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

**Epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*,
Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816)
alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado**

Thaline Maira Pachelli da Cruz

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

**Piracicaba
2013**

Thaline Maira Pachelli da Cruz
Zootecnista

Epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado

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

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

Piracicaba
2013

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

Cruz, Thaline Maira Pachelli da

Epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado / Thaline Maira Pachelli da Cruz . - - Piracicaba, 2013.

95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Peixes juvenis 2. Onívoro 3. Carnívoro 4. Histologia entérica 5. Células caliciformes I. Título

CDD 639.375
C957e

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

DEDICATÓRIA

À minha família,

À minha madrinha Luzia,

À memória de meu tio Carlos Roberto Pachelli.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pois sem ele nada é possível;

À minha **mãe Crédice** que sempre me ajudou com suas palavras, nos momentos difíceis da minha vida e riu comigo nos momentos alegres;

Ao meu **pai Ananias** que sempre me apoiou e me cercou de bons exemplos;

Aos dois digo-lhes: Amo muito vocês e obrigada por não me deixarem desistir, apesar de todas as dificuldades;

À Minha **irmã Thatiane** e meu **irmão Thiago** pela compreensão;

À minha madrinha **Luzia** pelo carinho e contribuição para com minha formação;

Ao **Cesar Vicente** pela atenção e carinho;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Raul Machado Neto**, primeiramente pela oportunidade, pelo aprendizado, pela amizade, pelo apoio e pelo exemplo profissional;

Ao **Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino**, responsável pelo setor de piscicultura da ESALQ/USP, pela oportunidade de trabalho em conjunto, aprendizado, pelo exemplo profissional e pela colaboração que tornou possível a realização deste experimento a campo;

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pela atenção e ensinamentos durante o curso;

À **Débora Botéquio Moretti** pelos ensinamentos, pelo apoio, amizade, pelas palavras amigas e conselhos;

À **Wiolene Montanari Nordi** pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade;

Aos amigos da pós-graduação, **Fabiane Souza Costa, Pâmela Marcos Rizzo, Dênia Borges Atílio, Daniel Polizel, Patricia Maloso Ramos, Gabriel Costa, Daiane Fausto, Tatiane Beloni, Marcelo Coutinho** pela amizade e carinho;

As amigas do LAFA, **Mariana Pontin, Jéssica Pampolini e Mayra Maniero Rodrigues** pela amizade;

Aos amigos do setor de piscicultura **Renan Antunes Donadelli, Fernando Yamamoto, Freddy Armando Aguilar, Roselany Corrêa e Lígia Uribe Gonçalves** pela amizade, e aos funcionários do setor de piscicultura, **Junior e Sergio** pelo auxílio durante o experimento a campo;

À **Universidade Estadual de Maringá**, por oferecer-me a oportunidade de realizar a graduação em Zootecnia e ingressar-me na pesquisa;

À **Universidade de São Paulo/ “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”**, e ao **Departamento de Zootecnia** pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro através do projeto;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos;

A **todos** que, direta e indiretamente, estiveram ao meu lado me incentivando e me dando forças para alcançar o meu objetivo e que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa e dissertação.

Obrigada!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”
Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Proteína na alimentação de peixes	21
2.2 Colostro como alternativa complementar de proteínas e peptídeos bioativos para peixes	22
2.3 Biologia das espécies.....	24
2.3.1 Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	24
2.3.2 Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>).....	24
2.4 Anatomia e Morfologia do intestino de peixes.....	25
2.5 Histologia e células do epitélio intestinal de peixes.....	26
2.6 Células Caliciformes.....	28
Referências	31
3 EPITÉLIO INTESTINAL DE JUVENIS DE PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i> ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO	39
Resumo	39
Abstract	39
3.1 Introdução	40
3.2 Material e Métodos	41
3.2.1 Dietas experimentais	41
3.2.2 Condição experimental	42
3.2.3 Coleta das amostras intestinais	43
3.2.4 Microscopia óptica	44
3.2.5 Número de células caliciformes- Histoquímica	45
3.2.6 Histologia do epitélio intestinal	45
3.2.7 Estereologia	45
3.2.8 Análise estatística	47

3.3 Resultados e discussão	47
3.3.1 Condição experimental e parâmetros zootécnicos	47
3.3.2 Histologia do epitélio intestinal de juvenis de pacu	49
3.3.3 Células caliciformes	52
3.3.4 Estereologia	63
3.4 Considerações finais	64
Referências	64
4 EPITÉLIO INTESTINAL DE JUVENIS DE DOURADO <i>Salminus brasiliensis</i> ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO	69
Resumo	69
Abstract	69
4.1 Introdução	70
4.2 Material e métodos	71
4.2.1 Dietas experimentais	71
4.2.2 Condição experimental	72
4.2.3 Coleta das amostras intestinais	73
4.2.4 Microscopia óptica	74
4.2.5 Número de células caliciformes – histoquímica	74
4.2.6 Histologia do epitélio intestinal	75
4.2.7 Estereologia	75
4.2.8 Análise estatística	76
4.3 Resultados e discussão	77
4.3.1 Condição experimental e parâmetros de desempenho	77
4.3.2 Histologia do epitélio intestinal de juvenis de dourado	78
4.3.3 Células caliciformes	81
4.3.4 Estereologia	87
4.4 Considerações finais	88
Referências	88
APÊNDICE	93

RESUMO

Epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do colostro bovino liofilizado (CBL), utilizado como fonte parcial da dieta protéica, sobre as características histológicas do epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dourado (*Salminus brasiliensis*). Os juvenis foram distribuídos num delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2. Foram utilizadas dietas com três níveis de inclusão de CBL (0%, 10% e 20%) e dois períodos experimentais (30 e 60 dias), oferecidas duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Para o estudo histológico, o intestino foi dividido em três segmentos, S1, S2 e reto para pacu e S1, S2 e intestino posterior para dourado. Foram avaliadas a espessura da camada muscular; o volume parcial da mucosa absorptiva (Vv); o número das células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras e totais, e os subtipos ácidas - sialomucinas e sulfomucinas. Nos juvenis de pacu, a inclusão de 20% de CBL alterou a distribuição das células caliciformes contendo as mucinas ácidas, neutras e totais, os subtipos sialomucinas e sulfomucinas, e a espessura da camada muscular, enquanto o Vv foi afetado apenas pelo período experimental. Nos juvenis de dourados, efeito de período experimental foi observado para células caliciformes contendo mucinas ácidas, neutras e totais e os subtipos sialomucinas e sulfomucinas, espessura da camada muscular e Vv. A adição de 10% de CBL afetou apenas o Vv no segmento S1. Considerando os aspectos avaliados no presente estudo, a presença do colostro bovino liofilizado na dieta influenciou, no período estudado, as características histológicas entéricas de juvenis de pacu, enquanto que nos juvenis de dourado influencia desta secreção láctea não foi observada.

Palavras-chave: Peixes juvenis; Onívoro; Carnívoro; Histologia entérica; Células caliciformes

ABSTRACT

Intestinal epithelium of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) and dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) juveniles fed diet containing lyophilized bovine colostrum

The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized bovine colostrum (LBC), used as partial source of protein in the diet, on the histological characteristics of the intestinal epithelium of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and juvenile dourado (*Salminus brasiliensis*). Juveniles were distributed in a completely randomized design in a factorial scheme 3x2. Three diets were used with different levels of LBC inclusion (0%, 10% and 20%) and two experimental periods (30 and 60 days) offered twice daily until apparent satiation. For the histological study, the intestine was divided into three segments, S1, S2 and rectum to the pacu and S1, S2 and posterior intestine to the dourado. The muscle layer thickness; the mucosal absorptive volume (Vv); the number of goblet cells containing acidic and neutral mucins and the acidic subtypes – sialomucin and sulphomucin were evaluated. In juvenile pacu, the inclusion of 20% of LBC changed the distribution of goblet cells containing acidic, neutral and total mucins, the subtypes sialomucins and sulphomucins, and the thickness of the muscle layer, while the Vv was affected only by the experimental period. In juvenile dourado, effect of experimental period was observed for goblet cells containing acidic, neutral and total mucins and subtypes sialomucins, sulphomucins, thickness of muscle layer and Vv. The addition of 10% of LBC affected only Vv in the segment S1. Considering the aspects studied, the presence of lyophilized bovine colostrum in the diet influenced, in the period studied, the enteric histological characteristics of juvenile pacu, while the juvenile dourado influence of this lacteal secretion was not observed.

Keywords: Juvenile fish; Omnivorous; Carnivorous; Enteric histological; Goblet cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	24
Figura 2 – Dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	25
Figura 3 – Célula caliciforme	29
Figura 4 – Segmento intestinal de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	44
Figura 5 – Sistema teste de arcos cicloides.....	46
Figura 6 – Parâmetros de desempenho de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> , Ganho de Peso (A); Conversão Alimentar (B).....	49
Figura 7 – Epitélio intestinal dos segmentos S1 (A); S2 (B) e reto (C) dos juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	50
Figura 8 – Espessura da camada muscular (ECM) de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> no segmento S2.	51
Figura 9 – Células caliciformes de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> coradas com PAS.....	52
Figura 10 – Células caliciformes ácidas e neutras de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S1 (A), S2 (B) e reto (C).....	53
Figura 11 – Mucinas neutras de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S1 (A) e reto (B).....	54
Figura 12 – Mucinas ácidas de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S1 (A); S2 (B) e reto (C)	56
Figura 13 – Total de mucinas de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S1(A); S2 (B) e reto (C).....	59
Figura 14 – Sialomucinas de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S2 (A) e reto (B).....	61
Figura 15 – Sulfomucinas de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos segmentos S1 (A) e S2 (B).	62
Figura 16 – Segmentos intestinais de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	74
Figura 17 – Epitélio intestinal de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i> nos segmentos S1 (A), S2 (B) e intestino posterior (C)	79
Figura 18 – Dobras de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i> nos segmentos S1 (A), S2 (B) e intestino posterior (C).....	81

- Figura 19 – Células caliciformes ácidas e neutras de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* nos segmentos S1 (A), S2 (B) e intestino posterior (C).....82
- Figura 20 – Células caliciformes totais, contendo mucinas ácidas e neutras do epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bromatologia do colostro bovino liofilizado.....	41
Tabela 2 – Composição das dietas experimentais dos juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	42
Tabela 3 – Desempenho (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de pacu <i>Piaractus Mesopotamicus</i> alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado aos 30 e 60 dias.....	48
Tabela 4 – Índice de sobrevivência dos pacus <i>Piaractus mesopotamicus</i>	49
Tabela 5 – Espessura da camada muscular (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	52
Tabela 6 – Células caliciformes neutras (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	54
Tabela 7 – Células caliciformes ácidas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	57
Tabela 8 – Total de células caliciformes (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	58
Tabela 9 – Sialomucinas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	60
Tabela 10 – Sulfomucinas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	62
Tabela 11 – Volume parcial da mucosa absortiva (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	64
Tabela 12 – Composição das dietas experimentais dos juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	72
Tabela 13 – Desempenho (médias $\pm$ erro padrão) de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i> alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado aos 30 e 60 dias	78
Tabela 14 – Espessura da camada muscular (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	80
Tabela 15 – Células caliciformes neutras (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	83
Tabela 16 – Células caliciformes ácidas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	84

Tabela 17 – Total de células caliciformes (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	85
Tabela 18 – Sialomucinas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	86
Tabela 19 – Sulfomucinas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	86
Tabela 20 – Volume parcial da mucosa absorptiva (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	88

1 INTRODUÇÃO

O consumo de peixe no mundo alcançou níveis históricos em 2010, conforme relatório da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), atingindo uma média de 17 Kg por pessoa, com uma taxa anual de crescimento nos últimos anos de 7%. Já no Brasil, o consumo de peixes em 2009 chegou a 9 kg por pessoa, próximo aos valores recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 12 kg por pessoa. É importante destacar que este cenário de crescente produção vem acompanhado de uma exigência do mercado consumidor por qualidade cada vez maior (FAO, 2010).

A produção de pescado com qualidade é a principal exigência do mercado consumidor, para tanto as boas práticas de manejo voltadas para as condições ambientais, controle e qualidade da água, da ração ofertada, da limpeza e manutenção do cultivo e das condições de sanidade dos animais devem ser adotadas.

Embora no Brasil a maioria das criações sejam de espécies exóticas, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a criação de dourado (*Salminus brasiliensis*) tem se destacado principalmente por ser alvo de pesca e pelo valor econômico (FLORA et al., 2010). Porém, o cultivo intensivo desta espécie depende da superação técnica de alguns fatores como o canibalismo, adaptação ao cativeiro e custo de dietas com altos níveis de proteína. Por outro lado, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) possui um potencial de expansão enorme e, mesmo sem ter sido feito o melhoramento genético necessário, apresenta ótima conversão alimentar, bom crescimento e manejo simples (WEINGARTNER; ZANIBONI, 2010).

Como, destacado por Weingartner e Zaniboni (2010) há um aumento do interesse dos piscicultores pela criação de peixes nativos, em função da boa aceitação no mercado consumidor e melhor preço de mercado.

O colostro bovino, rica fonte de proteína de origem animal e peptídeos bioativos, excedente em regiões produtoras de leite, constitui-se em uma alternativa complementar a ser considerada para a nutrição de peixes, podendo vir a ser inovador quando acrescido como fonte parcial de proteína para espécies endêmicas e neotropicais, como o pacu e o dourado. Trata-se da primeira secreção láctea produzida pelos mamíferos, sendo uma mistura de secreções produzidas pela glândula mamária e de elementos oriundos do soro sanguíneo, os quais são

transportados pelo epitélio alveolar e acumulados durante o período pré-parto (JEFFCOTT, 1972). O colostro é rico em proteínas, principalmente as imunoglobulinas e fatores bioativos, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e o seu armazenamento na forma liofilizada preserva a sua qualidade e características originais.

A administração de componentes bioativos, como o IGF-I presentes no colostro, pode ser especialmente interessante para os peixes como estimulante para o crescimento muscular (SCHEP et al., 1999). Adicionalmente, de acordo com Pandey et al. (2011), o colostro bovino também é considerado um alimento nutracêutico.

O presente trabalho teve como proposta estudar os efeitos do colostro bovino liofilizado fornecido como fonte parcial de proteína na ração de peixes sobre a distribuição de células caliciformes e características histológicas do epitélio intestinal de juvenis de pacu e dourado.

Referências

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

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

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 47, n. 4, p. 439-464, 1972.

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

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

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI, E.F. E.Z. Biologia e cultivo do dourado. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria. Ed da UFSM, 2010. cap. 9, p. 245-282.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteína na alimentação de peixes

As proteínas representam uma importante fonte energética para os teleósteos, pois são essenciais para o crescimento, uma vez que representam de 64 a 75% do total da massa corporal dos peixes (BICUDO, 2008). São polímeros de aminoácidos unidos por ligação covalente. Atuam como catalizadores (enzimas), transportadores (oxigênio, vitaminas, fármacos, lipídeos, ferro, cobre, etc.), proteção imune (anticorpos), reguladores (insulina, glucagon), movimento (actina e miosina), estruturais (colágeno), transmissão dos impulsos nervosos (neurotransmissores) e no controle do crescimento e diferenciação celular (fatores de crescimento) (NELSON; COX, 2012).

A maior parte dos custos corresponde à fração protéica o que justifica a constante procura por alternativas. Quando desbalanceada ela é fonte de nitrogênio (amônia) excretada para a água, via brânquias, e se constitui no principal resíduo metabólico protéico dos peixes (CYRINO et al., 2010).

As proteínas são fundamentais na nutrição, pois estão presentes em todo o organismo formando tecidos e exercendo tanto funções estruturais quanto funcionais. Dados sobre a nutrição e fisiologia de peixes endêmicos e neotropicais ainda são muito escassos principalmente com relação a juvenis de pacu e dourado. Na formulação de ração, o pacu, por ser uma espécie onívora, permite a utilização de variadas fontes protéicas tanto de origem animal quanto vegetal. Ao estudar diferentes fontes e níveis de proteína em dietas para juvenis de pacu, Fernandes, Carneiro e Sakomura (2001) avaliaram três níveis de substituição (0, 50 e 100%) da fonte protéica de farinha de peixe pelo farelo soja e três níveis de proteína bruta (18, 22 e 26%). Os autores observaram que o nível de 22% de proteína bruta foi o mais adequado e que a farinha de peixe pode ser substituída, total ou parcialmente, pelo farelo de soja.

Por ocupar o topo da cadeia trófica, o cultivo do dourado e sua expansão está limitada. Seu hábito alimentar exige uma dieta rica em proteínas de qualidade, condição que demanda elevado gasto com alimentação. Não existe no mercado uma ração para atender as exigências nutricionais desta espécie (WEINGARTNER; ZANIBONI, 2010). Machado (2004) determinou a exigência protéica de alevinos de dourado, usando seis dietas isoenergéticas (4000 kcal EM/kg) e semipurificadas,

com níveis crescentes de proteína bruta (33,93; 38,11; 41,18; 45,33; 49,65 e 53,61%) fornecidas duas vezes ao dia até a saciedade aparente durante 94 dias. O autor observou que o aumento da concentração de proteína bruta da dieta até 41,18% melhorou a conversão alimentar.

