

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Camila Santos Franco

**Avaliação da hematologia, morfologia intestinal e
desempenho de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)
suplementadas com β -glucano e submetidas a estresse de
manejo**

Dracena

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Camila Santos Franco

**Avaliação da hematologia, morfologia intestinal e
desempenho de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)
suplementadas com β -glucano e submetidas a estresse de
manejo**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas
– Unesp, Câmpus de Dracena como parte das
exigências para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Jaqueline Dabello Biller
Co-orientadora: Me. Ingrid Camargo dos Reis

Dracena

2023



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da hematologia, morfologia intestinal e desempenho de tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com β -glucano e submetidas a estresse de manejo.

Modalidade: Trabalho de Atividade de pesquisa

Autor: Camila Santos Franco

Orientador (a): Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller

Co-orientador(es): Me. Ingrid Camargo dos Reis

Número de Créditos: 15

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 11 / 05 / 2023

Dra. Jaqueline Dalbello
Biller



Documento assinado digitalmente
BASIA SCHLICHTING MOROMIZATO
Data: 12/05/2023 13:22:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestranda Basia
Schlichting Moromizato

Doutoranda Melissa
Alexandre Santos

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Santos Franco, nascida em 13 de fevereiro de 1999, na cidade de Panorama/SP. Ingressou no curso de Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp/Dracena no ano de 2019.

No ano de 2020 tornou-se bolsista do Programa de Educação Tutorial – Zootecnia (PETZOO), onde desenvolveu atividades sociais e acadêmicas, tais como organização de eventos científicos e apresentação de trabalho científico em congressos exclusivos para grupos PET. Também por meio do PET, foi responsável pelo programa intitulado PET na Escola, que visou levar a alunos do ensino médio de escolas públicas da região de Dracena, o conhecimento sobre o curso de Zootecnia e o Campus de Dracena, onde foi contemplada com uma bolsa PROGRAD 22/23 para desenvolver esse trabalho.

Também realizou atividades junto aos grupos de estudos da unidade, em setores de piscicultura, avicultura e bovinocultura de corte, em especial o Laboratório de Imunologia Animal – LIA, onde produziu uma Iniciação Científica Sem Bolsa, que foi apresentada no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

Já no campo profissional, teve a oportunidade de exercer o cargo de assistente de marketing, com foco em empresas do agro, realizando atividades de social média, participando de análises e planejamento de ações de marketing.

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre se mantiveram ao meu lado independente das adversidades, sendo minha fonte de inspiração e força para chegar ao final desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro, agradeço a Deus, por me sustentar em toda essa trajetória.

A minha família, meu pai Adriana e Amauri pela base em educação, respeito e valores, minha irmã Gabriela, que me ensina todos os dias o significado do amor, cuidado e amizade, ao nosso gato Januario, que é meu apoio emocional em todos os momentos.

A Débora Barrozo, que é uma grande companheira em todos os momentos, e tem sido fundamental em minha vida desde que a conheci.

Aos meus amigos Alexia, Andressa, Sara, Isabelle e Leonardo, por sempre estarem presentes em minha vida, independente da distância física, me apoiam e me dão suporte desde a infância e adolescência.

A XVIII Turma de Zootecnia, em especial aos meus amigos Lana, Eduardo, Raphael, Maysa, Laura, João Paulo, Pietra e Isabele, pelas trocas e ensinamentos.

A república Só Fadinhas, que sempre me acolheu de braços abertos e se tornou minha segunda casa.

Aos meus veteranos que se tornaram amigos, e me apoiaram em muitos momentos, em especial a Fernanda Dourado, Ana Flavia Patini, Mayara Shiguematsu e Myrella Maltez.

A todos os funcionários da faculdade, em especial os colaboradores da biblioteca e da administração, que foram fundamentais para minha formação tornando-se meus amigos.

Ao grupo PET ZOO, que me ensinou muito sobre respeito e trabalho em conjunto, me proporcionou ótimos momentos em grupo e uma evolução profissional e acadêmica, mencionando honrosamente a Prof. Dra. Carolina Bonini, que me tutorou durante todos esses anos e se tornou uma grande mãe universitária.

Ao Laboratório de Imunologia Animal – LIA, pela oportunidade de desenvolver este projeto, em especial a minha Orientadora Prof. Dra. Jaqueline Biller, minha Co-orientadora Mestre Ingrid Reis, e as minhas parceiras de trabalho Basia e Simone, por todo apoio, ensinamentos e disposição em propagar conhecimento.

A todos os grupos de estudos onde tive a oportunidade de exercer atividades, e ampliar meus horizontes acadêmicos e profissionais.

A todos os professores que passaram pela minha vida em todos os momentos, todos eles têm um espaço em meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo n. 2012/22016-3.

“Irmão, você não percebeu, que você é o único representante do seu sonho na face da terra. Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai.” (EMICIDA, 2014).

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do B-glucano administrado antes e após estresse de manejo, sobre a imunidade de tilápias, *Oreochromis niloticus*" (Effect of B-glucan administered before and after management stress, on the immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*), registrada com o nº 07/2020.R2 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Jaqueline Dalbello Biller** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em 25/11/2020.

Dracena, 25 de novembro de 2020.



Prof. Dr. Danilo Domingues Millen
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

RESUMO

O desenvolvimento da tilapicultura traz consigo a preocupação com a saúde dos animais, já que a intensificação da produção causa estresse que atinge o sistema imune do animal. Na tentativa de diminuir a imunossupressão, tem se tornado frequente a utilização de imunostimulantes na dieta, em especial o β -glucano. O experimento apresentado buscou analisar parâmetros hematológicos, morfologia intestinal e desempenho de tilápias-do-Nilo alimentadas com β -glucano e desafiadas com manejos estressantes. Realizado nas dependências da FCAT - UNESP/Dracena, o experimento utilizou 408 tilápias juvenis, distribuídas em 24 caixas, com a densidade de 17 peixes por caixa, submetidos a 8 tratamentos, onde C15, C15D, C30 e C30D, receberam dieta controle por 15 e 30 dias, sendo C15D e C30D desafiados com manejos estressantes aos 14 e 29 dias. Já os tratamentos β 15, β 15D, β 30 e β 30D, receberam dieta experimental (1 g kg^{-1} de β -glucano), nos quais β 15D e β 30D foram desafiadas com manejos estressantes aos 14 e 29 dias. As coletas ocorreram aos 15 e 30 dias, e em cada procedimento foi realizado a biometria dos animais, coleta de sangue e das porções anteriores e posteriores do intestino, além de avaliações de desempenho zootécnicos que eram realizadas diariamente. Para os parâmetros hematológicos, foram determinados a porcentagem de hemácias no sangue por meio de centrifugação dos capilares, o número de eritrócitos pela câmara de Neubauer, concentração de hemoglobina, número de células total e diferencial em extensões sanguíneas. Em relação aos parâmetros histológicos, as partes do intestino passaram por desidratação em álcool e fixação em xilol, logo após foram inclusos em parafina, cortados no micrótomo com espessura de $7 \mu\text{m}$, e corados em hematoxilina eosina para a microscopia de luz. O desempenho zootécnico foi avaliado por cálculos de ganho de peso, taxa de crescimento específico, consumo alimentar diário, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica e fator de condição. As análises estatísticas foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5%. As variáveis expressas no trabalho, não apresentaram resultados significativos, apenas alterações nas médias histológicas intestinais e hematológicas. Concluindo que o β -glucano não causou nenhuma mudança nas variáveis analisadas.

