0,12	0,6043
	S2	2,19 $\pm$ 0,36	2,58 $\pm$ 0,99	2,27 $\pm$ 0,33	2,39 $\pm$ 0,53	2,36 $\pm$ 0,28	0,9757
	RT	8,82 $\pm$ 1,78	6,57 $\pm$ 0,98	5,32 $\pm$ 0,50	7,07 $\pm$ 0,46	6,94 $\pm$ 0,58	0,1935
Densidade Total	S1	3,99 $\pm$ 0,28 ab	4,60 $\pm$ 0,29 a	3,65 $\pm$ 0,16 b	4,66 $\pm$ 0,32 a	4,23 $\pm$ 0,16	0,0540
	S2	3,58 $\pm$ 0,33	4,09 $\pm$ 1,22	3,03 $\pm$ 0,25	4,30 $\pm$ 0,89	3,75 $\pm$ 0,37	0,5273
	RT	11,34 $\pm$ 0,69 a	9,66 $\pm$ 1,46 ab	7,40 $\pm$ 0,51 b	11,26 $\pm$ 0,32 a	9,91 $\pm$ 0,57	0,0155 *

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os tratamentos pelo teste de Duncan ($P < 0,05$); * Probabilidade significativa pela análise de variância ($P < 0,05$). S1- segmento cranial do intestino médio do pacu; S2- segmento medial do intestino médio do pacu; RT- reto do pacu. 0% CBL- grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; 10% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Foram calculadas as porcentagens do número de células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras em cada segmento intestinal (Figura 17-A, C, E e G). O mesmo foi feito para o número de células caliciformes contendo sialo e sulfomucinas em relação ao número total de células caliciformes contendo mucinas ácidas (Figura 17-B, D, F e H). Os dois tipos de análise foram feitos para os quatro tratamentos.

Na figura 17-A, C, E e G, é possível observar que nos três segmentos intestinais o número de células caliciformes contendo mucinas ácidas representa a maior parte do número total de células caliciformes, em todos os tratamentos. No entanto, 30%CBL apresentou maior porcentagem de células caliciformes contendo mucinas neutras nos três segmentos, comparado aos outros tratamentos. É possível observar na figura 17-B, D, F e H, que, entre as células caliciformes contendo mucinas ácidas, as que têm sulfomucinas correspondem a cerca de 90%, em S1, S2 e RT de todos os tratamentos.

A marcação de caspase-3 por imunohistoquímica foi analisada qualitativamente em três níveis de acordo com a intensidade da marcação em marrom. A intensidade de marcação do epitélio foi classificada como alta, média ou baixa. Foi possível observar que nos segmentos S2 e RT, a marcação foi mais intensa nos animais que receberam dietas com menores porcentagens de colostro bovino e, à medida que esta porcentagem aumentou, a marcação pela caspase-3 foi menos intensa, inferindo menor taxa de apoptose. No segmento S1, não foi possível observar um padrão de intensidade de marcação por anti-caspase-3 relacionado às dietas.

As Figuras 18, 19 e 20 mostram a frequência da classificação da intensidade de coloração da mucosa por anti-caspase-3, em alta, média ou baixa, em cada tratamento, nos segmentos S1, S2 e RT, respectivamente.

Figura 17. (A, C, E e G) Porcentagem de células caliciformes contendo mucina neutra e ácida em relação ao número total de células caliciformes, nos segmentos intestinais S1, S2 e RT de juvenis de pacu alimentados com 0, 10, 20 e 30%CBL, repectivamente. (B, D, F e H) Porcentagem de células caliciformes contendo sialo e sulfomucinas em relação ao número total de células caliciformes contendo mucinas ácidas, nos segmentos intestinais S1, S2 e RT de juvenis de pacu alimentados com 0, 10, 20 e 30%CBL, repectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Frequência de classificação da intensidade de marcação da enzima caspase-3, por anti-caspase-3, nos enterócitos do segmento cranial do intestino médio (S1) utilizando três níveis de intensidade: alta, média e baixa, nos grupos 0% CBL, 10% CBL, 20% CBL e 30% CBL. 0% CBL- grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; 10% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Frequência de classificação da intensidade de marcação da enzima caspase-3, por anti-caspase-3, nos enterócitos do segmento medial do intestino médio (S2) utilizando três níveis de intensidade: alta, média e baixa, nos grupos 0% CBL, 10% CBL, 20% CBL e 30% CBL. 0% CBL- grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; 10% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Frequência de classificação da intensidade de marcação da enzima caspase-3, por anti-caspase-3, nos enterócitos do reto (RT) utilizando três níveis de intensidade: alta, média e baixa, nos grupos 0% CBL, 10% CBL, 20% CBL e 30% CBL. 0% CBL- grupo que recebeu dieta sem colostro bovino liofilizado; 10% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL- grupo que recebeu dieta com inclusão de 30% de colostro bovino liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