2.2 Colostro bovino liofilizado como fonte parcial de proteínas para peixes

O colostro bovino excedente da alimentação de bezerros, rica fonte de proteína de origem animal, constitui-se em uma potencial alternativa complementar a ser acrescida como adicional na nutrição de peixes. Trata-se da primeira secreção láctea produzida pelos mamíferos, sendo uma mistura de secreções produzidas pela glândula mamária e de elementos oriundos do soro sanguíneo, os quais são transportados pelo epitélio alveolar e acumulados durante o período pré-parto (JEFFCOTT, 1972; KRUSE, 1983). Sua composição difere do leite possuindo elevadas concentrações de nutrientes essenciais, proteínas como as imunoglobulinas, hormônios como a insulina e o cortisol e componentes bioativos, como os IGFs, os quais conferem além da nutrição, a proteção imunológica dos bovinos neonatos (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; BÜHLER et al, 1998; PENCHEV, 2008). A atividade de um peptídeo é baseada na sua composição e sequência de aminoácidos (2 a 20 resíduos), podendo ser inativos quando ocorre hidrólise enzimática pela digestão de enzimas (KORHONEN, 2010).

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), atua como mediador do hormônio do crescimento e é sintetizado pelo fígado, podendo ter ação autócrina, parácrina e endócrina (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; NELSON; COX, 2012; REECE, 2007). A administração de componentes bioativos pode ser especialmente interessante para os peixes como estimulante para o crescimento muscular, pois enquanto na maioria dos vertebrados o crescimento do tecido muscular pós-juvenil se dá pela hipertrofia, em peixes este crescimento pós-larval é resultado da associação da hiperplasia e hipertrofia (FLORINI et al., 1998; MOMMSEN, 2001; RODRIGUES et al., 2009; SCHEP et al., 1999).

O colostro bovino é um alimento nutracêutico, sendo eficaz para a função imunológica e cicatrização das lesões intestinais (PANDEY et al., 2011). A proteção imunológica deve-se a presença de elevadas concentrações de imunoglobulinas (Igs), como IgG, IgM, IgA, IgD com funções sistêmicas, enquanto IgA atua nas superfícies internas do corpo, como o intestino (PANDEY et al., 2011).

A α -lactalbumina, que constitui 20 % das proteínas do soro do colostro, é sintetizada na glândula mamária, onde atua como coenzima para a biosíntese de lactose. A β -globulina que contribui com aproximadamente 50% da proteína no leite bovino, tem entre as suas funções a atividade antiviral, prevenção de patógenos e capacidade de se ligar a componentes hidrofóbicos, como ácidos graxos de cadeia curta (KORHONEN, 2010). A lactoferrina é uma glicoproteína encontrada em diferentes fluidos mamíferos e nos neutrófilos, com funções antimicrobianas, antiinflamatórias, antioxidante e com atividade imunomodulatória, podendo ter sua atividade aumentada pela ação das lisozimas ou anticorpos (KORHONEN, 2010). A lactoperoxidase, por sua vez, é uma glicoproteína que ocorre naturalmente no colostro, e, pode atuar matando ou inibindo o desenvolvimento de bactérias gram negativas (KORHONEN, 2010).

De acordo com Pandey et al. (2011), outros componentes do colostro como nucleosídeos e nucleotídeos, grelina e lisozima, são considerados promotores da saúde. Os autores relatam que nucleotídeos e nucleosídeos regulam as funções corporais e participam da biossíntese de ácidos graxos. A grelina, um peptídeo secretado pelas células do estômago, pâncreas e hipotálamo, hormônio da fome, estimula o apetite no hipotálamo. A lisozima, é uma enzima lítica que destrói a camada protetora das bactérias, interage com outros fatores do colostro, como a lactoperoxidase e a lactoferrina. Também são encontrados no colostro elementos de proteção contra a degradação protéica, como o fator antitripsínico, o inibidor de elastase e α -1-antiquimiotripsina, que auxiliam os fatores imunes e de crescimento a alcançarem o intestino sem serem degradados (KORHONEN., 2010).

Trabalhos mostram que o colostro bovino pode ser utilizado como fonte de proteção, nutrição e componentes bioativos em diversas espécies animais (ABREU et al., 2003; BESSI et al., 2002; CASTRO et al., 2005; LIMA et al., 2009; MORETTI et al., 2010; NORDI et al.; 2013; PAULETTI et al., 2007). Em peixes, Rodrigues et al. (2010), fornecendo uma dieta com 0, 10 e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado para cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum*, observaram a presença de macrófagos no epitélio intestinal dos animais que ingeriram dietas com 20 % de inclusão. Os autores sugerem que o colostro bovino liofilizado pode ter causado uma reação inflamatória na mucosa retal. Pauletti et al. (2007) também trabalhando com cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum*, verificaram que o fornecimento de colostro

bovino (0, 5, 10, 15 e 20%) influencia positivamente o ganho de peso, a taxa de crescimento e a conversão alimentar.

2.3 Biologia das espécies estudadas

2.3.1 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) é uma espécie tropical oriunda das Bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai (GODOY, 1975; BICUDO, 2008), Figura 1. Representante da superordem Ostariophysi, onde inclui-se os peixes de maior valor comercial na aquicultura brasileira (URBINATTI et al., 2010). Completando a taxonomia, este peixe pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae, gênero *Piaractus*, espécie *mesopotamicus*. No gênero *Piaractus*, a espécie *mesopotamicus*, é um dos peixes mais estudados na região sul, sudeste e centro-oeste do Brasil e também recebe os nomes de caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu. De hábito alimentar onívoro se alimenta de folhas, frutos, caules, flores e sementes, podendo se alimentar oportunamente de insetos, moluscos e peixes (URBINATTI et al., 2010).

Figura 1 - Pacu *Piaractus mesopotamicus*
Fonte: <http://gopantanal.com.br/img/peixe/pacu.jpg>

Com relação a reprodução, o pacu possui desova total e fecundação externa, que ocorre após a migração principalmente no mês de novembro. Em cativeiro, esta espécie se reproduz por indução hormonal, durante o período de outubro a março, e a maturação é alcançada aos três anos (URBINATTI et al., 2010).

2.3.2 Dourado (*Salminus brasiliensis*)

O dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier, 1817) é um peixe carnívoro que seleciona alimento vivo, sendo considerado o maior peixe de escama da bacia da

Prata (DAIRIKI, 2009). Pertence a ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Salmininae, gênero *Salminus*, espécie *brasiliensis*. Este peixe predador, ictiófago, habita principalmente os grandes rios (NAKATAMI; AGOSTINHO; BAUMGARTNER, 2001), Figura 2. O *Salminus brasiliensis* possui ampla distribuição geográfica, incluindo as bacias dos rios Paraná, Paraguai, São Francisco e Uruguai. Considerado um peixe de grande porte e indicado para a pesca esportiva, é bastante usado para pesque-pague, por apresentar rápido crescimento e boa conversão alimentar (WEINGARTNER; ZANIBONI, 2010). As larvas e os juvenis dos dourados são reconhecidos como animais carnívoros generalistas e ictiófagos, ou seja, predam uma ampla gama de alimentos de origem animal (DAIRIKI, 2009).

Figura 2 - Dourado *Salminus brasiliensis*

Fonte: <http://zoologia2013.blogspot.com.br/2013/05/peixe-dourado-salminus-brasiliensis.html>

Com relação a reprodução, o dourado apresenta desova anual e total, não apresentando cuidado parenteral. Assim, como outros peixes migradores, sua maturação gonadal é desencadeada por fatores ambientais. No estado de São Paulo, o início da maturação ocorre no mês de Julho com desovas nos meses de Novembro a Janeiro (WEINGARTNER; ZANIBONI, 2010).

2.4 Anatomia e morfologia do intestino de peixes

O hábito alimentar dos peixes (carnívoro, herbívoro, onívoro, iliófago, ictiófago) define características morfológicas e fisiológicas espécie-específicas, inclusive pH do estômago, morfologia e atividade enzimática intestinal (CYRINO et al., 2010). Os peixes podem ser classificados com base nos seus hábitos alimentares como detritívoros, herbívoros, carnívoros e onívoros. Dentro destas categorias, podem ser categorizados adicionalmente como: eurífagos (dieta mista,

que consomem grande variedade de alimentos); estenófagos (consomem pequena variedade de alimentos) e monófagos (apenas uma fonte de alimentos).

O trato gastrointestinal dos peixes pode ser diferenciado em quatro regiões distintas: bucofaringe, esôfago, estômago e intestino (FIERTAK; KILARSKI, 2002). O intestino dos peixes ainda pode ser subdividido em regiões proximal, mediana e distal e em intestino posterior ou reto, dependendo da ausência ou presença da válvula-ileorectal, respectivamente (BERTIN, 1958; ROTTA, 2003).

Nos juvenis, na porção do intestino médio, ocorre a absorção de nutrientes (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), enquanto a posterior é responsável pela pinocitose de macromoléculas, mecanismo de penetração de fluidos na célula através da invaginação da membrana celular, com a formação de vesículas citoplasmáticas (ROTTA, 2003). O mecanismo de absorção de macromoléculas pode permanecer funcional até o animal chegar à vida adulta, podendo variar entre as espécies e durante as diferentes fases da vida, larval, juvenil e adulto (STROBAND; VAN DER VEEN, 1981).

O intestino dos teleósteos apresenta numerosas variações, em especial no que se refere à estrutura anatômica e ao comprimento (REIFEL; TRAVILL, 1978). O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar e as características dos alimentos ingeridos pelos peixes. Os carnívoros possuem, basicamente, um intestino curto, reto e espesso, enquanto os onívoros um intestino em forma de “N” e os herbívoros um intestino longo, enovelado e fino (ROTTA, 2003).

Nos peixes, a mucosa intestinal apresenta dobras macroscópicas também denominadas de pregas (GENTEM et al., 2009). Essas estruturas que aparecem em grande quantidade e variedade, aumentam a superfície de absorção e secreção do órgão (ROTTA, 2003). Baldisseroto e Val (2002) trabalhando com peixes carnívoros e onívoros, observaram que as pregas intestinais são mais desenvolvidas em peixes com hábito alimentar carnívoro.

2.5 Histologia do epitélio intestinal de peixes

A estrutura histológica da parede intestinal dos peixes é constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (GENTEM et al., 2009). Wilson e Castro (2011) e Honorato et al. (2011), descrevem que nos peixes a camada da mucosa é constituída por uma monocamada de células epiteliais cilíndricas. A submucosa é formada por camadas de tecido conjuntivo que dá sustentação a

mucosa, tendo abaixo a muscular, formada por uma camada circular interna e outra longitudinal externa de músculo liso responsáveis pelo peristaltismo; e a serosa, por tecido conjuntivo e epitelial.

O epitélio intestinal simples além das células epiteliais cilíndricas, apresenta células caliciformes; a submucosa contém um grande número de eosinófilos e quantidades variáveis de tecido linfóide. As células eosinófilas contêm peptídeos antimicrobianos e sua desgranulação pode aumentar a permeabilidade vascular e promover adesão de neutrófilos, sugerindo um envolvimento com a imunidade inata e inflamação. Na maioria dos peixes a túnica muscular (músculo liso) tornou-se bem desenvolvida para assegurar a atividade peristáltica. Muitas espécies possuem divertículos na parte anterior do intestino próximo ao piloro, são denominados cecos pilóricos, cuja função é aumentar o processo absorptivo e o tempo de permanência do alimento no intestino (GENTEN et al., 2009).

No epitélio intestinal de peixes além de células cilíndricas e células caliciformes, encontram-se os linfócitos, as células enteroendócrinas e as “rodlet cells” (CARDOSO, 2005; WILSON; CASTRO, 2011). Os enterócitos são células cilíndricas que constituem a maior população de células epiteliais que revestem o intestino sendo o único tipo celular envolvido no processo absorptivo (VAN DONGEN; VISSER; DAEMS; GALJAARD, 1976). O transporte de macromoléculas intactas através dos enterócitos é observado em diversos animais. Nos bovinos, este processo ocorre até as 48 horas de vida, quando então se dá o fechamento intestinal (BRAMBELL, 1958; BRANDTZAEG; KRAJC, 1995; LEECE; MORGAN, 1962). Em peixes, o mecanismo de transporte de macromoléculas pode permanecer funcional até o animal chegar à vida adulta, podendo variar entre as espécies e durante as diferentes fases da vida (STROBAND; VAN DER VEEN, 1981).

As células enteroendócrinas encontradas próximas da base da glândula gástrica secretam somatostatina, colecistoquinina, GIP e secretina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Nos peixes, estas células estão presentes ao longo de todo o epitélio intestinal, sendo identificadas pela presença no citoplasma das vesículas secretoras (WILSON; CASTRO, 2011). As células M são as células que respondem aos antígenos e participam da linha de defesa (SANTOS et al., 2007). A presença de leucócitos e macrófagos, entre as células epiteliais, é considerada como um sinal de que o segmento intestinal pode ter importância imunológica (BARBIERI; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, 2008).

Alguns autores sugerem que as “rodlet cells” podem estar envolvidas no transporte de água e eletólitos e outras funções similares a células da mucosa, como controle de pH, lubrificação, e reação a ectoparasitas na superfície epitelial. Possivelmente uma substância antibiótica secretada por estas células atenua infecção de parasitas (BANAN KHOJASTEH, 2012).

Considerando-se que a camada muscular está associada ao crescimento do trato gastrintestinal, Rodrigues et al. (2010) observaram em cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum* alimentados com dieta contendo 0, 10 e 20% de colostro bovino liofilizado, maior espessura da camada muscular na primeira porção do intestino médio, em relação aos peixes alimentados com dieta convencional.

Cavichiolo et al. (2004) verificaram que a morfologia do intestino de tilápia-do-nilo sofre variações conforme à fonte e nível de proteína na dieta, aumentando ou diminuindo assim a altura de suas pregas. Lundsteadt (2003), ao estudar o intestino anterior, médio e posterior de pintados *Pseudoplatystoma corruscans* verificou alterações morfológicas das diferentes porções do intestino em função da variação de proteína bruta da dieta. O mesmo foi observado para a camada muscular que acompanhou o padrão da mucosa, na porção posterior do intestino a espessura da camada muscular foi superior às demais.

2.6 Células caliciformes

Encontram-se na mucosa intestinal, entre as células absortivas, as células caliciformes, as quais são responsáveis pela produção de muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento intestinal (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). As células caliciformes possuem dois domínios: no domínio apical seu citosol possui grandes vesículas de muco que se deslocam em direção à membrana celular; no domínio basal está o retículo endoplasmático rugoso, e o aparelho de golgi. Em geral, o núcleo da célula caliciforme é basal e seu volume celular é ocupado por grandes e redondos grânulos de muco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Célula Caliciforme

Fonte: <http://www.arthurclipart.org/medical/humanybody/goblet%20cell.gif>

Quando o epitélio intestinal apresenta grande número de células caliciformes pode ser um indicativo de um processo de agressão e, em peixes, a presença destas células pode estar relacionada também às diferentes condições de alimentação e à proteção contra atividade bacteriana (HONORATO et al., 2011; KUPERMAN; KUZ'MINA, 1994; SANTOS et al., 2007).

As mucinas protegem o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos, que podem estar presentes na luz intestinal. São glicoproteínas, com cadeias polipeptídicas que possuem componentes orgânicos e inorgânicos, compostas por 75% de carboidratos e 25% de aminoácidos ligados através de ligações glicosídicas, (BANSIL et al., 1995; DEPLANCK; GASKINS, 2001; NELSON; COX, 2012). Suas cadeias oligossacarídicas podem ser terminadas com ácido siálico ou grupos sulfatos, de acordo com o pH (DEPLANCKE; GASKINS, 2001).

Elas diferem entre as espécies e ao longo do canal alimentar dos peixes (DÍAZ et al., 2008). Dependendo da composição de seus monossacarídeos, as mucinas são classificadas em neutras e ácidas, sendo ainda as ácidas classificadas em não-sulfatadas (sialomucinas) e sulfatadas (sulfomucinas) (DEPLANCKE; GASKINS, 2001).

A mucina neutra é o subtipo mais encontrado, até 80% do total de mucinas e compostas por glicoproteínas (GOLD et al., 1981; MYERS; FREDENBURG; GRIZZLE, 2008; SHIRAISHI et al., 2009). São encontradas no estômago e intestino, protegendo o epitélio contra microrganismos e, adicionalmente com a fosfatase alcalina, auxiliam na digestão e emulsificação do quimo (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; BANAN KHOJASTEH et al., 2009). A densidade destas mucinas pode diminuir a medida que as mucinas ácidas aumentam em direção ao cólon (SAKATA; VON ENGELHARDT, 1981).