Palavras-chave: Imunostimulante. Imunidade. Estressores. Peixe.

ABSTRACT

The development of tilapia aquaculture brings concerns about the health of the animals, given that the production intensification can cause stress which affects the animals' immune system. In the attempt to mitigate immunosuppression, has become common the use of immunostimulants in the diet. The stated experiment aimed to analyze hematological parameters, intestinal morphology and the performance of Nile tilapia fed with β -glucan and challenged with stressful management. Conducted at the FCAT-UNESP/Dracena facilities, the experiment used 408 juvenile tilapias, distributed in 24 boxes, with a density of 17 fish per box subjected to 8 treatments, where C15, C15D, C30, and C30D, received the control diet for 15 and 30 days, being C15D and C30D subjected to stressful management at 14 and 29 days. The β 15, β 15D, β 30 and β 30D treatments received an experimental diet (1g kg^{-1} of β -glucan) where β 15D and β 30D were subjected to stressful management at 14 and 29 days. The collection occurred at 15 and 30 days, and in each procedure was realized the biometry of the animals, blood collection and collection of the anterior and posterior portions of the intestine, as well as daily evaluations of zootechnical performance. For the hematological parameters, were determined the percentage of red blood cells in the blood using capillary centrifugation, the number of erythrocytes using a Neubauer chamber, hemoglobin concentration, total number of cells and differential cell count. In relation to the histological parameters, the intestinal sections passed by dehydration in alcohol and fixed in xylene, right after were included in paraffin, cut in the microtome with $7\ \mu\text{m}$ -thick sections, then stained with hematoxylin and eosin for light microscopy. The zootechnical performance was evaluated by calculating weight gain, specific growth rate, daily food consumption, food conversion, protein efficiency rate and the conduction factor. The statistical analysis were compared by the Tukey's range test at 5%. The variables expressed in this study did not show significant differences, only changes in average intestinal histology and hematology. We conclude that β -glucan did not cause any significant changes in the analyzed variables.

Keywords: Histology. Immunity. Weight gain. Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Largura e altura do intestino de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas à desafios de manejo.....	35
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano..... 29
- Tabela 2** - Variáveis histológicas do intestino de tílapias alimentadas com ração controle ração com β -glucano, durante 15 e 30 dias..... 34
- Tabela 3** - Variáveis hematológicas de tílapias alimentadas com β -glucano, durante 15 e 30 dias, e desafiados com manejos de estresse.. 37
- Tabela 4** - Variáveis de desempenho zootécnicos de tilápias alimentadas com β -glucano, durante 15 e 30 dias, e desafiadas com estresse de manejo..... 38

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAMPs	Padrões Moleculares Associados à patógenos
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
UFC	Unidade Formadora de Colônia
pH	Potencial Hidrogeniônico
H.E	Hematoxilina Eosina
NE	Número de Eritrócitos
CGE	Célula Granulocítica Especial
GP	Ganho de Peso
TCE	Taxa de Crescimento Específico
CAD	Consumo Alimentar Diário
CA	Conversão Alimentar
TEP	Taxa de Eficiência Proteica
K	Fator de Condição
MOS	Mananoligossacarídeos
RBC	Contagem Total de Glóbulos Vermelhos
HB	Hemoglobina
HT	Hematócrito

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
\pm	Mais-menos
®	Registro de marca
μ	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Tilápia-do-Nilo	20
3.1.1 Imunoestimulantes	21
3.1.2 β -glucano	23
3.1.3 Sistema Imune	24
3.1.4 Intestino	26
3.1.5 Hematologia	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Instalação	29
4.2 Animais	29
4.3 Dieta	29
4.4 Delineamento Experimental	30
4.5 Desafio de Estresse e Infecção Experimental	31
4.6 Descrição das Análises	32
4.6.1 Preparação e processamento das amostras para observação ao microscópio de luz	32
4.6.2 Análise Quantitativa das Lâminas Histológicas	32
4.6.3 Análises Hematológicas	32
4.6.4 Desempenho Zootécnico	33
4.6.5 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1 Variáveis Histológicas.....	35
5.1.2 Variáveis Hematológicas	37
5.1.3 Variáveis de Desempenho.....	38
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO.....	52

1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola tem se desenvolvido rapidamente, pelos seus meios de produção acessíveis economicamente, que geram alta produtividade e boa qualidade dos produtos finais (SIQUEIRA, 2017). A aquicultura obteve um crescimento de 5,3% ao ano entre 2001 e 2018, sendo a piscicultura responsável por 46,0% e por essa produtividade o Brasil ocupou 13º lugar no ranking mundial (FAO, 2020). Destaca-se dentro da piscicultura a criação de tilápias segundo a Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2021), a produção de tilápia passou de 6,2 milhões toneladas no ano de 2020.

A tilápia é um peixe extremamente comercializável, por diversos pontos, tais como possibilidade de produção em sistemas intensivos e extensivos, suportar altas temperaturas, ter uma produção de manejo simples e custos acessíveis, com excelentes índices reprodutivos, além de atingir seu peso ideal precocemente e chamar atenção pela ausência de espinhos intramusculares. Mas mesmo com todas as suas qualidades ainda é um animal suscetível a doenças quando exposto a sistemas de criação intensivos (MIANI VERRI, 2022).

A intensificação da produção leva a problemas sanitários, já que os peixes ficam expostos a situações de estresse, deixando o animal sujeito a agentes causadores de enfermidades, resultando prejuízos econômicos (DOTTA; PIAZZA, 2012; LEIRA *et al.*, 2017). Como forma de reduzir o aparecimento de doenças e consequentemente perdas econômicas, utiliza-se imunostimulantes. Os imunostimulantes são capazes de atuar em mecanismos de defesa específicos e não específicos dos animais, fortalecendo a resposta imune (SAURABH; SAHOO, 2008).