5. DISCUSSÃO

Os parâmetros de desempenho zootécnico dos pacus adensados a 50 kg/m³ foram semelhantes nos quatro tratamentos ($P>0,05$). No entanto, a taxa de conversão alimentar (CA), de 2,75 a 3,67, foi alta comparada a outros estudos com pacus. Rodrigues et al. (2010), por exemplo, estudando dietas com diferentes porcentagens de fibras para pacus adensados a 1,6 kg/m³, avaliaram como bom desempenho animais com CA de 1,20. Machado-Neto et al. (2015) encontraram CA entre 0,92 a 1,00 em juvenis de pacu alimentados com dietas sem (0% CBL) e com a inclusão de colostro bovino liofilizado (10 e 20% CBL). Desta forma, a CA observada no presente trabalho pode ser relacionada às condições adversas impostas pelo adensamento de 50 kg/m³ ou às dietas semi-purificadas fornecidas.

O aumento na contagem de células caliciformes no epitélio intestinal tem sido indicado como resposta à presença de patógenos ou à alimentação, como em dietas contendo fatores anti-nutricionais (BAEVERFJORD; KROGDAHL, 1996). A inclusão de fontes de proteínas vegetais na dieta da truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, resulta em maior número de células caliciformes (OSTASZEWSKA et al., 2005). Por outro lado, verifica-se que a privação alimentar diminui o número destas células em juvenis do peixe-gato *Silurus medionalis* (ZENG et al., 2012). No presente trabalho, o número de células caliciformes contendo sulfomucinas, no reto, foi menor nos juvenis que receberam as rações com as maiores concentrações de colostro bovino liofilizado (20 e 30%) comparado aos que receberam rações sem o colostro bovino (0% CBL) ou com baixa concentração (10%). Cruz et al. (2017) observaram que juvenis de pacu alimentados por 30 dias com 20% de colostro bovino possuíam menor número de células caliciformes contendo sulfomucinas nos segmentos S1 e S2 e, no reto, menor número de células caliciformes contendo mucinas ácidas e menor número total de células caliciformes. Sendo o colostro bovino um alimento nutracêutico que, dentre outras substâncias, possui componentes imunes, como lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima (CHOI et al., 2010), pode-se inferir que em maiores concentrações, esta secreção láctea conferiu proteção ao epitélio intestinal, diminuindo a necessidade de produção de células caliciformes contendo sulfomucinas após 30 dias experimentais.

Considerando $P<0,059$, no reto de juvenis de pacu que receberam dietas com 0 e 10% CBL houve maior número de células caliciformes contendo mucinas ácidas do que no de juvenis que receberam dietas com 20% CBL. Da mesma forma que nas células

caliciformes contendo sulfomucinas, o colostro bovino pode estar fornecendo proteção ao epitélio, diminuindo a necessidade do animal em aumentar a produção de mucinas. Entretanto, juvenis recebendo 30%CBL não diferiram no número de células em relação aos outros grupos, indicando que em altas concentrações, o colostro bovino pode induzir a síntese de células caliciformes contendo mucinas ácidas. Assim, observa-se que a presença de colostro bovino no trato gastrointestinal altera a dinâmica de renovação de células caliciformes no epitélio intestinal, podendo atuar como protetor e/ou imunoestimulante.

Em situações de estresse, o número de células caliciformes e a secreção de mucinas aumentam no epitélio intestinal. A secreção crônica de muco pode causar depleção das células caliciformes e, conseqüentemente, diminuição da proteção do epitélio, podendo resultar em patologias (KIM; HO, 2010). Os resultados deste trabalho indicam que o colostro bovino minimiza a necessidade do aumento de células caliciformes, conferindo proteção ao epitélio e diminuindo a chance de depleção destas células. Por fim, como as mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas), têm maior potencial para resistir às enzimas bacterianas, por causa da sua maior viscosidade e acidez comparada às neutras, (FONTAINE; MESLIN; ANDRIEUX, 1996), pode-se inferir que o colostro bovino liofilizado protege o epitélio contra a ação bacteriana.