As mucinas ácidas contribuem para a função protetora contra agentes patogênicos sendo resistentes a ação de bactérias glicosidases e proteases, além de atuarem como barreira física entre a mucosa e agentes químicos (ARELLANO et al., 2001; DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Estas mucinas possuem grande quantidade de ácido siálico, subdividindo-se em dois grupos: as sulfomucinas, que contém um grupo sulfatado ligado ao carboidrato; e as sialomucinas que apresentam porção glicosídica ligada ao ácido siálico (GOLD et al., 1981; MYERS; FREDENBURG; GRIZZLE, 2008; SHIRAISHI et al., 2009).

As sialomucinas, compostas por ácido siálico, atuam como proteção e lubrificação da mucosa (FILIPE et al., 1979). Em geral, as mucinas ácidas sulfatadas inibem a adesão bacteriana e a degradação das mucinas pelas proteases e são detectadas em peixes infectados por parasitas apresentando hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes (BOSI et al., 2005).

Ao longo do trato digestivo, as características histoquímicas de mucinas têm sido estudadas em diferentes espécies de peixes (FIERTAK; KILAISHI, 2002; MARCHETTI et al., 2006; MORRISON et al, 1999; ; NEHAUS et al, 2007; SCOOCO et al., 1997, 2001; SHIRAISHI et al., 2009). São facilmente observadas em cortes histológicos submetidos a reação histoquímica de PAS (ácido periódico de Schiff). Assim, consegue-se determinar a presença e localização destas células em diferentes regiões intestinais (CAO; WANG, 2009; BANAN KHOJASTEH et al., 2009; MARCHETTI et al., 2006; OSTASZEWSKA et al., 2011; PETRINEC et al., 2005; SALAMAT et al., 2011; TIBBETS et al., 1997). Em mamíferos, as células caliciformes aumentam a medida que se dirigem para a porção final do intestino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; MELLO et al., 2012).

Nos peixes, elas podem variar de acordo com a região do intestino, da espécie e da dieta do animal. As células caliciformes são encontradas em maiores

quantidades no intestino médio e posterior e em menor quantidade nos cecos pilóricos (CARDOSO, 2005). Nachi, Hernandez-Blasquez e Barbieri (1998) ao analisarem as porções iniciais, médias e finais de cada alça intestinal de curimatã *Prochilodus scrofa*, iliófago, observaram a maior presença de células caliciformes na porção final do segmento intestinal. Honorato et al. (2011) observaram em tilápias do Nilo, alimentadas com dietas contendo silagem de peixe, que a variação da secreção de células caliciformes, está relacionada ao tipo e níveis de proteína da dieta oferecida aos peixes, sugerindo que esta espécie pode adaptar seu sistema de secreção do epitélio intestinal para a proteção durante a absorção de proteínas.

Assim como o total de células caliciformes, as sialomucinas e sulfomucinas também podem ser encontradas de acordo com a região do intestino e espécie, conforme verificado por Fiertak e Kilarski (2002) em quatro espécies diferentes de ciprinídeos.

Referências

- ABREU, V.J.S.; CARDOSO, A.L.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; SINHORINI, I.; DAMY, S.B. Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvo*. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 191-198, 2003.
- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 16, n. 2, p. 511-521, 2001.
- BALDISSEROTTO, B.; VAL, A.L. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 62, n. 4B, p. 749-752, 2002.
- BANAN KHOJASTEH, S.M. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. **International Journal of Aquatic Science**, Urmia, v. 3, n. 2, p. 71-88, 2012.
- BANAN KHOJASTEH, S. SHEIKHZADEH, F., MOHAMMADNEJAD, D.; AZAMI, A. Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 6, n. 11, p. 1525-1531. 2009.
- BANSIL, R.; STANLEY, E.; LAMONT, T. Mucin biophysics. **Annual Review Physiology**, London, v. 57, p. 635-657, 1995

BARBIERI, R.L.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F.J. Análise ultra-estrutural da absorção intestinal de macromolécula protéica com o uso de peixe como modelo experimental. **Conscientiae Saúde Revista Científica**, São Paulo, v. 1, p. 21-30, 2008.

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

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

BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 123 p. Tese (Doutorado Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

BOSI, G.; SHINN, A.P.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PIRONI, F.; DEZFULI, B.S. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 703-711, 2005.

BRAMBELL, J.W.R. The passive immunity of the young mammal. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 33, n. 4, p. 488-531, 1958.

BRANDTZAEG, P.; KRAJCI, P. The enterocyte and immunoglobulin transport. In: AURICCHIOS, S.; FERGUSON, A.; TRONCONE, R. (Ed.). **Mucosal immunity and the gut epithelium**. Basel: Karger, 1995. v. 44, p. 1248-302.

CAO, X.J.; WANG, W.M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of Veterinay Medicine Anatomy Histology Embryology**, Berlin, v. 38, p. 254-261, 2009.

CARDOSO, E.W. **Morfologia e ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii richardson*, 1844 e sua relação com o hábito alimentar**. 2005. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CASTRO, N.; CAPOTE, J.; ÁLVAREZ, S.; ARGÜELLO, A. Effects of liophilized colostrum and different colostrum feeding regiments on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3650-3654, 2005.

CAVICHIOLO, F. Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: DIAS, M.T. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. cap. 23, p. 602-624.

CAVICHIOLO, F.; NATALI, M.R.M.; RIBEIRO, R.P.R.; CIOLA, A.L.; VARGAS, L.; MAEHANA, K.; CANCINO, M.E.C. Morfologia do segmento proximal do intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de proteína vegetal em fase adulta. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 7, p. 131-131, 2004. Apresentado na JORNADA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIPAR, 8., 2004, Umuarama.

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

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

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

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. Glycoconjugates in the mucosa of the tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study. **Acta Histoquímica**, Jena, v. 110, p. 76-85, 2008.

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

FIERTAK, A.; KILARSKI, W.M. Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. **Celular and Molecular Life Science**, Basel, v. 59, p. 1724-1733, 2002.

FILIPPE, M.I. Mucins and gastrointestinal malignancy: a new approach to the interpretation of biopsies. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 1, n. 3, p. 351-365. 1979.

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

FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; MAGRI, K.A. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 53, p. 201-216, 1991.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Enfield: Science Publ., 2009. 215 p.

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

GOLD, D.V.; DAN SHOCHAT, E; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin: evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 12, p. 6354-6358, 1981.

HONORATO, C.A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J.; MACHADO, M.R.F. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta contendo silagem de peixe. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 281-288, 2011.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 47, n. 4, p. 439-464, 1972.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 524 p.

KORKONEN, H.J. Health: promoting proteins and peptides colostrum and whey. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, Bo. **Bioactive proteins and peptide as a functional foods and nutraceuticals**. Ames: Wiley; Blackwell, 2010. p. 151-168.

KRUSE, P.E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Annales de Recherches Veterinaries**, Bletchley, v. 14, n.4, p. 349-353, 1983.

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

LEECE, J.G.; MORGAN, D.O. Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 78, p. 263-268, 1962.

LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Flutuação das variáveis séricas em cabras e estudo comparativo da absorção de anticorpos em cabritos recém-nascidos utilizando colostro bovino e caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 2211-2217, 2009.

LUNDSTEDT, L.M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólicos de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) arraçados com diferentes níveis de proteína e energia**. 2003. 140 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MACHADO, C.C. **Exigência protéica de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis***. 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MARCHETTI, L.; CAPACCHIETTI, M.; SABBITI, M.G.; ACCILI, D.; MATERAZZI, G.; MENGHI, G. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1808-1821, 2006.

MELLO, R.D.O.; SILVA, C.M.G.D.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.F.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A.R. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2012.

MOMMSEN, T.P. Review: paradigms of growth in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 129, n. 2/3, p. 207-219, 2001.

MORETTI, D.B.; KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; MACHADO-NETO, R. IgG absorption by Santa Ines lambs fed Holstein bovine colostrum or Santa Ines ovine colostrum. **Animal**, Cambridge, v. 4, p. 933, 2010.

MORRISON, C.M.; WRIGTH, JR. A study of histology of the digestive tract of the Nile Tilapia. **Journal of Fish Biology**, London, v. 54, p. 597-606, 1999.

MYERS, R.B.; FREDENBURG, J.L.; GRIZZLE, W.E. Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. chap. 11, p. 161-187.

NACHI, A.M.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F.J.; BARBIERI, R.L. Intestinal histology of a detritivorus (iliophagous) fish *Prochilodus scrofa* (characiformes, prochilodontidae). **Anales des Sciences Naturelles**, Paris, v. 2, p. 8-88, 1998.

NAKATAMI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger-princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2012. 1304 p.

NEUHAUS, H.; VAN DER MAREL, M.; CASPARI, N.; MEYER, W.; ENSS, M.L.; STEINHAGEN, D. Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. **Journal of Fish Biology**, London, v. 70, p. 1523-1534, 2007.

NORDI, W.M. **Efeito do fornecimento do colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos**. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NORDI, W.M., MORETTI, D.B., LIMA, A.L., PAULETTI, P., SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Intestinal histology of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v. 58, n. 5, p. 232-241, 2013.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; KWASEK, K.; VERRI, T.; KAMASZEWSKI, M.; SLIWINSKI, J.; NAPORA-RUTKOWSKI, L. Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the morphology of the liver and intestine of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) juveniles. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 1796-1806, 2011.

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

PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O.; DELGADO, E.F.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Growth performance and muscle protein, RNA and DNA content in juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) fed lyophilized bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 89-89, 2007.

PETRINEC, Z.; NEJEDLI, S.; KUZIR, S.; OPACAK, A. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and European catfish (*Silurus glanis* L.). **Veterinarski Arhiv**, Zabred, v. 75, n. 4, p. 317-327, 2005.

PENCHEV GEORGIEV, I. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagoria, v. 11, p. 3-12, 2008.

REECE, W.O. **Dukes-fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 954 p.

REIFEL, C.W.; TRAVILL, A.A. Gross morphology of the alimentary of the alimentary canal in teleostean species. **Anatomischer Anzeiger**, Deerfield Bielt, v. 144, p. 441-449, 1978.

RODRIGUES, A.P.O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; CYRINO, J.E.P.; DELGADO, E.F.; MACHADO-NETO, R. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 555-563, 2009.

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

ROTTA, M.A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: EMBRAPA, 2003. 49 p. (Documento, 53).

SALAMAT, N.; DARBEH, R.; MAJD, N.E.; SAFAHIEH, A.R. Histological aspects of gut associated lymphoid tissue in *Acanthopagrus latus*. **Global Veterinary**, Deira, v. 7, n. 4, p. 381-385, 2011.

SANTOS, C.M.; DUARTE, S.; SOUZA, T.G.L.; RIBEIRO, T.P. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrointestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 97, n. 4, p. 411-417, 2007.

- SHEP, L.J.; TUCKER, I.G.; YOUNG, G.; LEDGER, R.; BUTT, A.G. Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 59, p. 1-14, 1999.
- SHIRAISH, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, G.J.A. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados com *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2146-2153, 2009.
- STROBAND, H.W.J.; van der VEEN, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (VAL.). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 218, p. 149-56, 1981.
- TAKASHIMA, F.; HIBYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2nd ed. Tokyo: Kondansha; Stuttgart; New York: Fisher, 1995. 213 p.
- TEO, L.H.A. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lateolabrax niloticus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 42, p. 592-602, 1993.
- TIBBETTS, I.R. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhampus sclerolepis krefftii*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, p. 809-820, 1997.
- URBINATTI, E.C.; GONÇALVES, F.D.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria. Ed da UFSM, 2010. cap. 8, p. 205-244.
- VAN DONGEN, J.M.; VISSER, W.J.; DAEMS, W.; GALJAARD, H. The relation cell proliferation and ultrastructural development in rat intestinal epithelium. **Cell Tissue Research**, New York, v. 174, p. 183-199, 1976.
- WEINGARTNER, M.; ZANIBONI, E.F. E.Z. Biologia e cultivo do dourado. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria. Ed da UFSM, 2010. cap. 9, p. 245-282.
- WILSON, J.M.; CASTRO, L.F.C. Morphology diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: CROSSEL, M.; FARRELL, A. P.; BRANER, C.J. (Ed.). **Fish physiology: the multifunctional gut of fish**. London: Elsevier, 2011. p. 2-56.

3 EPITÉLIO INTESTINAL DE JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus* ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do colostro bovino liofilizado, utilizado como fonte parcial da dieta protéica, sobre as características histológicas do epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Os juvenis foram distribuídos num delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2 (18 peixes por tratamento em triplicata). Foram utilizadas dietas com três níveis de inclusão de CBL (0%, 10% e 20%) e dois períodos experimentais (30 e 60 dias), oferecidas duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Para o estudo histológico, o intestino foi dividido em três segmentos, S1, S2 e reto. Foram avaliadas a espessura da camada muscular; o volume parcial da mucosa absorptiva (Vv); o número das células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras e subtipos ácidas - sialomucinas e sufomucinas. Para a espessura da camada muscular, foi observado efeito de período em S1 e reto, com maiores valores encontrados aos 60 dias, e interação entre tratamento e período em S2, o grupo 20% CBL apresentou maior espessura da camada muscular aos 60 dias de experimento ($P<0,05$). A inclusão de 20% de colostro bovino influenciou o número de células caliciformes contendo os diferentes tipos de mucinas ($P<0,05$). Para Vv, efeito de período foi observado em S2 e reto, com maiores valores encontrados aos 60 dias ($P<0,05$). Considerando os aspectos avaliados no presente estudo, a presença do colostro bovino liofilizado na dieta influenciou, no período estudado, as características histológicas entéricas de juvenis de pacu.

Palavras-chave: Proteína; Colostro bovino liofilizado; Onívoro; Células caliciformes; Intestino

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized bovine colostrum (LBC), used as partial source of protein in the diet, on the histological characteristics of the intestinal epithelium of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Juveniles were distributed in a completely randomized design in a factorial scheme 3x2 (18 fish per treatment in triplicate). Three diets were used with different levels of LBC inclusion (0%, 10% and 20%) and two experimental periods (30 and 60 days) offered twice daily until apparent satiation. For the histological study, the intestine was divided into three segments, S1, S2 and rectum. The muscle layer thickness; the mucosal absorptive volume (Vv); the number of goblet cells containing acidic and neutral mucins and the acidic subtypes – sialomucin and sulphomucin were evaluated. For the muscle layer thickness effect of period was observed in S1 and rectum, with higher values found at 60 experimental days ($P<0.05$). The inclusion of 20% of bovine colostrum influenced the number of goblet cells containing different types of mucins ($P<0.05$). For Vv, effect of period was observed in S2 and rectum, with higher values found at 60 days ($P<0.05$). Considering the aspects studied, the presence of lyophilized bovine colostrum in the diet influenced, in the period studied, the enteric histological characteristics.

Keywords: Protein; Lyophilized bovine colostrum; Omnivorous; Goblet cells; Intestine

3.1 Introdução

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) representante da superordem Ostariophysi, é um dos peixes de maior valor comercial na pesca e aquicultura brasileira (URBINATTI et al., 2010). Esta espécie pertencente à ordem Characiformes, Família Characidae, Subfamília Serrasalminae, gênero *Piaractus*, espécie *mesopotamicus*. De hábito alimentar onívoro, é um dos peixes mais estudados na região sul, sudeste e centro-oeste do Brasil e também recebe os nomes de caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu (URBINATTI et al., 2010).

As proteínas são de fundamentais na nutrição, pois estão presentes em todo o organismo animal exercendo tanto funções estruturais quanto funcionais.

O colostro bovino, rica fonte proteica, pode ser uma alternativa a ser considerada para a nutrição de peixes. Esta secreção láctea além de conter lisozima, lactoferrina, transferrina, imunoglobulinas e fatores bioativos, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), é considerada um alimento nutracêutico (PANDEY et al., 2011). O colostro bovino na forma liofilizada tem suas características originais preservadas, e o fornecimento desta secreção láctea para outras espécies é uma prática que pode ser viável em regiões de bacias leiteiras do estado (CASTRO et al., 2005; NORDI et al., 2013; MORETTI et al., 2013; PAULETTI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010).

As células caliciformes encontradas na mucosa intestinal são responsáveis pela produção de muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento intestinal (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Este muco secretado é constituído por mucinas que podem ser ácidas, ou neutras, podendo ainda as mucinas ácidas serem diferenciadas em sialomucinas e sulfomucinas (DÍAZ et al., 2008). As mucinas ácidas contribuem para a função protetora contra agentes patogênicos além de atuar como barreira física entre a mucosa e agentes químicos (ARELLANO et al., 2001). As mesmas possuem grande quantidade de ácido siálico (GOLD et al., 1981; MYERS; FREDENBURG; GRIZZLE, 2008; SHIRAISHI et al., 2009). As mucinas neutras, por sua vez, são encontradas no estômago e intestino, protegendo o epitélio através do muco contra microrganismo e adicionalmente com fosfatase alcalina auxiliam na digestão e emulsificação do quimo (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; BANAN KHOJASTEH et al., 2009).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do colostro bovino liofilizado fornecido como fonte parcial de proteína na ração, sobre as características

histológicas do epitélio intestinal com especial enfoque na distribuição de células caliciformes de juvenis de pacu.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas utilizando o colostro bovino liofilizada (CBL) (Tabela 1).