A alternativa mais procurada na criação de peixes, tem sido o β -glucano proveniente da parede celular de leveduras, já que age na prevenção de doenças por elevar a imunidade inespecífica do animal (FALCON, 2007). O β -glucano atua sobre o sistema imune, sobre variáveis hematológicas e tecidos produtores de muco, como o intestino, além de elevar o desempenho zootécnico dos peixes que recebem o imunostimulante em sua dieta.

Sousa (2010) relata em seu trabalho que tilápias alimentadas com β -glucano durante 60 dias, apresentaram peso e comprimento acima da média, além de vilos intestinais maiores e em maior quantidade. Aramli *et al.* (2015) também observou os

mesmos efeitos positivos do β -glucano sobre o desempenho, além de salientar a melhora hematológica dos animais, que apresentaram um aumento de glóbulos brancos e linfócitos.

Dawood *et al.* (2020a) também observaram respostas positivas em variáveis hematológicas de tilápias alimentadas com 500mg por kg de β -glucano na dieta por 60 dias, relatando maiores níveis de hemoglobina e hemácias.

Apesar de ser um excelente método para estimular o sistema imune, deve-se atentar a pontos como quantidade e tempo ofertado, para que não haja efeito contrário ou inexistente. Com isso se ressalta a importância de estudos com foco no monitoramento de parâmetros histológicos, hematológicos e zootécnicos, diante do uso de β -glucano, em associação com manejos estressantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar variáveis histológicas do intestino, hematológicas e de desempenho de tilápias alimentadas com β -glucano, durante 15 e 30 dias, submetidas a estresse de manejo.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a altura e largura de vilosidades das porções anterior e posterior do intestino;
- Analisar o hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, número de células totais e diferenciais;
- Avaliar o ganho de peso, taxa de crescimento específico, consumo alimentar diário, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica e fator de condição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tilápia-do-Nilo

A tilápia do Nilo é de naturalidade africana, e classificada como uma espécie tropical (TREWAVAS, 1983). Foi introduzida no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), no ano de 1971, visando o estímulo da produção aquícola no Nordeste (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2021). Ajustam-se com facilidade a diferentes sistemas produtivos e a variações nos aspectos qualitativos da água, possuem aceitação do mercado consumidor, além de serem alvo de desenvolvimento tecnológico produtivo (MORO *et al.*, 2013).

A tilápia é um animal que exibe parâmetros excelentes, para cultivos com fins lucrativos, tais como, adaptabilidade a adversidades ambientais, rápido desenvolvimento corporal, rusticidade e tolerância ao estresse causado pelo manejo de rotina (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; PRABU *et al.*, 2019; SANTOS; LOURENÇO; IGARASHI, 2007). É capaz de se reproduzir em ambientes controlados, possui hábitos alimentares onívoros, o que contribui na introdução de dietas comerciais (EL- SAYED, 2006).

É um peixe que se destaca na aquicultura, por atingir os parâmetros de aceitação do mercado, já que seu filé não apresenta de espinhos em forma de “Y” (HILSDORF, 1995; BOSCOLO *et al.*, 2004). A carne proveniente do pescado é fonte de vitaminas A, B e D, minerais, aminoácidos e ômega 3 (FAO, 2020).

A aquicultura brasileira, tem se aperfeiçoado na tilapicultura, por conta das qualidades da espécie, o que levou a mesma a se destacar na aquicultura brasileira como cultivo predominante (EMBRAPA, 2017). Ao comparar dados dos anos de 2019 e 2020, notou-se um progresso de 12,5%, com uma produção de 486.155 toneladas em 2020, constituindo 66,6% da produção total de peixes no Brasil. (PEIXE BR, 2020).

Ao analisar os dados produtivos de cada estado, temos em destaque o Paraná, que produziu em torno de 172 mil toneladas no ano de 2020, em seguida o estado de São Paulo, com um progresso de 20% em sua produção em 2020. Esse crescimento é correlacionado a normatização ambiental, investimentos públicos e escoamento do produto, já que é um polo de consumo de pescados (SNA, 2021). Dentro desse

crescimento, alguns fatores chamam atenção, em especial a sanidade (GUDDING; VAN MUISWINKEL, 2013; OSMOND; COLOMBO 2019).

A intensificação da produção pode desencadear condições de estresse, como o desbalanço alimentar, variações na temperatura da água, excesso de matéria orgânica e poluição no ambiente aquático, e tornam o ambiente propício para patógenos, que afetam a saúde dos peixes, levando infecções e mortalidade (YU *et al.*, 2007; DASH *et al.*, 2009). O aumento da densidade em um sistema produção busca, torná-lo mais eficiente, mas altas densidades, associado a manejos de rotina, transporte e manipulação dos peixes, causa déficit no funcionamento do sistema imune, tornando-os mais suscetíveis a doenças (SAKAI, 1999; PAVANELLI *et al.*, 2008; URBINATI *et al.*, 2004).

Os principais agentes patógenos encontrados em pisciculturas são fungos, vírus, parasitos e bactérias (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009). Doenças bacterianas, podem ocasionar prejuízos na produção, e elevar as taxas de mortalidade nas pisciculturas ou podem deixar sequelas que impedem a chegada do produto final às prateleiras (LEIRA *et al.*, 2017). As bactérias que mais acometem as pisciculturas são dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Streptococcus*, *Edwardsiella* e *Francisella* (SILVA, 2020).

Como tentativa de conter os prejuízos causados pelos patógenos nas produções e causar uma melhoria no bem-estar dos animais, tem se aumentado o uso de imunoestimulantes, que além de causar resistência aos patógenos, leva a substituição dos antibióticos. Os imunoestimulantes são oferecidos com o intuito de prevenir doenças causadas pelos patógenos, pois agem elevando a imunidade, e causando respostas fisiológicas mais acentuadas (DÜGENCI *et al.*, 2003).

3.1.1 Imunoestimulantes

Os imunoestimulantes são usados com a finalidade de prevenir a ação de agentes patogênicos no organismo animal e melhorar as variáveis de desempenho zootécnicos. Bem como a busca por uma alimentação nutricionalmente adequada e sem muito custo, traz a utilização de suplementos, entre eles os imunomoduladores, que além de reduzir as enfermidades, é capaz de aumentar o desempenho zootécnico e a taxa de sobrevivência (SOUSA, 2010).

A oferta dos imunostimulantes na alimentação de peixes, tem por objetivo de melhorar os mecanismos de defesa inespecífica, que são importantes na profilaxia de diferentes organismos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2003).