Os resultados encontrados para D_s mostram que a densidade de células caliciformes contendo sulfomucinas, no reto, teve resultado correspondente ao encontrado no número destas células, sendo menor nos juvenis que receberam as rações 20 e 30%CBL em relação a 0 e 10% CBL. No entanto, o cálculo da densidade de células permite comparar o número de células considerando a densidade de superfície do segmento analisado. Diferentemente da morfologia encontrada em mamíferos, a mucosa intestinal de peixes apresenta dobras macroscópicas, também denominadas de pregas, que podem apresentar grande variedade em quantidade e ramificação (ROTTA, 2003). Este fato impossibilita que a contagem de células seja feita levando em consideração o número de pregas, como em mamíferos, nos quais a contagem de células caliciformes geralmente é feita considerando-se determinado número de vilosidades. Assim, ao calcular a razão do número de células pela densidade de superfície, pensou-se em amenizar essas diferenças. Ainda tentando corrigir este fato, também foi calculada a densidade de células (D_v) através da razão do número de células pelo volume parcial. Pelos resultados encontrados na D_v , observa-se que animais que receberam baixas concentrações de colostro bovino na dieta (0 ou 10%) tiveram maior D_v que os que receberam uma concentração maior, de

20%. Isso é semelhante ao resultado encontrado para o número de células caliciformes e *Ds*. No entanto, é importante destacar que os resultados de *Dv* mostram que alta concentração de colostro (30%CBL) resultou em *Dv* semelhante a dos animais que receberam dietas com baixas concentrações, indicando que em altas concentrações, o colostro bovino pode atenuar o efeito protetor que possui quando presente em concentrações de até 20%.

Nos mamíferos, os fatores de crescimentos, como o IGF-I e II e EGF, presentes no colostro atuam no trato gastrointestinal do recém-nascido aumentando a sobrevivência celular pela diminuição da apoptose e pelo estímulo da proliferação de células epiteliais e musculares (KUEMMERLE, 2012). Neste trabalho, a presença de colostro bovino nas dietas não interferiu na espessura da camada muscular e na densidade de superfície (*Sv*) e volume da camada mucosa (*Vv*) dos juvenis de pacu. No entanto, Cruz et al. (2017), encontrou diferença na espessura da camada muscular de pacus alimentados por 60 dias com uma ração com 20% de colostro bovino em relação a dietas com 0 e 10% desta secreção láctea, relacionando a presença de IGF-I a essa diferença. Rodrigues et al. (2010), trabalhando com peixes cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, alimentados sem ou com inclusão de colostro bovino (nas concentrações de 10 e 20%), no S1, encontraram maior espessura da camada muscular de peixes alimentados com dietas com inclusão de colostro em relação àqueles alimentados sem inclusão de colostro na dieta. No S2 e RT, os peixes alimentados com 10% de colostro tiveram maior espessura de camada muscular que os alimentados sem inclusão de colostro. No entanto, os alimentados com 20% de inclusão de colostro tiveram semelhante espessura dos alimentados sem colostro. Os autores relacionaram este resultado com uma possível inflamação do tecido por causa da alta concentração de colostro bovino (RODRIGUES et al., 2010).

A porcentagem de células caliciformes contendo mucinas ácidas foi maior em relação às que continham mucinas neutras, para o S1, S2 e RT, dos quatro tratamentos, assim como a porcentagem de células caliciformes contendo sulfomucinas em relação às que continham sialomucinas. Esses resultados concordam com os encontrados no intestino de roedores, suínos e primatas, os quais mostraram maior proporção de células caliciformes contendo mucinas ácidas e sulfomucinas em relação às que continham mucinas neutras e sialomucinas, respectivamente. Pedini et al. (2001) e Cruz et al. (2017), também relatam maior porcentagem de sulfomucinas no intestino de *Umbrina cirrosa* L. e *Piaractus mesopotamicus*, respectivamente. Paralelamente, ao comparar o presente trabalho com o trabalho de Cruz et al. (2017), também com juvenis de pacu, é possível observar que, na

dieta sem colostro, a porcentagem de células caliciformes contendo sialomucinas, no RT, foi menor no presente trabalho comparado ao dos autores citados (8,14% e 30,89%, respectivamente). Como nos dois trabalhos as porções foram realizadas no grupo que não recebeu colostro bovino liofizado, é possível relacionar esta baixa porcentagem de células caliciformes contendo sialomucinas, no RT, à alta densidade que os peixes foram submetidos no presente trabalho. No entanto, esta diferença também pode estar relacionada às diferentes composições das dietas dos dois trabalhos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001).