Tabela 1 - Bromatologia do colostro bovino liofilizado

	Matéria Seca	Matéria Original
Matéria Seca (%)	100	94,13
Protéina Bruta (%)	67,89	72,12
Extrato etéreo (%)	8,21	8,72
Energia bruta (Kcal/g)	5.229,00	5.555,08

Três dietas experimentais isoproteicas e isoenergéticas foram formuladas com dois níveis de inclusão, 10 e 20%, de colostro e uma dieta controle sem adição de colostro. Para o cálculo das dietas, utilizou-se o programa de formulação de rações SuperCrac (Tabela 2).

As dietas foram fornecidas na forma de peletes e sua composição bromatológica também foi avaliada.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais dos juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Ingredientes	Porcentagem na dieta ^a		
	0%CBL	10% CBL	20% CBL
Colostro (67,9% PB)	-	10	20
Farelo de soja (45% PB)	26,5	7,67	-
Farelo de trigo	23,8	31,18	31,18
Farinha de vísceras	20	20	13,13
Quirera de arroz	18,8	19,82	20
Farinha de peixe (55% PB)	5	5	5
Óleo de peixe	4,62	4	4,57
DL-Metionina	0,24	0,34	0,47
L-Lisina HCL	-	0,6	1,15
Premix ⁽¹⁾	1	1	1,05
BHT	0,2	0,2	0,2
Celulose	-	0,34	-
Calcáreo	-	-	1,47
Milho Grão	-	-	0,93
Composição	0%CBL	10% CBL	20% CBL
Proteína Bruta (%)	32,33	32,5	32,5
Energia Bruta (Kcal kg ⁻¹)	4,1	4,1	4,1
Fibra Bruta (%)	4	3,87	4
Extrato etéreo (%)	8,54	7,91	7,62

⁽¹⁾ Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo, suplementação de premix vitamínico mineral por kg de ração: 2.500.000 UI de vitamina A; 600.000 UI de vitamina D3; 37.500 UI de vitamina E; 3.750 mg vitamina K3; 50.000 mg vitamina C; 4.000 mg vitamina B1; 4.000 mg Vitamina B2; 4.000 mg Vitamina B6; 4.000 mcg Vitamina B12; 12.000 mg de pantetonato de cálcio; 15 mg biotina; 1.250 mg ácido fólico; 22.500 mg niacina; 2.500 mg de cobre; 12.500 mg de zinco; 375 mg de iodo; 87,5 mg de selênio; 125 mg de cobalto; 12.500 mg de manganês; 15.000 mg de ferro; 15.000 mg de B.H.T. ^a0%CBL- ração contendo 0% de Colostro Bovino Liofilizado, 10%CBL – ração contendo 10% de Colostro Bovino Liofilizado, 20%CBL – ração contendo 20% de Colostro Bovino Liofilizado

3.2.2 Condição experimental

Juvenis de pacu ($8,4 \pm 0,31$ g; $7,7 \pm 0,09$ cm) foram selecionados de acordo com a higidez e homogeneidade de porte e distribuídos ao acaso em um esquema fatorial 3x2 (18 juvenis por tratamento, considerando-se triplicatas para cada tratamento), correspondendo às dietas experimentais (0%, 10 e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado - CBL) e às datas de abate (30 e 60 dias após o início do experimento). Inicialmente, os pacus passaram por um período de adaptação às instalações e à rotina experimental e, a seguir, foram condicionados por sete dias a aceitar ração peletizada. Cada lote foi pesado e o comprimento de nove juvenis medido para as análises de desempenho. Os seguintes parâmetros de desempenho foram considerados individualmente:

- Ganho de peso (%)

$$GP = \frac{Pf (g) - Pi (g)}{Pi (g)} \times 100$$

- Taxa de crescimento específico (% crescimento específico dia⁻¹)

$$TCE = \frac{100 \times (\ln Pf - \ln Pi)}{\text{dias}}$$

- Conversão alimentar aparente (kg kg⁻¹)

$$CAA = \frac{\text{Consumo}}{GP}$$

- Índice de sobrevivência (%)

$$IS = \frac{\text{peixes inicial}}{\text{peixes final}} \times 100$$

Em que: Pi é o peso inicial; Pf é o peso final; ln logaritmo natural.

Os peixes permaneceram em tanques de plástico (300 litros) dotados de fluxo de água e aeração contínua em sistema de recirculação e em condições controladas de temperatura e luminosidade ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas). Durante o período experimental, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia até aparente saciedade. Os parâmetros de qualidade da água durante os períodos mantiveram-se adequados: pH ($7,09 \pm 0,3$); temperatura ($26 \pm 1,5^\circ\text{C}$); amônia ($0,02 \pm 0,014$ ppm) e oxigênio dissolvido ($5,81 \pm 0,09$ mg/L) e dentro dos limites aceitáveis para o desenvolvimento dos juvenis. Após os períodos experimentais, os peixes foram novamente pesados e o comprimento de nove juvenis medidos.

3.2.3 Coleta das amostras intestinais

Nas datas de abate, aos 30 e 60 dias, os juvenis foram submetidos à restrição alimentar por um período de 24 horas e sete peixes de cada tratamento foram aleatoriamente selecionados. Em seguida, anestesiados com benzocaína ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e individualmente pesados e medido o comprimento final. A região abdominal foi aberta e o trato gastrintestinal coletado. A porção do intestino médio foi removida e suas alças desfeitas. O intestino foi dividido conforme Bértin (1958), em intestino médio (da válvula pilórica até a válvula íleo-retal) e reto (da válvula íleo-retal até o ânus), subdividindo-se o primeiro em dois segmentos, um cranial e outro intermediário que corresponderam às regiões S1 e S2, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Segmento intestinal de juvenis de pacu
Piaractus mesopotamicus

3.2.4 Microscopia óptica

Os segmentos intestinais foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2 por 2 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram repicadas em amostras de 3x3 mm e armazenadas em solução de paraformaldeído 4% em PBS a 3°C overnight.

No dia seguinte, o tecido foi lavado com PBS 0,1M, pH 7,2, desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), pré-infiltrado em etanol e resina (3:1; 1:1) e, em seguida, infiltrado com 100% de resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.).

Os tecidos armazenados em resina plástica foram imersos em histomoldes com resina adicionada de endurecedor e mantidos em estado de anaerobiose a 3°C durante uma semana. Os blocos obtidos foram limados, fixados em suportes de madeira e seccionados por navalha de aço em um micrótomo Leica RM 2125 RT, obtendo-se dez cortes de 5 µm de espessura não sequenciais (NORDI et al., 2013). Foram preparadas duas lâminas para cada segmento intestinal, sendo que uma lâmina foi utilizada para a diferenciação de células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras e para análises histológicas e morfométricas e outra lâmina para a diferenciação de células caliciformes contendo sialomucinas e sulfomucinas.

3.2.5 Número de células caliciformes – Histoquímica

A diferenciação e quantificação de células caliciformes, que secretam mucinas ácidas ou neutras, foi realizada em 15 campos distintos. A primeira lâmina foi corada com Alcian Blue (AB, pH 2,5) e ácido periódico de Schiff (pH 2,5), métodos que distinguem mucinas ácidas de azul e neutras de vermelho, respectivamente (SPICER, 1960). Após imersão em solução de Alcian Blue (AB, pH 2,5) por 30 minutos, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e oxidados em ácido periódico por 10 minutos. Na sequência, os cortes foram lavados novamente em água corrente por 5 minutos, imersos em reagente de Schiff por 10 minutos e novamente lavados em água corrente por 10 minutos. O número de células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras foi contado e o número de total de células caliciformes foi obtido pela soma do número de células caliciformes contendo mucinas neutras e ácidas.

A segunda lâmina foi corada por 30 minutos com Alcian Blue (pH 1,0), sendo apenas as mucinas fortemente sulfatadas foram coradas e quantificadas. Em seguida, a lâmina foi novamente corada por 30 minutos com Alcian Blue (pH 2,5), o qual corou as demais células caliciformes contendo mucinas ácidas (LEV; SPICER, 1964). As células caliciformes coradas foram novamente quantificadas e o número de células caliciformes contendo sialomucinas foi obtido pela diferença entre o número total de células caliciformes ácidas e o número de células caliciformes contendo sulfomucinas (KLESSEN et al., 2003; MARCHETTI et al., 2006).

3.2.6 Histologia do epitélio intestinal

A análise histológica e a obtenção de imagens foi realizada utilizando-se um microscópio óptico acoplado ao sistema de análise de imagens Bel Micro (Bel Engineering srl-Italy). A espessura da camada muscular foi medida nos três segmentos intestinais em 10 campos em um aumento constante de 100X.

3.2.7 Estereologia

Para complementar as informações obtidas com as análises histológicas de medidas lineares utilizou-se a análise estereológica dos segmentos intestinais, técnica usada para quantificar estruturas tridimensionais (BADDELEY et al., 1986). Para utilizar este método, os cortes devem ser isotrópicos, entretanto, a mucosa do intestino apresenta condição anisotrópica. Para isto Baddeley et al. (1986)

propuseram um método com a utilização de um grid que considera esta condição anisotrópica. Neste método, o plano horizontal é o limite entre a mucosa e a submucosa.

A obtenção de imagens foi realizada utilizando-se um microscópio óptico acoplado ao sistema de análise de imagens Bel Micro (Bel Engineering srl-Italy). A partir das imagens foram avaliados 15 campos por segmento intestinal em um aumento de 100X.

A análise estereológica foi utilizada para a determinação do volume parcial (V_v) ocupado pela mucosa do intestino. Nesta técnica, um sistema teste do tipo cicloide, com 35 arcos cicloides e 70 pontos teste, é sobreposto sobre cada imagem (Figura 5). O volume parcial da mucosa é expresso em porcentagem e obtido pelo número de pontos teste sobre a superfície da mucosa e o número total de pontos na grade, utilizando a seguinte fórmula:

$$VV = \frac{\sum P(\text{MUCOSA})}{\sum P(\text{VOLUME REFERENCIAL})} \cdot 100$$

Sendo:

$\sum P(\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste caindo sobre a camada específica;

$\sum P(\text{volume referencial})$ = número total de pontos na grade.

Figura 5 - Sistema teste de arcos cicloides
Fonte: Baddeley et al. (1986)

3.2.8 Análise estatística

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, onde as variáveis de desempenho e histológicas foram analisadas em um esquema fatorial 3x2 (sete peixes por tratamento, considerando-se triplicatas para cada tratamento) desbalanceado, correspondendo às três dietas e as duas datas de abate. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, através do procedimento PROC MIXED do programa estatístico SAS. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey. Para todas as análises foi utilizada a probabilidade de 5%.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Parâmetros zootécnicos

Com relação aos parâmetros de desempenho, foi observado efeito de período para as variáveis CF, PF, CR e TCE, ($P < 0,05$), Tabela 3. Enquanto, os valores de CF, PF e CP foram maiores aos 60 dias, a TCE foi maior aos 30 dias ($P < 0,05$). Para o GP e CA, foi observado interação entre tratamento e período ($P < 0,05$), Figura 6.

Resultados positivos também foram encontrados por Pauletti et al. (2010), ao adicionarem 0, 5, 10, 15 e 20% de colostro bovino liofilizado na dieta para cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum*, peixe de hábito alimentar carnívoro, verificaram influencia positiva do colostro no GP, TCE e CA, quando fornecido por 30 dias aos peixes.

Neste trabalho, os juvenis de pacu que receberam dietas contendo CBL apresentaram um desempenho semelhante dos juvenis que receberam dieta com 0% de CBL, formulada para atender todas as exigências nutricionais dos peixes. Assim, sugere-se que as dietas com inclusão de colostro bovino liofilizado foram adequadas nutricionalmente para os juvenis de pacu apresentando resultados positivos como alternativa de manejo.

Tabela 3 - Desempenho (médias $\pm$ erro padrão) de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado aos 30 e 60 dias

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
		CI					
30 dias	7,55 ± 0,05	7,63 ± 0,12	7,80 ± 0,11	7,67 ± 0,06	NS	NS	NS
60 dias	7,70 ± 0,40	7,90 ± 0,05	7,86 ± 0,23	7,83 ± 0,11			
Média	7,62 ± 0,17	7,76 ± 0,08	7,83 ± 0,11				
		CF					
30 dias	13,00 ± 0,10	13,16 ± 0,06	13,30 ± 0,20	13,17 ± 0,08	NS	**	NS
60 dias	16,50 ± 0,60	16,80 ± 0,20	16,56 ± 0,60	16,63 ± 0,24			
Média	14,75 ± 1,04	14,98 ± 0,81	14,93 ± 0,78				
		PI					
30 dias	8,05 ± 0,15	8,60 ± 0,43	8,06 ± 0,57	8,26 ± 0,25	NS	NS	NS
60 dias	8,15 ± 0,25	8,86 ± 0,26	8,73 ± 0,72	8,63 ± 0,27			
Média	8,10 ± 0,12	8,73 ± 0,23	8,40 ± 0,43				
		PF					
30 dias	51,09 ± 3,82	53,99 ± 1,26	53,15 ± 2,95	52,95 ± 1,34	NS	**	NS
60 dias	110,60 ± 11,70	101,40 ± 4,25	115,33 ± 14,14	108,92 ± 5,79			
Média	80,48 ± 17,89	77,69 ± 10,78	84,24 ± 15,33				
		GP					
30 dias	43,05 ± 3,65 Ba	45,40 ± 1,10Ba	45,06 ± 2,39 Ba	44,68 ± 1,16	*	**	*
60 dias	102,40 ± 11,50Aab	92,46 ± 4,03Ab	119,70 ± 5,40Aa	103,08 ± 5,58			
Média	72,72 ± 17,82	68,93 ± 10,68	74,92 ± 18,40				
		CR					
30 dias	41,35 ± 1,85	41,83 ± 1,15	45,36 ± 1,41	43,03 ± 0,97	NS	**	NS
60 dias	114,00 ± 7,80	118,06 ± 7,65	119,06 ± 11,51	117,42 ± 4,81			
Média	77,67 ± 21,22	79,95 ± 17,39	82,21 ± 17,27				
		CA					
30 dias	0,96 ± 0,03 Aa	0,92 ± 0,00Ba	1,00 ± 0,03Aa	0,96 ± 0,01	*	**	*
60 dias	1,12 ± 0,05Aa	1,27 ± 0,06Aa	1,12 ± 0,03Aa	1,18 ± 0,03			
Média	1,04 ± 0,05	1,09 ± 0,08	1,06 ± 0,03				
		TCE					
30 dias	4,61 ± 0,13	4,60 ± 0,11	4,71 ± 0,03	4,64 ± 0,04	NS	**	NS
60 dias	3,71 ± 0,11	3,47 ± 0,02	3,67 ± 0,06	3,61 ± 0,05			
Média	4,16 ± 0,27	4,03 ± 0,25	4,19 ± 0,23				

**P<0,0001; *P<0,05; NS= Não Significativo; (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a,b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; Comprimento inicial (CI), Comprimento Final (CF), Peso Inicial (PI), Peso Final (PF), Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar (CA), Taxa de Crescimento Específico (TCE), T- Efeito do tratamento, P- Efeito do período, T XP- Interação entre tratamento e período

Figura 6 - Parâmetros de desempenho de juvenis *Piaractus mesopotamicus*
Ganho de Peso (A); Conversão Alimentar (B).

Os resultados de índice de sobrevivência dos juvenis de pacu são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Índice de sobrevivência dos pacus
Piaractus mesopotamicus

Dias	Níveis de CBL	Sobrevivência (%)
30	0%	92
	10%	100
	20%	93
60	0%	100
	10%	96
	20%	98

3.3.2 Histologia do epitélio intestinal de juvenis de pacu

Neste trabalho, foi identificado que a parede intestinal dos juvenis foi composta pelas camadas mucosa, submucosa, camada muscular e serosa. Na mucosa, o tecido epitelial do tipo simples apresentou células caliciformes entre os enterócitos. Na submucosa, foram observados vasos sanguíneos no tecido

conjuntivo frouxo. A camada muscular, constituída por uma camada circular interna e longitudinal externa de músculo liso, estava recoberta por uma camada serosa (Figura 7). Assim, o epitélio intestinal do pacu é semelhante ao encontrado em vertebrados e a outras espécies de teleósteos (CAO; WANG, 2009; CARDOSO, 2005; DELASHOUB et al., 2010; HERNANDEZ et al., 2009; BANAN KHOJASTEH et al., 2009; MAKINO, 2010; RODRIGUES et al., 2009; SALAMAT et al., 2011).

Figura 7 – Epitélio intestinal dos segmentos S1 (A); S2 (B) e reto (C) de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*. Aumento de 100x. Barra= 100 μm

Com relação à espessura da camada muscular, efeito de período foi observado nos segmentos S1 e reto e, os valores aos 60 dias foram maiores em relação aos 30 dias. No segmento S2, houve interação entre o tratamento e período ($P < 0,05$) (Tabela 5). Os peixes que ingeriram dieta com inclusão de 20% de CBL apresentaram maior espessura da camada muscular aos 60 dias em relação aos 30 dias, enquanto que nos peixes que receberam dieta com 0 e 10% de CBL, a espessura da camada muscular foi igual aos 30 e 60 dias (Figura 8). Entretanto, não foi observada diferença entre os tratamentos aos 30 e 60 dias. Correlações foram

observadas entre S1 e S2 com $r = 0,76$; S1 e reto com $r = 0,64$, e S2 e reto com $r = 0,62$.