Na aquicultura podem ser administrados pelo alimento (via oral), sendo a maneira mais prática, que abrange a maior quantidade de animais, além de causar menos estresse; por banhos de imersão, que apesar de apresentar eficácia pode ser dificultado ao medir a dosagem conforme quantidade de água; ou de forma injetável, a maneira mais eficaz, entretanto a mais estressante, e a forma de ação pode variar conforme o meio de administração (RODRIGUES *et al.*, 2020). Os compostos imunostimulantes ativam leucócitos ao se conectarem com a sua membrana, promovendo efeitos positivos no funcionamento de macrófagos, neutrófilos e monócitos, além ampliarem a produção de lisozimas, linfócitos e anticorpos (SAKAI, 1999).

Apesar de serem utilizados em todas as fases de vida do animal, os imunostimulantes são indicados para etapas nas quais os peixes se encontram mais sensíveis a doenças, sendo elas a etapa de larvicultura e alevinagem (CHAGAS *et al.*, 2014; VASEEHARAN *et al.*, 2013). Quando aplicado por um tempo prolongado, causa tolerância no organismo e desencadeia respostas imunossupressoras (SHAKYA *et al.*, 2014; SELVARAJ *et al.*, 2015).

Os imunostimulantes são classificados pela sua composição, como os compostos químicos sintéticos, fatores nutricionais quando se trata de vitaminas, hormonais ou substâncias biológicas que são oriundas de bactérias, polissacarídeos, vegetais ou animais (SAKAI, 1999; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Apesar dos efeitos benéficos na imunidade dos animais, os compostos químicos levam à resistência bacteriana, e dificultam a saída comercial do produto, por deixarem resquícios no filé, promovendo malefícios para a saúde humana (CABELLO, 2006; ROMERO *et al.*, 2012). Estudos mostram que imunostimulantes de origem biológica promovem ação antiparasitária e antimicrobiana, sem causar danos ao meio ambiente e a saúde humana (CHAGAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Apresentam ação positiva comprovada sobre o sistema imune de peixes, as substâncias biológicas oriunda do alho (*Allium sativum*), nim (*Azadirachta indica*), linhaça (*Linum usitarissimim*), gengibre (*Zingiber officinale*), babosa (*Aloe barbadensis*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*),

leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e outros (LIMA, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Ressalta-se o uso de β -glucano procedente da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), como imunoestimulante na aquicultura, por ser um composto biológico que não apresenta resquício no produto final e não altera a qualidade da água, além de ser uma medida profilática, pois atua na imunidade não específica do animal (FALCON, 2007).

3.1.2 β -glucano

Historicamente data-se o início dos estudos com glucanas entre os anos de 1960 e 1970 (VOLOSKI, 2018). São descritos como polissacarídeos, constituídos por ligações β -1,3 e β -1,6, suscetíveis a variações estruturais conforme sua origem, o que também causa mudanças na sua forma de ação no sistema imune (PILARSKI *et al.*, 2017). Fungos, plantas e leveduras agem como fontes de β -glucano, já que os polissacarídeos fazem parte da estrutura da parede celular (LOPES, 2018).

São identificadas como PAMPs (Padrões Moleculares Associados à patógenos) pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) presente nas células, e causa uma estimulação que gera respostas imunes inatas (VOLOSKI, 2018; LOPES, 2018). β -glucanos se conectam aos receptores específicos dos macrófagos, estimulando a fagocitose, o que aumenta o ataque aos patógenos. Elevam a fabricação de proteínas do sistema complemento e das lisozimas, além de ser capaz de reduzir as respostas a estímulos estressantes (MELLO, 2016; GARCIA, 2008). A administração de imunoestimulantes, visa não só a imunomodulação, mas também a diminuição da imunossupressão causada pelo estresse (ANDERSON, 1992).

A atuação do β -glucano no organismo depende da via de administração, sendo possível via oral, injeção ou imersão (FALCON, 2007; REIS, 2021). A oferta de glucano via oral se torna mais eficaz, já que atinge o maior número de peixes, com um menor custo e estresse (GUSELLE *et al.*, 2007).

Os resultados do β -glucano podem ser afetados pela quantidade ofertada, baixas concentrações em um pequeno espaço de tempo aumentam a resposta imune, enquanto altas concentrações em grandes períodos, leva imunossupressão, consumo

de reservas de energia e exaustão do sistema imune (ROBERTSEN *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1999; BAGNI *et al.*, 2005)

Tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas enriquecidas com β -glucano, pelo período de seis semanas apresentaram alta na taxa de monócitos circulantes, notou-se também uma visível queda no cortisol do organismo, a partir da terceira semana de administração do composto, que também na redução do estresse (CAIN *et al.*, 2003). O β -glucano administrado em *Clarias batrachus*, durante 21 dias demonstrou resultados positivos na ação imunoestimulante, beneficiando a resistência a doenças e a imunidade não específica (KUMARI; SAHOO., 2006).

β -glucano é capaz de promover melhorias na saúde do animal, já que causa efeitos positivos na absorção do intestino delgado, e estimula as bactérias benéficas que habitam o sistema gastrointestinal (SILVA, 2021). Ao receber β -glucano durante 60 dias via dieta, tilápias-do-Nilo apresentaram maiores medias de peso e comprimento, além de apresentar mudanças positivas na densidade e comprimento de vilos, analisadas na morfologia do intestino, quando comparados com animais que não receberam o composto na dieta (SOUSA, 2010). Tilápias-do-Nilo demonstram melhorias no sistema imune e nos índices de desempenho, após alimentação com β -glucano (PILARSKI *et al.*, 2017)

3.1.3 Sistema Imune

O sistema imune tem função protetora, defendendo o organismo animal contra patógenos, células malignas e toxinas (REIS, 2021). Sua eficiência pode sofrer interferência de diversos fatores, tais como agentes estressores, micro e macronutrientes, sazonalidade, ações hormonais, tempo de exposição ao agente estressor, tudo isso pode levar a respostas positivas ou negativas do sistema (FLETCHER, 1997; VERLHAC; GABAUDAN, 1997).

Classifica-se a resposta imune em dois tipos, a inata (não específica), que age de maneira rápida e constante diante de agentes estressores, e a resposta adaptativa (específica), que apesar de responder lentamente, atua sobre um agente específico e a partir disso gera memória imune (BEN-SHAANAN *et al.*, 2016). Mesmo com essa separação de classes dentro do sistema imune, quando o organismo é atingido por

um patógeno, o sistema imune atua de forma global para combater o estressor, e esses mecanismos podem agir juntos ou separados (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

A resposta adquirida, forma anticorpos e memória imunológica, por meio da identificação dos patógenos pelas células presentes no sistema imune, essa resposta também se divide, entre humoral e celular, que agem em conjunto (SECOMBES, 1996). A resposta adquirida conta com os linfócitos B e T, onde os linfócitos B se dividem, e dão origem aos plasmócitos e células de memória, que produzem anticorpos específicos contra os antígenos, as células de memória respondem rapidamente quando expostas aos antígenos. E os linfócitos T, atuam reconhecendo os antígenos que entram em contato com os receptores dos macrófagos (células fagocíticas), fazendo com que eles se multipliquem (BILLER, 2008).