A taxa de apoptose nos segmentos S2 e RT foi menos intensa nos animais que receberam maiores concentrações de colostro bovino do que naqueles com baixa concentração ou ausência do mesmo na dieta. Estudo *in vitro* com células intestinais T-84 também encontrou diminuição da taxa de apoptose induzida por temperatura em células tratadas com colostro bovino, comparado com células não tratadas (MARCHBANK et al., 2011). Possivelmente, esta relação inversa se deva a maior concentração de moléculas biologicamente ativas, como IGFs e EGF, e de fatores antioxidantes nas dietas com maiores concentrações de colostro bovino em comparação com as que possuem menores concentrações, o que corrobora com a relação positiva entre o nível de inclusão de colostro e a capacidade de absorção de radicais oxigenados encontrada na análise das dietas deste trabalho. Radicais oxigenados são produzidos pelo animal em maior quantidade quando estes se encontram em situação de estresse e, a presença destas substâncias no intestino está relacionada ao aumento da permeabilidade de seu epitélio (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001). Os fatores de crescimento citados têm ação anti-apoptótica e os fatores antioxidantes diminuem esses radicais oxigenados, ambos amenizando a situação de estresse, conferindo diminuição da taxa de apoptose e proteção do epitélio intestinal. Desda forma, as dietas com colostro bovino têm potencial de proteger a mucosa intestinal de pacus sob estresse por adensamento.

6. CONCLUSÃO

O colostro bovino diminuiu a apoptose nos segmentos S2 e RT do intestino, e o número das sulfomucinas no RT. Desta forma, o colostro bovino liofilizado pode ser utilizado como fator nutracêutico para pacus (*Piaractus mesopotamicus*), a fim de diminuir a taxa apoptótica e proteger o intestino contra enzimas bacterianas, uma das principais funções das sulfomucinas.

REFERÊNCIAS

- ALPTEKIN, N. et al. Lipid peroxides, glutathione, gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyltranspeptidase activities in several tissues of rats following water-immersion stress. **Pharmacological research**, v. 34, n. 3–4, p. 167–169, 1996.
- APPUKUTTY, M. et al. Colostrum protects against exercise - induced oxidative stress in skeletal muscle in mice. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 649–656, 2012.
- BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. **Estimation of Surface Area from Vertical Sections**. [s.l: s.n.]. v. 42
- BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, Å. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 19, n. 5, p. 375–387, 1996.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. [s.l.] UFSM, 2005.
- BOUDRY, C.; THEWIS, A. Bovine Colostrum as a Natural Growth Factor for Newly-Weaned Piglets: A Review. **Bulletin UASVM Animal Science Biotechnology**, v. 66, p. 1–9, 2009.
- BRITSKI, H. A. et al. **Peixes do Pantanal manual de identificação**. Brasília: Brasília Embrapa Informação Tecnológica, 2007.
- BROWNING, T. H.; TRIER, J. S. Organ Culture of Mucosal Biopsies of Human Small Intestine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 1423–1432, 1969.
- CASTAGLIUOLO, I. et al. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 271, n. 5, p. G884–G892, 1996.
- CASTAGLIUOLO, I. et al. Colonic mucin release in response to immobilization stress is mast cell dependent. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 274, n. 6, p. G1094–1100, 1998.
- CHOI, H. S. et al. Neuroprotective effects of consuming bovine colostrum after focal brain ischemia/reperfusion injury in rat model. **Nutrition research and practice**, v. 4, n. 3, p. 196–202, 2010.
- CRUZ, T. M. P. DA et al. Dietary lyophilized colostrum alters distribution of goblet cells and

- the intestinal epithelium of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 468, p. 286–292, 2017.
- DEPLANCHE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense : goblet cells and the intestinal mucus layer 1 – 3. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, 2001.
- EL-ASHRAM, A. M. M.; EL-BOSHY, M. E. **Assessment Of Dietary Bovine Lactoferrin In Enhancement Of Immune Function And Disease Resistance In Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*)**. The Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. **Anais...** 12 abr. 2008
- FONTAINE, N.; MESLIN, J. C.; ANDRIEUX, C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 881–892, 1996.
- GODHIA, M.; PATEL, N. Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical : A Review. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 37–47, 2013.
- HULEA, S. A.; MOGOS, S.; MATEI, L. Interaction of lactoperoxidase with enzymes and immunoglobulins in bovine milk. **Biochemistry International**, v. 19, n. 6, p. 1173–81, 1989.
- HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 442–474, 2011.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2008.
- KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease : Recent Insights and Progress. p. 319–330, 2010.
- KORHONEN, H. J. Health - Promoting Proteins and Peptides in Colostrum and Whey. In: **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. [s.l: s.n.]. p. 151–168.
- KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2.Relationships to diet - the long and short of a convoluted issue. **Environmental Biology of Fishes**, v. 42, p. 129–141, 1995.
- KUEMMERLE, J. F. Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 409–423, 2012.
- KUMARI, J.; SWAIN, T.; SAHOO, P. K. Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish *Clarias batrachus*. **Veterinary**