Figura 8 - Espessura da camada muscular (ECM) de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* no segmento S2

A espessura da camada muscular em peixes tem sido relacionada com o segmento intestinal, espécie, hábito alimentar e concentração de proteína na dieta (CAO; WANG, 2009; CARDOSO, 2005; MAKINO, 2010). Rodrigues et al. (2010) verificaram que cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum* alimentadas com 0, 10 e 20% de colostro bovino liofilizado, apresentaram maior espessura da camada muscular na primeira porção do intestino médio, para os peixes que receberam CBL em relação aos alimentados com dieta convencional.

Neste trabalho, não foram observadas diferenças entre os tratamentos indicando que a possível presença de moléculas bioativas no colostro, como o IGF-I, não determinou alterações na camada muscular dos juvenis de pacu.

Tabela 5 – Espessura da camada muscular (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
		S1 (µm)					
30 dias	54,87 ± 1,49	61,61 ± 4,89	48,55 ± 5,27	55,03 ± 3,19	NS	*	NS
60 dias	84,28 ± 1,11	90,03 ± 6,57	102,56 ± 9,31	93,29 ± 4,69			
Média	69,58 ± 8,52	75,82 ± 7,33	75,55 ± 12,99				
		S2 (µm)					
30 dias	78,55 ± 11,82 Aa	83,26 ± 9,23 Aa	58,66 ± 8,82 Ba	72,86 ± 6,34	NS	*	*
60 dias	92,65 ± 11,35 Aa	91,97 ± 8,52 Aa	135,66 ± 2,71 Aa	104,65 ± 8,99			
Média	85,60 ± 7,83	87,61 ± 5,94	89,46 ± 19,48				
		Reto (µm)					
30 dias	94,22 ± 4,61	84,95 ± 17,45	99,82 ± 8,69	93,97 ± 5,71	NS	*	NS
60 dias	99,65 ± 13,05	109,36 ± 2,77	118,64 ± 3,63	110,41 ± 4,01			
Média	96,93 ± 5,86	99,59 ± 8,27	109,23 ± 5,95				

* $P < 0,05$; NS=Não Significativo ($P < 0,05$); (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a, b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

3.3.3 Células caliciformes

Figura 9 – Células caliciformes de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* coradas com PAS. Seta branca: mucinas ácidas coradas em azul; seta preta: mucinas neutras coradas em rosa. Barra: 50 μm

Em relação a mucinas neutras (Tabela 6, Figura 9, Figura 10 e Figura 11), foi observada interação entre o tratamento e período ($P < 0,05$) nos segmentos S1 e reto e, enquanto no segmento S2, observou-se apenas efeito de tratamento ($P < 0,05$). Na região S1, a adição de 20% de CBL proporcionou o aumento da densidade de mucinas neutras aos 60 dias, enquanto nos grupos 0 e 10% de CBL, a densidade foi

a mesma aos 30 e 60 dias. Na região S2, a densidade de células caliciformes neutras foi maior no grupo que recebeu 20% de CBL, em relação ao grupo 10% de CBL. No reto, a adição de 0 e 20% de CBL não influenciou a densidade de mucinas neutras entre 30 e 60 dias, entretanto para o grupo que recebeu 10% de CBL houve diminuição na produção de mucinas aos 60 dias em relação aos 30 dias.

Figura 10 - Células caliciformes ácidas e neutras de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S1 (A), S2 (B) e reto (C). Aumento de 100x. Barra = 100 μ m

Na literatura encontramos registros que as mucinas neutras protegem o epitélio através do muco contra microrganismo e, adicionalmente com a fosfatase alcalina auxiliam na digestão e emulsificação do quimo (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; BANAN KHOJASTEH et al., 2009). No presente estudo, a inclusão de 20% de CBL resultou em maior presença de células caliciformes neutras nos segmentos intestinais, especialmente após 60 dias de experimento, podendo estar relacionado com o desenvolvimento do processo digestivo e proteção contra microrganismos.

Tabela 6 - Células caliciformes neutras (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
S1							
30 dias	66,87 ± 2,41 Aa	44,75± 2,89 Aa	48,90 ± 7,07 Ba	52,83 ± 4,20	NS	*	*
60 dias	76,99 ± 14,61 Ab	83,86 ± 18,49 Ab	145,95 ± 14,47 Aa	105,42 ± 14,43			
Média	71,93 ± 6,71	64,30 ± 12,10	97,42 ± 22,86				
S2							
30 dias	94,30 ± 4,94	61,15 ± 12,41	105,01 ± 19,15	85,89 ± 10,56	*	NS	NS
60 dias	94,71 ± 7,11	89,72 ± 13,39	124,97 ± 16,49	104,19 ± 9,36			
Média	94,51 ± 3,53ab	75,44 ± 10,36 b	114,99 ± 12,15 a				
Reto							
30 dias	144,44 ± 11,85 Aa	190,85 ± 17,16Aa	158,40 ± 14,11Aa	167,08 ± 10,51	NS	*	*
60 dias	104,09 ± 26,27Aa	95,15 ± 6,67Ba	147,59 ± 13,18Aa	117,05 ± 11,38			
Média	124,26 ± 16,55	143,00 ± 22,93	153,00 ± 8,96				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a, b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Figura 11 - Mucinas neutras de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S1(A) e reto (B)

Em relação às mucinas ácidas, houve interação entre o tratamento e período em todos os segmentos intestinais (P<0,05), (Tabela 7). Observou-se correlação apenas entre os segmentos S1 e S2 com $r = 0,89$. Nestes segmentos, S1 e S2, para os juvenis que receberam 20% de CBL, houve aumento da síntese de mucinas ácidas aos 60 dias, enquanto que nos que receberam 0 e 10% de CBL, a densidade de mucinas ácidas foi igual aos 30 e 60 dias. No reto, o comportamento foi diferente,

a densidade de mucinas ácidas se manteve nos juvenis que receberam 20% de CBL aos 30 e 60 dias, enquanto nos juvenis que receberam 0 e 10% de CBL, houve diminuição da densidade de mucinas ácidas aos 60 dias (Figura 12). Observou-se correlação positiva entre a síntese de mucinas ácidas e neutras no S1, S2 e reto, com valores 0,92, 0,77 e 0,70, respectivamente.

Segundo Arellano et al. (2001), as mucinas ácidas contribuem para a função protetora contra agentes patogênicos, além de atuar como barreira física entre a mucosa e agentes químicos. No presente trabalho, a dieta com 20% de inclusão de CBL determinou maior presença de células caliciformes ácidas nos segmentos S1 e S2, uma condição que pode estar relacionada a uma reação de proteção a um possível desafio à presença de colostro bovino liofilizado na dieta e consequentemente no trato entérico. Entretanto, esta maior síntese não determinou alterações no desempenho e, consequentemente crescimentos dos juvenis.

Figura 12 - Mucinas ácidas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S1 (A); S2 (B) e Reto (C).

Tabela 7 - Células caliciformes ácidas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
S1							
30 dias	28,81 ± 1,64	21,87 ± 4,90	20,11 ± 2,02	22,94 ± 2,19	*	NS	NS
60 dias	28,22 ± 6,14	8,66 ± 1,94	22,59 ± 5,82	18,77 ± 3,85			
Média	28,51 ± 2,60 a	15,26 ± 3,78 b	21,35 ± 2,81 ab				
S2							
30 dias	13,20 ± 3,41Aa	12,43 ± 2,76Aa	15,68 ± 1,87Ba	13,84 ± 1,38	*	*	*
60 dias	18,15 ± 3,13Ab	17,57 ± 0,95Ab	34,54 ± 2,49Aa	22,58 ± 3,22			
Média	15,67 ± 2,36	15,00 ± 1,74	23,22 ± 4,79				
Reto							
30 dias	28,44 ± 2,51Aa	31,99 ± 4,52Aa	32,00 ± 4,81Aa	31,10 ± 2,28	*	*	*
60 dias	17,39 ± 3,10Ab	16,36 ± 2,25Ab	36,70 ± 3,41Aa	24,24 ± 3,93			
Média	22,91 ± 3,58	24,18 ± 4,16	34,35 ± 2,84				

**P<0,0001; *P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); (A,B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a,b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP= interação entre tratamento e período

Considerando o número total de células caliciformes, houve interação entre o tratamento e período em todos os segmentos intestinais (P<0,05), Tabela 8. Observou-se correlação entre S1 e S2 com r=0,85.

No segmento S1, os juvenis que receberam 10 e 20% de CBL aumentaram o número de células caliciformes totais contendo mucinas ácidas e neutras aos 60 dias, em relação aos 30 dias, enquanto nos juvenis que receberam 0% de CBL, os valores foram iguais aos 30 e 60 dias. No segmento S2, os juvenis que receberam 20% de CBL aumentaram o número de células caliciformes totais aos 60 dias, em relação aos 30 dias, enquanto nos juvenis que receberam 0% e 10% de CBL os valores foram iguais aos 30 e 60 dias. No reto, os juvenis que receberam 10% de CBL, diminuíram o número de células caliciformes totais aos 60 dias, em relação aos 30 dias, enquanto os juvenis que receberam 0% e 10% de CBL, os valores foram iguais aos 30 e 60 dias (Figura 13).

Tabela 8 – Total de células caliciformes (médias $\pm$ erro padrão) no intestino de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
		S1					
30 dias	226,23 ± 20,53 Aa	169,02 ± 7,60 Ba	179,75 ± 7,77 Ba	187,34 ± 10,14	*	*	*
60 dias	240,02 ± 8,82 Ab	292,26 ± 24,92 Ab	463,69 ± 21,47 Aa	343,48 ± 37,62			
Média	233,13 ± 9,95	230,64 ± 29,91	321,72 ± 64,30				
		S2					
30 dias	272,93 ± 5,93 Aa	187,81 ± 16,37Ab	255,16 ± 17,97 Ba	234,35 ± 16,03	*	*	*
60 dias	293,52 ± 13,10 Ab	243,06 ± 15,52 Ab	415,07 ± 6,27 Aa	320,18 ± 29,36			
Média	283,23 ± 8,35	215,44 ± 15,95	335,11 ± 36,75				
		Reto					
30 dias	388,89 ± 18,33Aa	447,08 ± 16,79Aa	347,86 ± 11,35Ab	395,32 ± 17,93	NS	*	*
60 dias	305,76 ± 15,66Ab	267,64 ± 13,97Bb	405,83 ± 21,26Aa	318,01± 24,83			
Média	347,32 ± 25,93	357,36 ± 41,29	371,05 ± 16,89				

*P<0,05;**P<0,0001; NS=Não Significativo (P<0,05); (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a, b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Independente do tipo de mucina, a inclusão de 20% de CBL influenciou positivamente a síntese de células caliciformes em todos os segmentos, sugerindo assim uma maior proteção dos juvenis e conseqüentemente melhor resposta ao meio ambiente.

Figura 13 - Total de mucinas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S1 (A), S2 (B) e reto (C).

Foi observado efeito de tratamento para o número de sialomucinas em S1 e interação entre o tratamento e período, em S2 e reto ($P < 0,05$), Tabela 9. No segmento S1 o tratamento 0% de CBL apresentou maior densidade de sialomucinas que em 10% de CBL. No S2 o tratamento 20% de CBL aumentou a produção de sialomucinas aos 60 dias, enquanto que 0 e 10% de CBL mantiveram os níveis aos 60 dias. No reto, 0 e 20% de CBL mantiveram a densidade de sialomucinas aos 30 e

60 dias, enquanto nas dietas com 10% de CBL diminuiu a síntese de sialomucinas aos 60 dias (Figura 14).

Tabela 9 – Sialomucinas (médias $\pm$ erro padrão) no epitélio intestinal de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
		S1					
30 dias	28,81 ± 1,64	21,87 ± 4,90	20,11 ± 2,02	22,94 ± 2,19	*	NS	NS
60 dias	28,22 ± 6,14	8,66 ± 1,94	22,59 ± 5,82	18,77 ± 3,85			
Média	28,51 ± 2,60 a	15,26 ± 3,78 b	21,35 ± 2,81 ab				
		S2					
30 dias	13,20 ± 3,41Aa	12,43 ± 2,76Aa	15,68 ± 1,87Ba	13,84 ± 1,38	*	*	*
60 dias	18,15 ± 3,13Ab	17,57 ± 0,95Ab	34,54 ± 2,49Aa	22,58 ± 3,22			
Média	15,67 ± 2,36	15,00 ± 1,74	23,22 ± 4,79				
		Reto					
30 dias	28,44 ± 2,51Aa	31,99 ± 4,52Aa	32,00 ± 4,81Aa	31,10 ± 2,28	*	*	*
60 dias	17,39 ± 3,10Ab	16,36 ± 2,25Ab	36,70 ± 3,41Aa	24,24 ± 3,93			
Média	22,91 ± 3,58	24,18 ± 4,16	34,35 ± 2,84				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a,b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, Marchetti et al, (2006) verificaram que nas regiões proximal e distal do intestino as células caliciformes apresentaram sialomucinas. Os autores sugerem que o ácido siálico, desempenha funções de proteção e lubrificação da mucosa. Os resultados no presente trabalho revelam que com o tratamento 20% de CBL pode ter determinado uma elevação da proteção e lubrificação da mucosa.

Figura 14 - Sialomucinas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S2 (A) e reto (B)

Em relação às sulfomucinas, houve interação entre o tratamento e período, nos segmentos S1 e S2 ($P < 0,05$), Tabela 10. Para estes dois segmentos, o tratamento 20% de CBL aumentou a síntese de sulfomucinas aos 60 dias, enquanto que para 0 e 10% de CBL, manteve-se praticamente inalterado o número de sulfomucinas. Entretanto, no segmento S1, o número de sulfomucinas no grupo 20% de CBL foi menor que os grupos 0 e 10% de CBL aos 30 dias (Figura 15).

Tabela 10 – Sulfomucinas (médias $\pm$ erro padrão) no epitélio intestinal de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
		S1					
30 dias	151,58 ± 21,35Aa	112,90 ± 4,95Aab	73,60 ± 11,30Bb	107,83 ± 12,84	NS	NS	*
60 dias	128,75 ± 7,94Aa	131,34 ± 18,40Aa	133,83 ± 10,69Aa	131,63 ± 7,16			
Média	140,18 ± 11,39	122,12 ± 9,46	103,71 ± 15,15				
		S2					
30 dias	68,34 ± 1,46Aa	50,26 ± 2,69Ab	54,53 ± 0,66Bb	56,64 ± 3,28	*	*	*
60 dias	72,29 ± 0,06Aa	54,82 ± 1,53Ab	78,17 ± 3,18Aa	67,94 ± 4,10			
Média	70,31 ± 1,28	52,54 ± 1,72	68,71 ± 6,05				
		Reto					
30 dias	63,64 ± 1,88	69,98 ± 7,91	62,43 ± 3,63	65,56 ± 3,15	NS	NS	NS
60 dias	59,79 ± 10,11	64,06 ± 7,49	71,03 ± 5,11	65,61 ± 3,92			
Média	61,71 ± 4,34	67,02 ± 5,05	66,73 ± 3,40				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); (A, B) médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente; (a,b) médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

As sulfomucinas, podem estar presentes em maiores quantidades na região mediana e distal e inibem a adesão bacteriana (BOSI et al., 2005; CARDOSO, 2005). Neste trabalho, o aumento de sulfomucinas em pacus alimentados com 20% de CBL aos 60 dias sugere maior resistência a bactérias.

Figura 15 - Sulfomucinas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos segmentos S1 (A) e S2 (B)

Em geral, houve influência positiva da adição de CBL na dieta sobre a distribuição de células caliciformes. O tratamento 20% de CBL influenciou positivamente o número de células caliciformes contendo as diferentes mucinas especialmente em S1 e S2. Diferentemente, no reto, nos tratamentos com inclusão de 10% de CBL, foi verificada uma diminuição da produção de mucinas ácidas, neutras, totais e sialomucinas.

3.3.4 Estereologia

Na literatura são encontrados estudos estereológicos em peixes sobre inúmeras estruturas, como em gônadas, fígado, estômago, brânquias, esôfago e estômago (CRUZ et al., 2009; EMERSON et al., 1990; ROCHA et al., 2001). Entretanto são reduzidas as informações sobre o intestino. Com relação a esta estrutura, são encontradas informações em outras espécies, como em caprinos, suínos, cobaias (MAYHEN; MIDDLETON, 1985; NORDI et al., 2013; OGIOLDA et al., 1998; VAN GINNEKEN et al., 2002) .

No presente trabalho, efeito de período foi observado nos segmentos S2 e reto, sendo os maiores valores observados aos 60 dias ($P < 0,05$), Tabela 11. Foi observada correlação entre S1e reto, com $r = 0,48$ ($P < 0,05$).