O sistema inato é composto por barreiras físicas, como o tegumento (pele e muco), células dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, citocinas, lisozima e sistema complemento, que agem fagocitando e exterminando agentes estressores (LOPES, 2018). O sistema inato é dividido em imunidade humoral e celular (BILLER, 2008).

A imunidade celular é representada por células de defesa, tais como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e células citotóxicas, que tem origem de produção em tecidos linfóides, sendo eles rim, baço e timo (EVANS, 1997). Já a imunidade humoral é caracterizada por substâncias não específicas presente em fluidos corpóreos, tais como muco, soro e ovos de peixes, contamos com a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento. E agem inibindo a proliferação de patógenos no organismo animal (BILLER, 2008).

O sistema complemento se destaca dentro dos mecanismos de respostas imunes, pois age na linha inata e adquirida, sendo composto por um conjunto de proteínas séricas e de membrana (RIBEIRO, 2019).

A lisozima tem uma função relevante, por ser uma enzima com ação bactericida, atuando sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas, com ação antiviral e antiparasitária, se encontra em muco, saliva e sangue. Em peixes, a lisozima é produzida em grande quantidade em neutrófilos, monócitos e macrófagos, tendo como o órgão de principal secreção os rins anteriores, seguido por trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (MURRAY; FLETCHER, 1976; LIE *et al.*, 1989; PALAKSHA *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2019).

3.1.4 Intestino

O intestino é uma parte do trato gastrointestinal (CRUZ, 2018), é um tubo longo em espiral, chegando a ser de 7 a 13 vezes maior que o corpo de uma tilápia adulta, exercendo a função de complementar a digestão feita pelo estomago, além de apresentar órgão linfóide associados a mucosa (ZAPATA *et al.*, 1996; SOUSA, 2010), sendo essa mucosa de suma importância imunológica para os peixes (CHAGAS, 2010).

A morfologia do intestino é classificada em três partes, a região proximal atua na finalização da digestão, início da absorção e secreção mucosa, já a região medial absorve nutrientes e produz grandes quantidades de muco, enquanto o segmento posterior é responsável por absorver macromoléculas proteicas (STROBAND; VAN DER VEEN, 1981; GONÇALVES *et al.*, 2013). De forma histológica, o intestino dos peixes é classificado em camadas, que se diferenciam pelos tecidos que os compõem. O epitélio intestinal de peixes é composto por mucosa, submucosa, muscular e serosa (CRUZ, 2018).

A camada mucosa é composta por tecido epitelial simples cilíndrico com microvilosidades, capazes de aumentar a superfície de contato, tornando a absorção e secreção mais eficientes (GENTEN *et al.*, 2009; CRUZ, 2018). O epitélio intestinal apresenta enterócitos, que são células de revestimento, tem formato cilíndrico e função absorptiva. Na parte apical, localizada entre os enterócitos, é encontrada as células caliciformes, com função de produzir o muco que protege e lubrifica o canal intestinal (BIDO, 2020).

O muco do intestino é rico em componentes do sistema imune inato, tais como, proteínas do sistema complemento, lisozima e imunoglobulinas (REIS, 2021). As lisozimas possuem ação bactericida, erradicando bactérias gram-positivas e negativas (REIS, 2021), as proteínas do sistema complemento atuam na quimiotaxia de leucócitos, na fagocitose de patógenos, além de serem anti-inflamatórias (ROED *et al.*, 1992).

O aumento das vilosidades da camada mucosa, aumenta a superfície de contato, favorecendo a absorção de nutrientes (CASPARY, 1992). A administração do β -glucano, pode levar a modificações no epitélio intestinal, e isso pode melhorar diretamente o desempenho animal, pelo maior aproveitamento de nutrientes (CEROZI, 2012).

3.1.5 Hematologia

Classificado como um tecido conjuntivo, o sangue, se mantém em equilíbrio com os demais tecidos do organismo (MUZZOLON, 2018), A porção líquida é a matriz extracelular (plasma) constituído por 90% de água e 7% de proteína sendo elas globulinas e albuminas, já a porção figurada do sangue é formada por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (RANZANI-PAIVA, 1996; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

O sangue é um condutor de gases respiratórios, produtos do metabolismo celular, nutrientes e atua na imunidade do organismo (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013), sendo um importante mecanismo de homeostase do corpo animal (KALASHNIKOVA, 1979). Análises de sangue tem como função de reconhecer alterações fisiológicas desencadeadas por circunstâncias estressantes, como doenças, manejos de rotina, exposições a metais e outros (CHAGAS, 2010).

Os eritrócitos (glóbulos vermelhos), são as células em maior quantidade no sangue, tem formato oval, núcleo localizado ao centro também em formato oval, com cromatina compacta e ausência de nucléolos, sendo essa célula responsável pelo transporte de oxigênio e uma porção do gás carbônico no sangue para os tecidos, isso acontece por meio da ação da hemoglobina presente no interior dos eritrócitos (TOCIDLOWSKI *et al.*, 1997; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Os leucócitos (glóbulos brancos) são representados pelos linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos (SOUSA, 2010), atuam na resposta imune do organismo e no reconhecimento de antígenos (MUZZOLON, 2018). Entre as células leucocitárias, os linfócitos são a maior parte da população, em tilápia se encontram em tamanhos grandes, onde seu núcleo é redondo, possuem um padrão de cromatina aberto, citoplasma abundante, enquanto em linfócitos pequenos o núcleo é escuro, redondo ou oval e seu padrão de cromatina é condensada (HINES; YASHOUV, 1970; ALKAHEM, 1994; HRUBEC *et al.*, 2000; BORGES, 2005).

Monócitos e neutrófilos realizam fagocitose, sendo os monócitos migratórios do sangue para outros tecidos, reconhecidos por serem células avantajadas e de formato circular, são os principais agentes de fagocitose em peixes, já os neutrófilos podem ser diferenciados por conterem núcleo de formato irregular e diferentes projeções de citoplasma, já que seu formato também é circular (MUZZOLON, 2018). Neutrófilos por serem células que realizam fagocitose, atuam contra infecções (LEHMANN *et al.*, 1987).