Immunology and Immunopathology, v. 94, n. 1–2, p. 1–9, 2003.

KWON, O. Y. et al. Antioxidant and anticytokine effects of bovine colostrum in intestinal ischemia/reperfusion injured rat model. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1295–1301, 2010.

MACHADO-NETO, R. et al. Growth performance of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and dourado (*Salminus brasiliensis*) fed with lyophilized bovine colostrum. **Aquaculture Research**, v. 47, 2015.

MADARA, J. L. Functional morphology of epithelium of the small intestine. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 83–120, 2011.

MARCHBANK, T. et al. The nutraceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 3, p. G477–G484, 2011.

MAZZON, E. et al. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. **Gut**, v. 51, n. 4, p. 507–513, 2002.

MELLO, R. DE O. et al. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2012.

MELO, P. S. . et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.

MEROLA, N.; DE SOUZA, J. H. Preliminary studies on the culture of pace, *Colossoma mitrei*, in floating cages: effect of stocking density and feeding rate on growth performance. **Aquaculture**, v. 68, p. 243–248, 1988.

NONOSE, R. et al. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 267–275, 2009.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R. T.; DONOVAN, S. M. Intestinal Effects of Milkborne Growth Factors in Neonates of Agricultural Importance. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2509–2522, 1996.

OSTASZEWSKA, T. et al. 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**, v. 245, n. 1–4, p. 273–286, 2005.
- PANDEY, N. N. et al. Bovine colostrum : A veterinary nutraceutical. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 3, n. 3, p. 31–35, 2011.
- PEDINI, V. et al. Carbohydrate histochemistry of the alimentary canal of the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. **Anatomy, Histology, Embryology**, v. 30, n. 6, p. 345–349, 2001.
- PRZYBYLSKA, J.; ALBERA, E.; KANKOFER, M. Antioxidants in bovine colostrum. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 402–409, 2007.
- RASKOVIC, B. S. et al. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, v. 56, n. 1, p. 87–100, 2011.
- RODRIGUES, A. P. O. et al. Intestinal histomorphology in *Pseudoplatystoma fasciatum* fed bovine colostrum as source of protein and bioactive peptides. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 5, p. 524–530, 2010.
- ROTTA, M. A. **Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Psicicultura**. [s.l: s.n.].
- SAKAI, M. et al. Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 3, p. 239–247, 7 abr. 2006.
- SANTOS, J. et al. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 277, n. 2, p. G391–G399, 1999.
- SANTOS, J. et al. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 278, p. G847–G854, 2000.
- SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: Série estudos mercadológicos**. [s.l: s.n.].
- SÖDERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and The Gastrointestinal Tract II. Stress and intestinal barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 1, p. G7–G13, 2001.
- URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. P.; BALDISSEROTTO, B. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP UNESP, 2014.
- YIN, L. et al. Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the

apoptotic response to oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35458–35464, 2003.

ZEISSIG, S. et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. **Gut**, v. 56, n. 1, p. 61–72, 2007.

ZENG, L. Q. et al. The effects of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 162, n. 3, p. 200–211, 2012.

APÊNDICE

Apêndice A. Documento de aprovação do experimento pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Fone: (19) 3429-4400
www4.esalq.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto “Fatores antioxidantes do colostro bovino na proteção celular”, protocolo nº 2015-13 sob a responsabilidade da Profª Débora Botêquilo Moretti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, em reunião de 20/07/2015.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 31/03/2019
Espécie/Linhagem	Peixe/ <i>P. mesopotamicus</i>
Nº de animais	500
Peso/Idade	100 g
Sexo	M+F
Origem	Empresa especializada – Piscicultura Morro alto. Razão social: Florisvaldo Damiao CNPJ 17.875.306/0001-09

Piracicaba, 20 de Julho de 2015

Prof. Dr. José Fernando Machado Menton
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - ESALQ/USP