Análises estereológicas em crustáceos, revela que não há alterações do Vv nos segmentos intestinais em relação à dieta (ASANKA et al., 2011). Em suínos a redução do Vv em relação ao estágio de desenvolvimento do animal, período fetal, neonatal e pós-desmama foi observado por Van Ginneken et al. (2002).

No presente trabalho, foram observados aumento do Vv da mucosa em relação a idade (período). Este resultado pode estar relacionado a espécie e ao hábito alimentar. A resposta positiva observada apenas em S2 e reto, sugere que estes segmentos estão mais relacionados com a absorção de nutrientes.

Tabela 11 - Volume parcial da mucosa absortiva (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%	20%		T	P	TxP
	Vv em S1						
30 dias	62,15 $\pm$ 5,34	66,23 $\pm$ 3,97	63,41 $\pm$ 6,39	64,15 $\pm$ 2,73	NS	NS	NS
60 dias	59,01 $\pm$ 4,74	75,59 $\pm$ 2,57	78,98 $\pm$ 3,25	72,72 $\pm$ 3,45			
Média	60,58 $\pm$ 3,05	70,91 $\pm$ 2,97	71,20 $\pm$ 4,73				
	Vv em S2						
30 dias	65,62 $\pm$ 3,24	64,25 $\pm$ 4,38	72,93 $\pm$ 5,57	67,85 $\pm$ 2,83	NS	*	NS
60 dias	75,22 $\pm$ 0,91	74,24 $\pm$ 2,78	79,41 $\pm$ 3,11	76,42 $\pm$ 1,63			
Média	70,42 $\pm$ 3,09	69,24 $\pm$ 3,22	76,17 $\pm$ 3,20				
	Vv em Reto						
30 dias	26,74 $\pm$ 1,12	36,96 $\pm$ 3,28	32,09 $\pm$ 3,60	32,58 $\pm$ 2,20	NS	*	NS
60 dias	37,34 $\pm$ 3,18	37,94 $\pm$ 1,35	46,86 $\pm$ 5,46	41,13 $\pm$ 2,56			
Média	32,04 $\pm$ 3,35	37,45 $\pm$ 1,60	39,47 $\pm$ 4,41				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

3.4 Considerações finais

A inclusão de 20% de CBL aumentou a espessura da camada muscular assim como o Vv da mucosa parcial absortiva na região S2 aos 60 dias, acompanhando assim o desenvolvimento dos juvenis.

A inclusão de 20% de CBL determinou uma maior presença das células caliciformes no epitélio intestinal, contendo seus diferentes tipos de mucinas aos 60 dias.

Considerando os aspectos avaliados no presente estudo, a presença do colostro bovino liofilizado na dieta influenciou o desempenho e as características histológicas do epitélio intestinal no período estudado.

Referências

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 16, n. 2, p. 511-521, 2001.

ASANKA GUNASEKARA, A.R.A.Y.S.; CASTELEYN, C.; BOSSIER, P.; BROECK, W.V. Comparative stereological study of the digestive tract of *Artemia franciscana* nauplii fed yeast differing in cell wall composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 324/325, p. 64-69, 2011.

BADDLEY, A.; GUNDERSEN, H.J.G.; CRUZ-ORIVE, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 258-276, 1986.

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

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

BOSI, G.; SHINN, A.P.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PIRONI, F.; DEZFULI, B.S. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, p. 703–711, 2005.

CAO, X.J.; WANG, W.M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of Veterinay Medicine Anatomy Histology Embyology**, Berlin, v. 38, p. 254-261, 2009.

CARDOSO, E.W. **Morfologia e ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii* Richardson, 1844 e sua relação com o hábito alimentar**. 2005. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CASTRO, N.; CAPOTE, J.; ÁLVAREZ, S.; ARGÜELLO, A. Effects of liophilized colostrum and different colostrum feeding regiments on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3650-3654, 2005.

CRUZ, A.L.; PEDRETTI, A.C.E.; FERNANDES, M.N. Stereological estimation of the surface area and oxygen diffusing capacity of the respiratory stomach of the air-breathing armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei: Loricariidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 270, p. 601-614, 2009.

DELASHOUB, M.; POUSTY, I.; BANAN KHOJASTEH, S.S. Histology of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) intestine. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 5, n. 6, p. 302-306, 2010.

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

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study **Acta Histochemica**, Jena, v. 110, p. 76-85, 2008.

EMERSON, L.S.; GREER WALKER, M.; WITTHAMES, P.R. A estereological method for estimating fish fecundity. **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 721-730, 1990.

GOLD, D.V.; DAN SHOCHAT, E.; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin: evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 12, p. 6354-6358, 1981

HERNÁNDEZ, D.R.; PÉREZ GIANESELLI, M.; DOMITROVIC, H. Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of South American Catfish (*Rhamdia quelen*). **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 27, n. 1, p. 105-111, 2009.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 89, p. 597-606, 2003.

LEV, R.; SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, Baltimore, v. 12, p. 309, 1964.

MAKINO, L.C. **Estrutura, ultraestrutura e histoquímica do aparelho digestório do *Prochilodus lineatus*. Análise da diversidade da microbiota intestinal de *Prochilodus lineatus* e *Pterygoplichthys anisitsi***. 2010. 111 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

MARCHETTI, L.; CAPACCHIETTI, M.; SABBIETI, M.G.; ACCILI, D.; MATERAZZI, G.; MENGHI G. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1808-1821, 2006.

MAYHEW, T.M.; MIDDLETON, C. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat: a stereological study of their variability within and between animals. **Journal of Anatomy**, London, v. 141, p. 1-1, 1985.

MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; MACHADO-NETO, R. Enterocyte IgG uptake in the small intestine of goat kids during the period of passive immunity acquisition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 114, p. 182-187, 2013.

MYERS, R.B.; FREDENBURG, J.L.; GRIZZLE, W.E. Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. chap. 11, p. 161-187.

NORDI, W.M.; MORETTI, D.B.; LIMA, A.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Intestinal histology of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v. 58, n. 5, p. 232–241, 2013.

OGIOLDA, L.; WANKE, R.; ROTTMANN, O.; HERMANN, W.; WOLF, E. Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. **The Anatomical Record**, New York, v. 250, p. 292-299, 1998.

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

PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O. DELGADO, E.F.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Growth performance and muscle protein, RNA and DNA content in juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) fed lyophilized bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 89-89, 2007.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R.A.F.; OLIVEIRA, M.H.; SILVA, M.W. The hepatocytes of the brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*): a quantitative study using design-based stereology. **Histology Histopathology**, Madrid, v. 16, p. 423-437, 2001.

RODRIGUES, A.P.O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; CYRINO, J.E.P.; DELGADO, E.F.; MACHADO-NETO, R. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 559-563, 2009.

SALAMAT, N.; DARBEH, R.; MAJD, N.E.; SAFAHIEH, A.R. Histological aspects of gut associated lymphoid tissue in *Acanthopagrus latus*. **Global Veterinary**, Deira, v. 7, n. 4, p. 381-385, 2011.

SHIRAISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, D.J.A. Morphometric analysis of the intestinal wall and the dynamic of mucins secreted in the chicken ileum infected with *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2146-2153, out. 2009.

SPICER, S.S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, Baltimore, v. 8, p. 18-34, 1960.

URBINATTI, E.C.; GONÇALVES, F.D.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria. Ed da UFSM, 2010. cap. 8, p. 205-244.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; WEYNS, A. Stereological characteristics of pig small intestine during normal development. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 47, n. 4, p. 868-878, 2002.

4 EPITÉLIO INTESTINAL DE JUVENIS DE DOURADO *Salminus brasiliensis* ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do colostro bovino liofilizado, utilizado como fonte parcial da dieta protéica, sobre as características histológicas do epitélio intestinal de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*). Os juvenis foram distribuídos num delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2 (15 peixes por tratamento em triplicata). Foram utilizadas dietas com três níveis de inclusão do CBL (0%, 10% e 20%) e dois períodos experimentais (30 e 60 dias) oferecidas duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Para o estudo histológico, o intestino foi dividido em três segmentos, S1, S2 e intestino posterior. Foram avaliadas a espessura da camada muscular; volume da mucosa absorptiva (Vv); número de células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras e subtipos ácidas - sialomucinas e sulfomucinas. Para a espessura da camada muscular, foi observado efeito de período em S2 ($P<0,05$). Em relação ao número de células caliciformes, o segmento S1 apresentou interação para as sialomucinas, efeito de tratamento para o número total de caliciformes e efeito de período para sulfomucinas ($P<0,05$). Efeito de período experimental foi observado no segmento S2 para mucinas ácidas, neutras e total, sialomucinas e Vv ($P<0,05$) e, no intestino posterior, para espessura da camada muscular, sialomucinas e sulfomucinas ($P<0,05$). Considerando os aspectos avaliados no presente estudo, a presença de colostro bovino liofilizado na dieta não influenciou significativamente, no período estudado, as características histológicas entéricas dos juvenis de dourados.

Palavras-chave: Proteína; Colostro bovino liofilizado; Carnívoro; Células caliciformes; Intestino

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized bovine colostrum (LBC), used as partial source of protein in the diet, on the histological characteristics of the intestinal epithelium of juvenile dourado (*Salminus brasiliensis*). Juveniles were distributed in a completely randomized design in a factorial scheme 3x2 (15 fish per treatment in triplicate). Three diets were used with different levels of LBC inclusion (0%, 10% and 20%) and two experimental periods (30 and 60 days) offered twice daily until apparent satiation. For the histological study, the intestine was divided into three segments, S1, S2 and posterior intestine. The muscle layer thickness; the mucosal absorptive volume (Vv); the number of goblet cells containing acidic and neutral mucins and the acidic subtypes – sialomucin and sulphomucin were evaluated. For the muscle layer thickness effect of period was observed in S2 ($P<0.05$). In relation to the number of goblet cells, the segment S1 showed interaction for sialomucin, effect of treatment for total number of goblet cells and effect of period for sulphomucins ($P<0.05$). Effect of period was observed in the S2 segment for acid, neutral and total mucins, sialomucins and Vv ($P<0.05$) and, in the posterior intestine, for muscle layer thickness, sialomucins and sulphomucins ($P<0.05$). Considering the aspects studied, the presence of lyophilized bovine

colostrum in the diet did not influenced, in the period studied, the enteric histological characteristics.

Keywords: Protein; Lyophilized bovine colostrum; Carnivorous; Goblet cells; Intestine

4.1 Introdução

O dourado (*Salminus brasiliensis*), destaca-se por um elevado ganho de peso (FLORA et al., 2010) e é considerado o maior peixe de escama da bacia da Prata (DAIRIKI, 2009). Esta espécie pertence à ordem Characiformes, Família Characidae, Subfamília Salmininae, gênero *Salminus*, espécie *brasiliensis*. De hábito alimentar ictiófago, habita principalmente os grandes rios (NAKATAMI; AGOSTINHO; BAUMGARTNER, 2001). Encontra-se distribuído nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, São Francisco e Uruguai (WEINGARTNER; ZANIBONI, 2010).

A elevada exigência de proteína na dieta, ingrediente de maior custo na alimentação animal, determina a busca por ingredientes protéicos alternativos que sejam ao mesmo tempo de alta qualidade, custo reduzido e de disponibilidade no mercado. Como um alimento de origem animal, o colostro bovino, rica fonte de proteína de origem animal, constitui-se em uma alternativa complementar a ser considerada para a nutrição de peixes. O colostro é rico em proteínas, principalmente as imunoglobulinas e fatores bioativos, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), e ainda, considerado um alimento nutracêutico, (PANDEY et al., 2011). O colostro bovino na forma liofilizada tem suas características originais preservadas (CASTRO et al., 2005; NORDI et al., 2013; MORETTI et al., 2013; PAULETTI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010).

As células caliciformes encontradas na mucosa intestinal são responsáveis pela produção de muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento intestinal (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). O muco secretado pelas células caliciformes pode ser ácido, ou neutro, podendo ainda o muco ácido ser diferenciado em sialomucinas e sulfomucinas). As mucinas neutras protegem o epitélio contra os microrganismos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Por sua vez, as mucinas ácidas contribuem para a função protetora contra agentes patogênicos, além de atuar como barreira física entre a mucosa e agentes químicos (ARELLANO et al., 2001).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do colostro bovino liofilizado fornecido como fonte parcial de proteína na ração, sobre as

características histológicas do epitélio intestinal e com especial enfoque na distribuição de células caliciformes de juvenis de dourado.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Dietas experimentais

Para formulação das dietas experimentais, foi utilizado o colostro bovino na forma liofilizada (CBL) (Tabela 1).

Tabela 1 - Bromatologia do colostro bovino liofilizado

	Matéria Seca	Matéria Original
Matéria Seca (%)	100,00	94,13
Proteína Bruta (%)	67,89	72,12
Extrato etéreo (%)	8,21	8,72
Energia bruta (caloria/g)	5.229,00	5.555,08

Três dietas experimentais isoproteicas e isoenergéticas foram formuladas com dois níveis de inclusão, 10 e 20%, de colostro e uma dieta controle sem adição de colostro. Para o cálculo das dietas, utilizou-se o programa de formulação de rações SuperCrac (Tabela 12).

As dietas foram fornecidas na forma de peletes e sua composição bromatológica também foi avaliada.

Tabela 12 - Composição das dietas experimentais dos juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Ingredientes	Porcentagem na dieta ^a		
	0% CBL	10% CBL	20% CBL
Colostro (67,9% PB)	-	10	20
Farelo de soja (45% PB)	23	23	23
Farinha de vísceras	20,48	11,98	2,45
Farinha de peixe (55% PB)	32	30	30
Óleo de peixe	9,5	9	8,52
Premix ⁽¹⁾	1	1	1
BHT	0,02	0,02	0,02
Celulose	2	3	3
Milho Grão	12	12	12
Composição	0% CBL	10% CBL	20% CBL
Proteína Bruta (%)	43,12	43,71	44,98
Energia Bruta (Kcal kg ⁻¹)	4,32	4,35	4,43
Fibra Bruta (%)	3,9	4,69	4,55
Extrato etéreo (%)	14,88	1,49	11,69

(1) Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo, suplementação de premix vitamínico mineral por kg de ração: 2.500.000 UI de vitamina A; 600.000 UI de vitamina D3; 37.500 UI de vitamina E; 3.750 mg vitamina K3; 50.000 mg vitamina C; 4.000 mg vitamina B1; 4.000 mg Vitamina B2; 4.000 mg Vitamina B6; 4.000 mcg Vitamina B12; 12.000 mg de pantetonato de cálcio; 15 mg biotina; 1.250 mg ácido fólico; 22.500 mg niacina; 2.500 mg de cobre; 12.500 mg de zinco; 375 mg de iodo; 87,5 mg de selênio; 125 mg de cobalto; 12.500 mg de manganês; 15.000 mg de ferro; 15.000 mg de B.H.T.^a 0%CBL- ração contendo 0% de Colostro Bovino Liofilizado, 10%CBL – ração contendo 10% de Colostro Bovino Liofilizado, 20%CBL – ração contendo 20% de Colostro Bovino Liofilizado

4.2.2 Condição experimental

Juvenis de dourado ($10,08 \pm 0,3$ cm; $13,3 \pm 0,9$ g) foram selecionados de acordo com a higidez e homogeneidade de porte e distribuídos ao acaso em um esquema fatorial 3x2 (15 juvenis por tratamento, considerando-se triplicatas para cada tratamento) correspondendo às dietas experimentais (controle, 10 e 20% de inclusão de colostro bovino liofilizado - CBL) e às datas de abate (30 e 60 dias após o início do experimento). Inicialmente, os dourados passaram por um período de adaptação às instalações e à rotina experimental e, a seguir, foram condicionados por sete dias a aceitar ração peletizada. Cada lote foi pesado e o comprimento de nove juvenis medido para as análises de desempenho. Os seguintes parâmetros de desempenho foram considerados:

- Ganho de peso (%)

$$GP = \frac{P_f (g) - P_i (g)}{P_i (g)} \times 100$$

- Taxa de crescimento específico (% crescimento específico dia⁻¹)

$$TCE = \frac{100 \times (\ln P_f - \ln P_i)}{\text{dias}}$$

- Conversão alimentar aparente (kg kg⁻¹)

$$CAA = \frac{\text{Consumo}}{GP}$$

- Índice de sobrevivência (%)

$$IS = \frac{\text{peixes inicial}}{\text{peixes final}} \times 100$$

Em que: Pi é o peso inicial; Pf é o peso final; ln logaritmo natural; GP é ganho de peso.

Os peixes permaneceram em tanques de plástico (300 litros) dotados de fluxo de água e aeração contínua em sistema de recirculação e em condições controladas de temperatura e luminosidade (26 ± 1°C e fotoperíodo de 12 horas). Durante o período experimental os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00) até aparente saciedade. Os parâmetros de qualidade da água durante os períodos mantiveram-se adequados: pH (7,09 ± 0,3); temperatura (26±1,5°C); amônia (0,02 ± 0,014 ppm) e oxigênio dissolvido (5,81 ± 0,09 mg/L) e dentro dos limites aceitáveis para o desenvolvimento dos juvenis.