Trombócitos são reconhecidos pelo seu formato elíptico, núcleo fusiforme e hipercorados (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os trombócitos em peixes exercem atividades semelhantes às plaquetas em animais mamíferos, sendo coagulantes sanguíneos e atuando no sistema imune inato (STOSIK *et al.*, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação

O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Imunologia Animal – LIA, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Campus de Dracena, São Paulo. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno de 130L, que foram armazenadas no biotério e tampadas com telas impedindo a perda dos peixes. O sistema de água era de renovação diária e monitorado regularmente; a temperatura mantida a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Houve a instalação de luminárias e a cobertura das janelas, garantindo 12h de iluminação artificial e homogênea entre aos animais.

4.2 Animais

Para realizar o experimento foram utilizadas 408 tilápias juvenis, revertidas, provenientes de piscicultura da região de Santa Fé do Sul - SP, com o peso inicial médio de 80g. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas, contendo 17 peixes em cada caixa e alimentados durante 3 semanas com dieta comercial para o período de aclimação e, somente após esse período é que o experimento foi iniciado.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais, no dia 25/11/2020, registrada com o nº: **07/2020.R2 - CEUA**.

4.3 Dieta

Para o presente experimento, foram confeccionadas duas dietas: Uma dieta controle (livre de β -glucano) e uma dieta experimental (0,1% de β -glucano), produzidas no Instituto de Pesca de São José do Rio Preto – SP formuladas segundo as exigências da espécie.

Em cada dieta, os alimentos foram pesados, pré-misturados e moídos em moinhos do tipo martelo contendo peneira de 0,8 mm, para que houvesse a inclusão de suplemento mineral. Posteriormente, ocorreu a inclusão de 0,1% de β -glucano. A mistura foi umedecida com água a 50°C e submetida ao processo de extrusão com matrizes de 2,5 mm, em seguidas seca em estufa de ventilação forçada por 12 horas a 55°C , levando a um produto final com aproximadamente 10% de umidade.

As dietas foram mantidas em potes de material plástico, identificados conforme o tratamento e a caixa, conservadas em refrigeração em todo o período do trabalho e passaram por pesagem diária.

Tabela 1 – Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano

Ingredientes	Ração	
	% Controle	% β -glucano
Farelo de soja	34,218	34,218
Farinha de vísceras	18,000	18,000
Milho	17,511	17,511
Farelo de trigo	9,000	9,000
Quirera de arroz	8,000	8,000
Farinha de carne e ossos	6,686	6,686
Protenose	3,446	3,446
Fosfato bicálcico	0,755	0,755
Óleo de soja	1,000	1,000
Premix	0,500	0,500
Antifúngico	0,200	0,200
Sal	0,300	0,300
DL-metionina	0,168	0,168
Antioxidante	0,050	0,050
Calcário	0,167	
Betaglucano		0,167
Total	100,00	100,000

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Delineamento Experimental

Um total de 408 tilápias juvenis, foram distribuídos em 24 caixas, na densidade de 17 peixes por caixa, divididos em 8 tratamentos:

Tratamento 1 (C15). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias e foram amostradas aos 15 dias de experimento.

Tratamento 2 (C15D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas aos 15 dias de experimento.

Tratamento 3 (β 15). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg⁻¹ de β -

glucano) por 15 dias e foram amostradas aos 15 dias de experimento.

Tratamento 4 (β 15D). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 15 dias, foram desafiadas aos 14 dias, e foram amostradas aos 15 dias de experimento.

Tratamento 5 (C30). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas aos 30 dias de experimento.

Tratamento 6 (C30D). Tilápias receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas aos 30 dias de experimento.

Tratamento 7 (β 30). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias e foram amostradas aos 30 dias de experimento.

Tratamento 8 (β 30D). Tilápias receberam dietas experimental (1g kg^{-1} de β -glucano) por 30 dias e foram desafiadas aos 29 dias, e foram amostradas aos 30 dias de experimento.

Aos 14 dias, os grupos "C15D e β 15D", e aos 29 dias, os grupos "C30D e β 30D" foram desafiados com manejos estressantes (estresse de manejo e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada). Aos 15 dias, os tratamentos C15, C15D, β 15 e β 15D, e aos 30 dias os tratamentos C30, C30D, β 30 e β 30D, quatro peixes de cada caixa ($n=12$) foram amostrados, anestesiados em solução de óleo de cravo ($1\text{g } 10\text{ L}^{-1}$ de água), para obtenção de dados de biometria por meio de pesagem em balança digital semi-analítica com precisão de $0,01\text{g}$ e medidos em ictiômetro para avaliação do desempenho zootécnico, em seguida foram coletados sangue para avaliação de variáveis hematológicas, seguida foram sacrificados e coletado o intestino para avaliação morfológica das vilosidade (largura e altura), por meio de técnica histológica.

4.5 Desafio de Estresse e Infecção Experimental

O desafio de estresse consistiu em simular alguns manejos ou episódios que são comuns no cultivo de tilápias. Para tal, os animais passaram por 12 horas de adensamento, e durante esse período, os peixes sofreram perseguição durante 10 min e exposição aérea por 3 min, repetidos no período da manhã e da tarde. Em seguida, foram injetados com $0,5\text{mL}$ de suspensão bacteriana inativada contendo $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe.

4.6 Descrição das Análises

4.6.1 Preparação e processamento das amostras para observação ao microscópio de luz

Aos 15 e 30 dias de experimento, peixes de todos os tratamentos foram amostrados e anestesiados em solução de óleo de cravo (1 g 10 L⁻¹ de água), foram coletados os intestinos para avaliação histológica e aferição das alturas e larguras das vilosidades. Para a análise histológica, os intestinos foram recortados transversalmente em seções anteriores e posteriores, e em seguida foram fixados por imersão em solução aquosa de formaldeído tamponado a 10%, 0,1M, pH 7,4, por 24 horas.

Após a fixação, o material foi processado rotineiramente para histologia, ou seja, desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanização em xilol, seguida de inclusão em Histosec®(Merck). Então foram realizados os cortes ao micrótomo, com espessura de 7 µm, que foram corados por hematoxilina eosina (H.E.) (TOLOSA *et al*, 2003).

Posteriormente, as lâminas foram analisadas e fotografadas na microscopia de luz, por meio do aparelho Leica e o programa IM50.

4.6.2 Análise Quantitativa das Lâminas Histológicas

As lâminas foram analisadas na lente de 40x, onde foi possível observar as vilosidades dos intestinos. Com o programa IM50, havendo a coleta de medidas de largura e comprimento dos vilos, contabilizando em torno de 10 a 12 vilos por amostra de anterior e posterior em cada animal.