4.2.3 Coleta das amostras intestinais

Nas datas de abate, aos 30 e 60 dias, após serem submetidos à restrição alimentar por um período de 24 horas, sete peixes de cada tratamento foram aleatoriamente selecionados, anestesiados com benzocaína (0,5g L⁻¹) e individualmente pesados e medido o comprimento final. A região abdominal foi aberta, o trato gastrointestinal coletado e as alças intestinais desfeitas. O intestino foi dividido conforme Rodrigues e Menin (2008), em intestino médio e posterior, subdividindo-se o primeiro em dois segmentos, um cranial (S1) e outro intermediário (S2) e intestino posterior (Figura 16).

Figura 16 – Segmentos intestinais de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

4.2.4 Microscopia óptica

As três porções do intestino dos dourados foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2, *overnight*.

No dia seguinte, o tecido foi lavado com PBS 0,1M, pH 7,2, desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), pré-infiltrado em etanol e resina (3:1; 1:1) e infiltrado em 100% com resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.).

Os tecidos armazenados em resina plástica foram imersos em histomoldes com resina adicionada de endurecedor e mantidos em estado de anaerobiose a 3°C durante uma semana. Os blocos obtidos foram limados, fixados em suportes de madeira e seccionados por navalha de aço em um micrótomo Leica RM 2125 RT, obtendo-se dez cortes de 5 µm de espessura não sequenciais (NORDI et al., 2013). Foram preparadas duas lâminas para cada segmento intestinal, uma para a diferenciação de células caliciformes contendo mucinas ácidas e neutras e para análises histológicas e morfométricas e outra para a diferenciação de células caliciformes ácidas contendo sialomucinas e sulfomucinas.

4.2.5 Número de células caliciformes- Histoquímica

As lâminas confeccionadas de cada segmento específico foram utilizadas para a diferenciação e quantificação de células caliciformes que secretam mucinas ácidas ou neutras em 15 campos. A primeira lâmina foi corada com Alcian Blue (AB,

pH 2,5) e ácido periódico de Schiff (pH 2,5), métodos que distinguem mucinas ácidas de azul e neutras de vermelho, respectivamente (SPICER, 1960). As lâminas foram coradas com solução de Alcian Blue (AB, pH 2,5) por 30 minutos, lavados em água corrente por 5 minutos; Oxidadas em ácido periódico por 10 minutos, lavadas novamente em água corrente por 5 minutos, imersas em reagente de Schiff por 10 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. O número total de células caliciformes foi obtido pela soma do número de células caliciformes contendo mucinas neutras e ácidas.

A segunda lâmina foi corada por 30 minutos com Alcian Blue (pH 1,0) o qual marcou fortemente as mucinas sulfatadas, as mesmas foram contadas e, em seguida, a lâmina foi novamente corada por 30 minutos com Alcian Blue (pH 2,5) o qual corou as demais células caliciformes contendo mucinas ácidas (LEV; SPICER, 1964). As células caliciformes coradas foram novamente contadas e o número de células caliciformes contendo sialomucinas foi obtido pela diferença entre o número total de células caliciformes ácidas e o número de células caliciformes contendo sulfomucinas (KLESSEN et al., 2003; MARCHETTI et al., 2006).

4.2.6 Histologia do epitélio intestinal

A análise histológica e obtenção de imagens foram realizadas em microscópio óptico acoplado ao sistema de análise de imagens Bel Micro (Bel Engineering srl-Italy). Também foi avaliada a espessura da camada muscular nos três segmentos intestinais (10 campos por segmento em um aumento constante de 100X).

4.2.7 Estereologia

Para complementar as informações obtidas com as análises histológicas de medidas lineares utilizou-se a análise estereológica dos segmentos intestinais, técnica usada para quantificar estruturas tridimensionais (BADDELEY et al., 1986). Para utilizar este método os cortes devem ser isotrópicos, entretanto, a mucosa do intestino apresenta condição anisotrópica. Para isto Baddley et al. (1986) propuseram um método com a utilização de um grid que considera esta condição anisotrópica. Neste método, o plano horizontal é o limite entre a mucosa e a submucosa.

A obtenção de imagens foi realizada em microscópio óptico acoplado ao sistema de análise de imagens Bel Micro (Bel Engineering srl-Italy). E avaliadas

imagens nos três segmentos intestinais (15 campos por segmento em um aumento de 100X).

A análise estereológica para determinação do volume parcial (V_v) ocupado pela mucosa do intestino foi realizada por meio de sobreposição de um sistema teste do tipo ciclóide às imagens dos cortes, com 35 arcos ciclóides e 70 pontos teste fotocopiando em uma transparência e sobreposto sobre cada campo de secção selecionada (Figura 5). O volume parcial da mucosa foi expresso em porcentagem e obtido pelo número de pontos teste sobre a superfície da mucosa e o número total de pontos na grade, utilizando a seguinte fórmula:

$$VV = \frac{\sum P(\text{MUCOSA})}{\sum P(\text{VOLUME REFERENCIAL})} \cdot 100$$

Sendo:

$\sum P(\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste caindo sobre a camada específica;

$\sum P(\text{volume referencial})$ = número total de pontos na grade.

Figura 5 - Sistema Teste de arcos ciclóides
Fonte: Baddeley et al. (1986)

4.2.8 Análise estatística

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, onde as variáveis de desempenho e histológicas foram analisadas em um esquema fatorial 3x2 (sete peixes por tratamento, considerando-se triplicatas para cada tratamento), correspondendo às três dietas e as duas datas de abate. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, através do procedimento (PROC MIXED) do

programa estatístico SAS. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey. Para todas as análises foi utilizada a probabilidade de 5%.

4.3 Resultados e discussões

4.3.1 Condição experimental e parâmetros de desempenho

Para os peixes que não receberam colostro, o índice de sobrevivência foi de 94,29 % aos 30 dias, e 99,05% aos 60 dias. Para os demais tratamentos com CBL o índice de sobrevivência registrado foi de 100%. Os resultados de desempenho estão sumariados na Tabela 13.

Não foi observado efeito significativo da inclusão de CBL na ração ($P > 0,05$) sobre os parâmetros de desempenho. Para CF, PF e CAA, os maiores valores foram encontrados aos 60 dias, enquanto para TCE aos 60 dias foram verificados os menores valores ($P < 0,05$). Diferentemente, Pauletti et al. (2010), ao adicionarem 0, 5, 10, 15 e 20% de colostro bovino liofilizado na dieta para cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum*, peixe de hábito alimentar carnívoro, verificaram influência positiva da inclusão do colostro no GP, TCE e CA quando fornecido por 30 dias aos peixes.

Neste trabalho, a adição de colostro bovino liofilizado na dieta de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* não influenciou o desempenho.

Tabela 13 - Desempenho (média $\pm$ erro padrão) de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado aos 30 e 60 dias

Período experimental		Tratamento Experimental			Média	Efeito		
		0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
CI								
30 dias	11,04 ± 0,08	10,61 ± 0,08	10,93 ± 0,15	10,86 ± 0,08	NS	NS	NS	
60 dias	11,06 ± 0,27	10,86 ± 0,25	10,53 ± 0,03	10,81 ± 0,13				
Média	11,05 ± 0,12	10,74 ± 0,32	10,73 ± 0,11					
CF								
30 dias	17,00 ± 1,39	15,61 ± 1,12	15,85 ± 0,06	16,15 ± 0,55	NS	*	NS	
60 dias	17,63 ± 0,86	17,31 ± 1,03	19,31 ± 0,40	18,08 ± 0,51				
Média	17,31 ± 0,74	16,46 ± 0,78	17,58 ± 0,79					
PI								
30 dias	13,66 ± 0,47	12,50 ± 0,27	13,13 ± 0,46	13,09 ± 0,26	NS	NS	NS	
60 dias	13,66 ± 0,46	13,45 ± 0,82	13,20 ± 0,67	13,44 ± 0,34				
Média	13,66 ± 0,30	12,97 ± 0,44	13,17 ± 0,36					
PF								
30 dias	56,33 ± 14,57	43,23 ± 10,37	41,88 ± 2,05	47,15 ± 5,68	NS	*	NS	
60 dias	56,14 ± 8,75	56,77 ± 9,67	76,73 ± 5,27	63,21 ± 5,28				
Média	56,23 ± 17,60	50,00 ± 7,02	59,30 ± 8,19					
GP								
30 dias	42,67 ± 14,42	30,73 ± 10,31	28,75 ± 2,42	34,05 ± 5,60	NS	NS	NS	
60 dias	42,47 ± 9,22	43,31 ± 10,47	63,52 ± 5,31	49,76 ± 5,51				
Média	42,57 ± 7,65	37,02 ± 7,14	46,13 ± 8,20					
CR								
30 dias	75,14 ± 19,83	75,86 ± 14,89	57,74 ± 1,50	69,58 ± 7,76	NS	*	NS	
60 dias	94,62 ± 20,51	113,45 ± 29,85	118,56 ± 7,23	108,87 ± 11,26				
Média	84,88 ± 13,48	94,65 ± 17,12	88,15 ± 13,99					
CA								
30 dias	1,84 ± 0,13	2,73 ± 0,54	2,04 ± 0,20	2,20 ± 0,21	NS	NS	NS	
60 dias	2,29 ± 0,50	2,57 ± 0,14	1,88 ± 0,16	2,25 ± 0,18				
Média	2,06 ± 0,25	2,65 ± 0,25	1,96 ± 0,12					
TCE								
30 dias	3,66 ± 0,61	3,21 ± 0,59	3,13 ± 0,20	3,33 ± 0,26	NS	*	NS	
60 dias	2,07 ± 0,27	2,10 ± 0,62	2,62 ± 0,12	2,26 ± 0,16				
Média	2,87 ± 0,46	2,66 ± 0,39	2,87 ± 0,15					

* $P < 0,05$; NS = não significativo ($P > 0,05$); médias seguidas de letras diferentes (a, b) diferem significativamente. ^aParâmetros: comprimento inicial (CI), comprimento final (CF), Peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), conversão alimentar (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de sobrevivência (TS); ^bDesvio padrão das médias; ^cD - efeito de dieta, P - efeito de período experimental; DxP - interação entre dieta e período experimental

4.3.2 Histologia do epitélio intestinal de juvenis de dourado

Neste trabalho foi identificado que a parede intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*, é composta por mucosa, submucosa, camada muscular e serosa. Na mucosa, o tecido epitelial do tipo simples apresentou células caliciformes entre os enterócitos. Na submucosa, foram observados vasos sanguíneos no tecido conjuntivo frouxo. A camada muscular, constituída por uma camada circular interna e longitudinal externa de músculo liso, estava recoberta por uma camada serosa (Figura 17). O intestino posterior diferentemente das regiões S1 e S2 apresentou vacúolos. Assim, o epitélio intestinal do dourado é semelhante ao encontrado em vertebrados e outras espécies de teleósteos (BANAN KHOJASTEH et al., 2009;

CAO; WANG, 2009; CARDOSO, 2005; DELASHOUB et al., 2010; HERNANDEZ et al., 2009; MAKINO, 2010; RODRIGUES et al., 2009; SALAMAT et al., 2011).

Figura 17 - Epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* nos segmentos S1 (A); S2 (B) e Intestino posterior (C). Aumento de 100x. Barra = 100 µm

Com relação à espessura da camada muscular, no presente trabalho, verificou efeito de período experimental para a espessura da camada muscular apenas no intestino posterior ($P < 0,05$), com maior valor observado aos 60 dias.

A espessura da camada muscular em peixes tem sido relacionada com o segmento intestinal, espécie, hábito alimentar e concentração de proteína na dieta (CAO; WANG, 2009; CARDOSO, 2005; MAKINO, 2010). Rodrigues et al. (2010) observaram um efeito positivo do uso de colostro bovino liofilizado (0, 10 e 20%) na alimentação de cacharas *Pseudoplatystoma fasciatum*. Os autores verificaram uma maior espessura da camada muscular na primeira porção do intestino médio de cacharas alimentados com colostro bovino liofilizado em relação aos peixes alimentados com dieta convencional.

Neste trabalho, não foram observadas diferenças entre os tratamentos indicando que a possível presença de moléculas bioativas no colostro, como o IGF-I, não determinou alterações na camada muscular dos juvenis de dourado. Assim, o aumento da espessura da camada muscular de juvenis de dourado aos 60 dias pode estar relacionado ao desenvolvimento do peixe.

Tabela 14 - Espessura da camada muscular (média $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
	S1 (µm)						
30 dias	135,71 ± 0,19	132,35 ± 3,54	135,66 ± 1,78	134,57 ± 1,27	NS	NS	NS
60 dias	129,41 ± 5,35	129,22 ± 7,72	129,17 ± 6,41	129,27 ± 3,28			
Média	132,56 ± 2,78	130,79 ± 3,86	132,41 ± 3,31				
	S2 (µm)						
30 dias	107,24 ± 1,91	108,73 ± 7,61	98,46 ± 3,07	104,81 ± 2,91	NS	NS	NS
60 dias	105,45 ± 12,33	94,33 ± 4,54	114,69 ± 6,13	104,82 ± 5,11			
Média	106,34 ± 5,59	101,53 ± 5,10	106,58 ± 4,75				
	Posterior (µm)						
30 dias	125,20 ± 3,50	122,19 ± 3,19	125,19 ± 4,44	124,20 ± 1,94	NS	*	NS
60 dias	133,22 ± 0,05	134,33 ± 1,76	134,82 ± 2,13	134,12 ± 0,83			
Média	129,21 ± 2,38	128,26 ± 3,16	130,00 ± 3,08				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Nos peixes as dobras macroscópicas são estruturas que aparecem em grande quantidade e variedade e aumentam a superfície de absorção e secreção do órgão (ROTTA, 2003). Baldisseroto e Val (2002) relatam que, de acordo com diferentes hábitos alimentares, as pregas intestinais são mais desenvolvidas nos peixes carnívoros comparado com os onívoros. No intestino médio do dourado, as pregas são mais espessas e mais largas e no posterior mais delgadas e estreitas (RODRIGUES; MENIN, 2008). Os autores sugerem que o padrão da mucosa dos intestinos médio e posterior desta espécie pode estar relacionado ao transporte de alimento, podendo contribuir para a sua retenção por um período maior, retardando seu avanço no sentido crânio-caudal, importância expressiva para os processos digestivos e absorptivos.

Neste trabalho alguns juvenis de dourado apresentaram dobras ramificadas na mucosa do epitélio intestinal, além da presença de vacúolos na região posterior, segmento onde ocorre a absorção de macromoléculas protéicas (Figura 18).

Figura 18 – Dobras de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* nos segmentos S1 (A), S2 (B) posterior (C). Aumento de 100x. Vacuólos no intestino posterior (D), Seta laranja. aumento de 400x. Barra = 100 µm (A,B,C); barra= 50 µm (D)

4.3.3 Células caliciformes

As células caliciformes ácidas que se coram em azuis, e as células caliciformes neutras que se coram em rosa ou vermelho foram encontradas em toda a região do epitélio intestinal (Figura 19).

Figura 19 - Células caliciformes ácidas e neutras de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* nos segmentos S1 (A); S2 (B) e intestino posterior (C). Aumento de 100x. Barra = 100 μ m

O número de células caliciformes neutras, presentes entre as células enterocíticas nos diferentes segmentos intestinais de juvenis de dourado, são apresentadas na Tabela 15. Nos diferentes segmentos intestinais, o número de células caliciformes neutras não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). No segmento S2 houve efeito do período, aos 30 dias, o número de células caliciformes neutras foi menor que aos 60 dias ($P < 0,05$).

Cardoso (2005) trabalhando com *Notothenia rosii*, peixe antártico e predador, verificou maior secreção de mucinas neutras na porção mediana e distal do segmento intestinal. As mucinas neutras protegem o epitélio contra microrganismos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001) e o aumento destas mucinas no segmento S2 sugere uma maior proteção do epitélio intestinal com o desenvolvimento dos juvenis.

Tabela 15 - Células caliciformes neutras (média $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
S1							
30 dias	114,46 ± 7,48	125,42 ± 22,22	83,85 ± 11,78	107,91 ± 9,80	NS	NS	NS
60 dias	118,46 ± 9,68	139,58 ± 10,23	110,82 ± 15,21	122,95 ± 7,37			
Média	116,46 ± 5,54	132,50 ± 11,39	97,33 ± 10,50				
S2							
30 dias	105,38 ± 12,26	109,77 ± 27,05	99,55 ± 18,98	104,90 ± 10,28	NS	*	NS
60 dias	190,85 ± 13,87	146,65 ± 7,21	148,96 ± 18,62	158,56 ± 9,96			
Média	139,57 ± 22,42	128,21 ± 14,99	124,25 ± 16,23				
Posterior							
30 dias	112,95 ± 20,37	104,27 ± 7,75	85,03 ± 11,29	100,75 ± 8,20	NS	NS	NS
60 dias	83,52 ± 24,77	112,37 ± 9,84	102,97 ± 16,55	99,62 ± 10,00			
Média	98,24 ± 15,78	108,32 ± 5,89	94,00 ± 9,82				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Em relação às mucinas ácidas, apenas o segmento S2 apresentou efeito de período, sendo maior o valor aos 60 dias em relação aos 30 dias (P< 0,05), Tabela 16.