4.6.3 Análises Hematológicas

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), concentração de hemoglobina e número de células total (eritrócitos,

leucócitos e trombócitos) e diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilo, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilo).

Na determinação do hematócrito, houve a introdução de sangue homogeneizado em capilares para microhematócrito e selando uma das extremidades do capilar, logo em seguida foram alocados na centrífuga de microhematócrito, onde passaram pelo processo de centrifugação por 5 minutos a 10.000rpm, em sequência foram avaliados com a ajuda da tabela de microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971).

Para a contagem total e diferencial de células, foram realizadas extensões sanguíneas, confeccionadas em lâminas de vidro, e secas ao ar livre, logo em seguida coradas pelo método de Rosenfeld (1947), posteriormente lidas em microscópio de luz em maior aumento, com a adição de óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos ocorreu por método indireto, quantificando as células em cada 2000 eritrócitos, por estimativa, levando em consideração o valor total de células vermelhas obtido no contador de células, enquanto o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos.

A contagem do número de eritrócitos, ocorreu com alíquotas de 10µl de sangue de cada exemplar diluídas 1990µl de solução de formol-citrato 4% (NATT; HERRICK, 1952), em seguida da homogeneização da solução, houve a contagem com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.6.4 Desempenho Zootécnico

Os peixes receberam dois tratos ao dia, sendo o primeiro no período da manhã e o segundo no final da tarde, sendo os tratos oferecidos até aparentarem saciedade, ao final do segundo trato todos os potes eram pesados em balança digital semi-analítica com precisão de 0,01g e anotados os valores em planilhas. Os animais passaram por três biometrias, sendo a primeira no início do experimento, a segunda aos 15 dias de experimento junto da primeira coleta e a terceira aos 30 dias de trabalho, junto a segunda coleta.

Foram avaliadas as seguintes variáveis zootécnicas:

- Ganho de peso: $GP (g) = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$;

- Taxa de crescimento específico: $TCE (\%) = 100 \times [(\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}) \div \text{período experimental}]$;
- Consumo alimentar diário: $CAD (\%) = 100 \times [\text{alimento consumido total (g)} \div (\text{peso inicial (g)} \times \text{período experimental})]$;
- Conversão alimentar: $CA = \text{alimento fornecido (g)} \div \text{ganho de peso (g)}$;
- Taxa de eficiência protéica: $TEP (\%) = 100 \times (\text{ganho de peso (g)} \div \text{proteína bruta consumida (g)})$;
- Fator de condição: $K = 100 \times [\text{peso}/(\text{comprimento total})^3]$.

4.6.5 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) o nível de significância adotado foi de 5%, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), através do programa estatístico SAS, versão 9.4 M7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variáveis Histológicas

Ao analisarmos as medias das variáveis histológicas (tabela 2), não notamos diferenças significativas entre tratamentos. Mas aos 30 dias é possível notar no intestino anterior, que ao compararmos a altura do tratamento controle (C) com o tratamento suplementado com β -glucano (β), nota-se uma média numericamente maiores na altura das vilosidades do tratamento suplementado.

O mesmo ocorre com a largura do intestino anterior aos 30 dias, o tratamento suplementado com β -glucano desafiado (β +D) ao ser comparado com o tratamento controle desafiado (C+D), também mostrou medias mais altas no tratamento suplementado quando comparado ao tratamento controle.

Ainda aos 30 dias, a largura do intestino posterior, apresenta medias levemente maiores nos tratamentos suplementados quando comparamos controle (C) com β -glucano (β), e controle desafiado (C+D) com β -glucano desafiado (β +D).

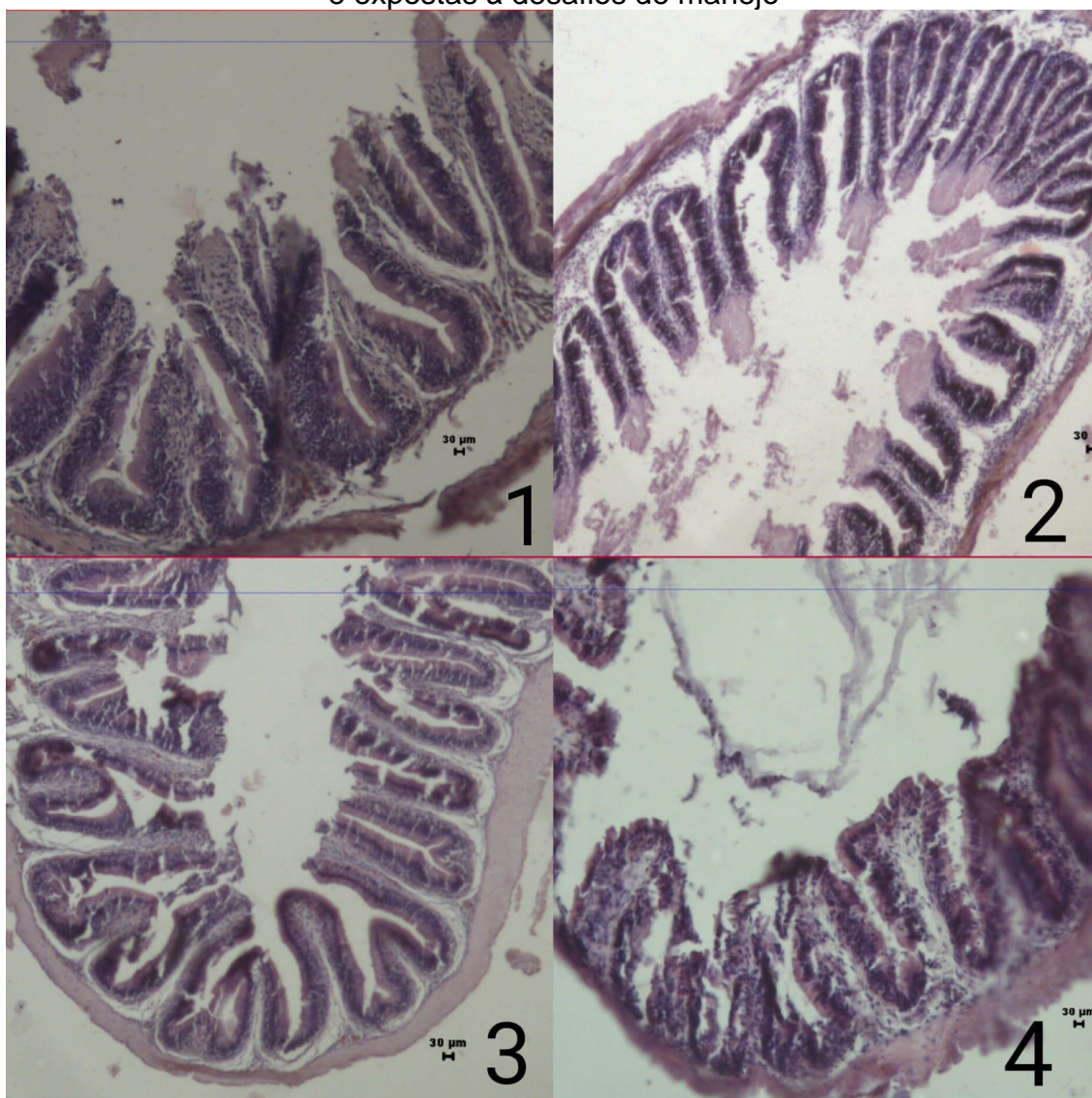
Tabela 2 – Variáveis histológicas do intestino de tílapias alimentadas com ração controle ração com β -glucano, durante 15 e 30 dias.