As mucinas ácidas contribuem para a função protetora contra agentes patogênicos além de atuar como barreira física entre a mucosa e agentes químicos (ARELLANO et al., 2001). As mesmas possuem grande quantidade de ácido siálico (GOLD et al., 1981; MYERS; FREDENBURG; GRIZZLE, 2008; SHIRAISHI et al., 2009). As mucinas ácidas também podem proteger o epitélio intestinal contra ações digestivas das glicosidases (BANAN KHOJASTEH et al., 2009).

Neste trabalho, a densidade das mucinas ácidas em dourado aumentou de acordo com o período experimental, indicando maior proteção contra os microrganismos a medida que o animal se desenvolve.

Tabela 16 – Células caliciformes ácidas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
	S1						
30 dias	210,00 ± 13,78	228,18 ± 42,06	161,24 ± 8,62	199,80 ± 16,41	NS	NS	NS
60 dias	211,99 ± 13,22	262,52 ± 20,23	209,37 ± 30,64	227,96 ± 14,20			
Média	210,99 ± 8,55	245,35 ± 22,24	185,30± 17,84				
	S2						
30 dias	193,170 ± 8,22	206,65 ± 8,98	198,47 ± 13,35	199,43 ± 5,57	NS	*	NS
60 dias	270,33 ± 22,46	247,11 ± 31,49	257,72 ± 2,64	258,38 ± 11,68			
Média	231,75 ± 20,30	226,88 ± 17,21	228,09± 14,58				
	Posterior						
30 dias	178,83 ± 25,34	174,09 ± 23,06	163,60 ± 11,43	172,17 ± 10,66	NS	NS	NS
60 dias	149,72 ± 27,34	187,30 ± 4,30	196,23 ± 6,64	177,75 ± 10,87			
Média	164.27 ± 17,89	180.69 ± 10,89	179.91 ± 9.39				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP= interação entre tratamento e período

O número de células caliciformes totais (Figura 20) diferiu no segmento S2, aos 60 dias o valor foi maior que aos 30 dias (P>0,05), Tabela 17. No segmento S1, o tratamento influenciou positivamente a densidade de células caliciformes (P<0,05), o grupo que recebeu 10% de CBL apresentou valores maiores que o grupo que recebeu 20% de CBL.

Figura 20 - Células caliciformes totais, contendo mucinas ácidas e neutras no epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*. Seta laranja: mucinas ácidas; seta preta: mucinas neutras. Aumento 400X. Barra 50 μ m

Tabela 17 – Total de células caliciformes (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10% CBL	20% CBL		T	P	TxP
		S1					
30 dias	318,82 ± 20,06	349,75 ± 64,05	242,53 ± 22,72	303,70 ± 25,92	NS	NS	NS
60 dias	328,73 ± 13,29	403,97 ± 19,85	321,05 ± 43,91	351,25 ± 19,57			
Média	323,77 ± 10,99	376,86 ± 32,34	281,79 ± 28,23				
		S2					
30 dias	298,87 ± 18,41	300,94 ± 20,77	296,89 ± 30,92	298,90 ± 12,01	NS	*	NS
60 dias	443,58 ± 26,65	373,86 ± 23,26	406,48 ± 21,83	403,52 ± 15,47			
Média	356,75 ± 37,80	337,40 ± 21,45	351,68 ± 29,78				
		Posterior					
30 dias	292,10 ± 35,74	263,22 ± 39,74	238,35 ± 20,26	264,56 ± 18,23	NS	NS	NS
60 dias	231,60 ± 50,41	291,87 ± 11,78	299,06 ± 20,68	274,17 ± 19,32			
Média	261,85 ± 30,76	277,54 ± 19,61	268,71 ± 18,76				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Em relação as sialomucinas, no segmento S1, houve interação entre tratamento e período para o número de células caliciformes (P< 0,05) (Tabela 18). Neste segmento, os juvenis alimentados com 10% de CBL apresentaram maior número de células caliciformes ácidas contendo sialomucinas aos 60 dias em relação aos 30 dias. Enquanto os grupos 0 e 20% de CBL apresentaram valores semelhantes nestes períodos. Aos 60 dias, os animais alimentados com 10% de CBL apresentaram maior número de células caliciformes contendo sialomucinas em relação ao grupo 20% de CBL.

Marchetti et al. (2006) ao estudarem o canal alimentar de trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, observaram que todas as regiões intestinais apresentaram presença de sialomucinas, indicando função de proteção e lubrificação contra agentes químicos. Neste trabalho, a inclusão de 10% de CBL aumentou a densidade de sialomucinas em S1, sugerindo um efeito adverso da presença de colostro bovino liofilizado na dieta.

Tabela 18 – Sialomucinas (médias $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
S1							
30 dias	9,34 ± 1,09 Aa	8,02 ± 1,26 Ba	6,76 ± 1,30 Aa	8,04 ± 0,71	*	*	*
60 dias	19,84 ± 4,30 A ab	29,43 ± Aa	12,32 ± 1,25 Ab	20,53 ± 3,08			
Média	14,59 ± 3,07	18,72 ± 5,22	9,54 ± 1,48				
S2							
30 dias	7,64 ± 0,80	7,45 ± 1,44	5,95 ± 1,27	7,01 ± 0,66	NS	*	NS
60 dias	8,24 ± 0,21	11,51 ± 1,92	9,35 ± 1,57	9,70 ± 0,86			
Média	7,94 ± 0,39	9,48 ± 1,40	7,65 ± 1,18				
Posterior							
30 dias	13,47 ± 0,68	17,02 ± 0,31	14,33 ± 1,39	15,12 ± 0,74	NS	*	NS
60 dias	12,50 ± 1,89	10,83 ± 0,80	11,40 ± 2,09	11,58 ± 0,88			
Média	12,89 ± 1,08	13,92 ± 1,43	12,87 ± 1,30				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); médias seguidas de letras diferentes (a,b) (A,B) diferem significativamente; T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

Em relação às sulfomucinas, nos segmentos S1 e posterior, houve efeito de período, aos 60 dias os valores foram maiores que aos 30 dias (P< 0,05), Tabela 19.

De acordo com Cardoso (2005) em *Notohenia rosii*, as sulfomucinas podem estar presentes em maiores quantidades nas regiões mediana e distal do intestino. Estas mucinas inibem a adesão bacteriana e são mais resistentes a proteases, sendo detectadas em maiores quantidades em peixes infectados por parasitas (BOSI et al., 2005). Neste trabalho, a densidade das sulfomucinas aumentou de acordo com o período experimental, indicando possivelmente uma maior proteção a medida que o animal se desenvolve.

Tabela 19 – Sulfomucinas (média $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
		S1					
30 dias	66,55 ± 4,55	72,45 ± 6,62	58,08 ± 4,44	65,69 ± 3,37	NS	*	NS
60 dias	86,85 ± 8,72	83,83 ± 6,74	74,10 ± 5,77	81,59 ± 4,07			
Média	76,70 ± 6,32	78,14 ± 4,93	66,09 ± 4,84				
		S2					
30 dias	75,56 ± 5,64	78,89 ± 4,39	67,58 ± 4,19	74,01 ± 2,92	NS	NS	NS
60 dias	85,12 ± 5,56	72,44 ± 8,27	81,64 ± 7,07	79,73 ± 4,00			
Média	80,34 ± 4,13	75,66 ± 4,43	74,61 ± 4,84				
		Posterior					
30 dias	37,78 ± 5,32	45,15 ± 4,26	45,40 ± 6,19	42,78 ± 2,94	NS	*	NS
60 dias	51,45 ± 3,24	57,44 ± 4,91	59,70 ± 2,90	56,19 ± 2,26			
Média	44,61 ± 4,13	51,30 ± 4,00	52,55 ± 55,16				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

4.3.4 Estereologia

Na literatura são encontrados estudos estereológicos em peixes sobre inúmeras estruturas, como em gônadas, fígado, estômago, brânquias, esôfago e estômago (CRUZ et al., 2009; EMERSON et al., 1990; ROCHA et al., 2001). Entretanto são reduzidas as informações sobre o intestino. Com relação a esta estrutura, são encontradas informações em outras espécies, como em caprinos, suínos, cobaias (MAYHEN; MIDDLETON, 1985; NORDI et al., 2013; OGIOLDA et al., 1998; VAN GINNEKEN et al., 2002) .

Neste trabalho, houve efeito de período experimental para o segmento intestinal S2 ($P < 0,05$), sendo o Vv maior aos 60 dias em relação aos 30 dias, Tabela 20. Foi observada uma correlação entre S1 e S2, com $r = 0,51$ ($P < 0,05$). O aumento do Vv em S2 aos 60 dias pode estar relacionado com o aumento da densidade de células caliciformes no mesmo segmento intestinal. Como também encontrado no presente trabalho, Nordi et al. (2013), observou que o colostro bovino liofilizado não influenciou o volume parcial da mucosa absortiva. Análises estereológicas em crustáceos, revela que não há alterações do Vv nos segmentos intestinais em relação à dieta (ASANKA et al., 2011). Em suínos a redução do Vv em relação ao estágio de desenvolvimento do animal, período fetal, neonatal e pós-desmama foi observado por Van Ginneken et al. (2002).

No presente trabalho, foi observado aumento do Vv da mucosa em relação a idade (período). A resposta positiva observada apenas em S2 sugere que este segmento está mais relacionado com a absorção de nutrientes.

Tabela 20 - Volume parcial da mucosa absorptiva (média $\pm$ erro padrão) do intestino de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

Período experimental	Tratamento Experimental			Média	Efeito		
	0%	10%CBL	20%CBL		T	P	TxP
	S1						
30 dias	49,70 ± 5,49	54,32 ± 8,93	46,34 ± 4,45	50,12 ± 10,43	NS	NS	NS
60 dias	45,02 ± 2,20	56,53 ± 5,46	56,01 ± 3,71	52,52 ± 2,75			
Média	47,36 ± 2,82	55,43 ± 4,70	51,17 ± 3,37				
	S2						
30 dias	43,20 ± 4,63	42,25 ± 2,72	34,10 ± 2,07	39,43 ± 2,11	NS	*	NS
60 dias	44,67 ± 5,32	44,98 ± 2,10	50,25 ± 3,93	46,63 ± 2,19			
Média	44,08 ± 3,28	43,62 ± 1,65	42,17 ± 4,12				
	Posterior						
30 dias	54,55 ± 3,74	56,00 ± 5,60	58,23 ± 6,06	56,26 ± 2,67	NS	NS	NS
60 dias	58,89 ± 2,23	61,17 ± 3,88	64,06 ± 1,16	61,37 ± 1,53			
Média	56,72 ± 2,17	58,59 ± 3,26	61,14 ± 3,05				

*P<0,05; NS=Não Significativo (P<0,05); T= efeito do tratamento; P=efeito do período; TxP = interação entre tratamento e período

4.4 Considerações finais

O intestino da espécie estudada foi constituído por quatro camadas de tecido: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

A camada muscular se tornou mais espessa na região posterior.

A inclusão de CBL não mostrou alterações nas células caliciformes.

O Vv da mucosa parcial absorptiva aumentou na região S2 aos 60 dias, acompanhando assim o desenvolvimento dos juvenis.

Assim, a ausência de alterações significativas na histologia entérica com uso desta secreção láctea, na condição de substituto parcial da proteína na ração, representa um indicativo positivo que justifica investigações complementares considerando o desenvolvimento dos peixes.

Referências

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 16, n. 2, p. 511-521, 2001.

ASANKA GUNASEKARA, A.R.A.Y.S.; CASTELEYN, C.; BOSSIER, P.; BROECK, W.V. Comparative stereological study of the digestive tract of *Artemia franciscana* nauplii fed yeast differing in cell wall composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 324/325, p. 64-69, 2011.

BADDLEY, A.; GUNDERSEN, H.J.G.; CRUZ-ORIVE, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 258-276, 1986.

BALDISSEROTTO, B.; VAL, A.L. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Paulo, v. 62, n. 4B, p. 749-752, 2002.

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

BOSI, G.; SHINN, A.P.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PIRONI, F.; DEZFULI, B.S. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 703-711, 2005.

CAO, X.J.; WANG, W.M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of Veterinary Medicine Anatomy Histology Embryology**, Berlin, v. 38, p. 254-261, 2009.

CARDOSO, E.W. **Morfologia e ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii* Richardson, 1844 e sua relação com o hábito alimentar**. 2005. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CASTRO, N.; CAPOTE, J.; ÁLVAREZ, S.; ARGÜELLO, A. Effects of liophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3650-3654, 2005.

CRUZ, A.L.; PEDRETTI, A.C.E.; FERNANDES, M.N. Stereological estimation of the surface area and oxygen diffusing capacity of the respiratory stomach of the air-breathing armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei: Loricariidae). **Journal of morphology**, New York, v. 270, p. 601-614, 2009.

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

DELASHOUB, M.; POUSTY, I.; BANAN KHOJASTEH, S.S. Histology of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) intestine. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 5, n. 6, p. 302-306, 2010.

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

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study **Acta Histochemica**, Jena, v. 110, p. 76-85, 2008.

EMERSON, L.S.; GREER WALKER, M.; WITTHAMES, P.R. A estereological method for estimating fish fecundity. **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 721-730, 1990.

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

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Enfield: Science Publ., 2009. 215 p.

GOLD, D.V.; DAN SHOCHAT, E.; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin: evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 12, p. 6354-6358, 1981.

HERNÁNDEZ, D.R.; PÉREZ GIANESELLI, M.; DOMITROVIC, H. Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of South American Catfish (*Rhamdia quelen*). **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 27, n. 1, p. 105-111, 2009.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **British Journal of nutrition**, Cambridge, v. 89, p. 597-606, 2003.

LEV, R.S.S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, Baltimore, v. 12, p. 309, 1964.

MAKINO, L.C. **Estrutura, ultraestrutura e histoquímica do aparelho digestório do *Prochilodus lineatus*. Análise da diversidade da microbiota intestinal de *Prochilodus lineatus* e *Pterygoplichthys anisitsi***. 2010. 111 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

MARCHETTI, L.; CAPACCHIETTI, M.; SABBieti, M.G.; ACCILI, D.; MATERAZZI, G.; MENGHI G. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1808-1821, 2006.

MAYHEW, T.M.; MIDDLETON, C. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat: a stereological study of their variability within and between animals. **Journal of Anatomy**, London, v. 141, p. 1-1, 1985.

MORETTI, D.B.; NORDI, W.M.; LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; MACHADO-NETO, R. Enterocyte IgG uptake in the small intestine of goat kids during the period of passive immunity acquisition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 114, p. 182-187, 2013.

MYERS, R.B.; FREDENBURG, J.L.; GRIZZLE, W.E. Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008, chap. 11, p. 161-187.

NAKATAMI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NORDI, W.M.; MORETTI, D.B.; LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Intestinal histology of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v. 58, n. 5, p. 232–241. 2013.

OGIOLDA, L.; WANKE, R. ROTTMANN, O.; HERMANN, W.; WOLF, E. Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. **The Anatomical Record**, New York, v. 250, p. 292-299, 1998.

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

PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O.; DELGADO, E.F.; CYRINO, J.E.P.; MACHADO-NETO, R. Growth performance and muscle protein, RNA and DNA content in juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) fed lyophilized bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 89-89, 2007.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R.A.F.; OLIVEIRA, M.H.; SILVA, M.W. The hepatocytes of the brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*): a quantitative study using design-based stereology. **Histology Histopathology**, Madrid, v. 16, p. 423-437, 2001.

RODRIGUES, A.P.O.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; CYRINO, J.E.P.; DELGADO, E.F.; MACHADO-NETO, R. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 559-563, 2009.

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

SALAMAT, N.; DARBEH, R.; MAJD, N.E.; SAFAHIEH, A.R. Histological aspects of gut associated lymphoid tissue in *Acanthopagrus latus*. **Global Veterinary**, Deira, Dubai, v. 7, n. 4, p. 381-385, 2011.

SHIRAISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, D.J.A. Morphometric analysis of the intestinal wall and the dynamic of mucins secreted in the chicken ileum infected with *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2146-2153, 2009.

SPICER, S.S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 8, p. 18-34, 1960.

TAKASHIMA, F.; HIBYA, T. **An atlas of fish histology**: normal and pathological features. 2nd ed. Tokyo: Kondansha; Stuttgart; New York: Fisher, 1995. 213 p.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; WEYNS, A. Stereological characteristics of pig small intestine during normal development. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 47, n. 4, p. 868-878, 2002.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI, E.F. Biologia e cultivo do dourado. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria. Ed da UFSM, 2010. cap. 9, p. 245-282.

WILSON, J.M.; CASTRO, L.F.C. Morphology diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: CROSSEL, M.; FARRELL, A. P.; BRANER, C.J. (Ed.). **Fish physiology**: the multifunctional gut of fish. London: Elsevier, 2011. p. 2-56.

APÊNDICE

Análise estereológica dos segmentos intestinais