Variáveis	Anterior		Posterior		
	Altura	Largura	Altura	Largura	
15 dias	C	1717,50	786,46	1373,8	715,79
	C+D	2049,46	786,74	1146,49	729,97
	β	1711,39	656,49	1359,84	696,05
	β +D	1937,55	831,68	1047,02	1008,34
30 dias	C	1571,72	743,04	1184,90	630,79
	C+D	2095,22	724,59	1388,96	661,53
	β	2093,61	763,09	1266,67	806,76
	β +D	2262,87	770,29	938,32	734,42

Legenda: C= Dieta controle; β = Dieta com β -glucano; D= Desafio experimental.
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se nas imagens (figura 1), a diferença entre o desenvolvimento dos vilos em altura e largura entre os tratamentos controle (C) e β -glucano (β) aos 30 dias, para a porção anterior e posterior o intestino.

Figura 1 - Largura e altura do intestino de tilápias alimentadas com β -glucano e expostas à desafios de manejo



Legenda: 1= Altura dos vilos do intestino anterior no tratamento controle (C) aos 30 dias; 2= Altura dos vilos do intestino anterior no tratamento com β -glucano (β) aos 30 dias; 3= Largura do intestino posterior no tratamento controle (C) aos 30 dias; 4= Largura do intestino posterior no tratamento com β -glucano (β) aos 30 dias.

Fonte: Autora

O presente trabalho analisou o efeito na altura e largura dos vilos com o fornecimento de ração com e sem a adição de imunoestimulante, em período de 15 e 30 dias, evidenciando que os tratamentos β 30 e β 30D apresentaram aumento

numérico nas dimensões dos vilos em animais que se alimentaram de ração suplementada quando comparado a animais que consumiram ração ausente de suplementação, mesmo que não tenha apresentada diferenças significativas.

A utilização de 0,1% β -glucano, não levou a alterações positivas na altura dos vilos (DAWOOD *et al.*, 2020b). Dawood *et al.* (2020c) alega que tilápias que ingeriram β -glucano (0,5 g/kg) pelo período de 30 dias e expostas a deltametrina, apresentaram vilos com maior largura e altura, além de resistência a ação da deltametrina ao epitélio intestinal.

Esses estudos demonstram a ação positiva do β -glucano na morfologia intestinal, entretanto ação depende da dosagem e do tempo de administração do imunostimulante, além da forma de oferta. Zambrano (2021) relata que a utilização de dietas com 0,2% de β -glucano, e dietas 0,1% de MOS + 0,1% de β -glucano, durante 90 dias, levou a um aumento na altura das vilosidades. Esse aumento influencia diretamente na quantidade de células presentes no intestino, em especial as caliciformes, que possuem capacidade de secretar muco (MOKHBATLY *et al.*, 2020).

5.1.2 Variáveis Hematológicas

Ao observar as médias das variáveis hematológicas (tabela 3), não notamos diferenças significativas entre tratamentos. No entanto as médias para as variáveis hematológicas dos tratamentos β -glucano (β) e β -glucano desafiado (β +D) aos 30 dias se mostraram menores quando comparadas aos tratamentos β -glucano (β) e β -glucano desafiado (β +D) aos 15 dias.

Barros *et al.* (2014), incluiu na alimentação de tilápias 0,1% de β -glucano associada a 600 mg Vit C, pelos períodos de 45, 30, 15 e 7 dias, nos quais os animais que receberam o alimento suplementado por 7 dias apresentaram maior número de hemácias, hemoglobina e eritrócitos, mesmo após 4h de transporte. O que se levanta a possibilidade de influência do tempo de fornecimento na atividade do β -glucano, na hematologia.

Mohammadian *et al.* (2019) testou em carpas, 0,5%, 1% e 1,5% de β -glucano associado a MOS, por 60 dias, e não observou mudanças significativas de hematócrito e hemoglobina entre os tratamentos, porém aos 30 dias a concentração de

hematócrito e hemoglobina sofreram uma pequena alteração positiva nos grupos que receberam β -glucano, quando comparados ao controle, já aos 60 dias houve uma leve queda na concentração de hemoglobina dos grupos suplementados em relação ao controle.

Podemos reforçar que quanto maior o tempo de utilização do imunostimulante, menor seu potencial de ação na hematologia, em seu trabalho Sousa (2010) utilizou o β -glucano a 0,03% por tonelada de ração em tilápias, por 90 dias, e não obteve médias com valores significativos em hematócrito e hemoglobina.

Tabela 3 – Variáveis hematológicas de tilápias alimentadas com β -glucano, durante 15 e 30 dias, e desafiados com manejos de estresse.

Variáveis	RBC ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	HB (g/dl ⁻¹)	HT (%)	Leucócitos ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	Neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	Eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	Tombrocito ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	
15 dias	C	2,753	11,269	29,250	17,712	161,515	130,687	3,950	0,72	32,900
	C+D	1,911	8,864	17,375	7,726	64,087	23,623	11,009	0,82	7,514
	β	2,632	8,431	30,958	19,262	183,693	77,215	2,777	1,4	11,682
	β +D	2,494	7,769	28,208	11,918	104,980	122,663	13,644	1,3	6,191
30 dias	C	2,759	11,447	31,792	22,269	211,363	91,691	2,594	0,08	16,378
	C+D	2,701	11,588	27,125	9,563	69,708	50,861	8,159	0,28	24,793
	β	2,224	8,125	31,667	16,565	160,178	37,476	1,881	0,05	8,872
	β +D	2,074	6,525	28,125	8,424	71,835	50,223	8,506	0,07	2,842

Legenda: C= Dieta controle; β = Dieta com β -glucano; D= Desafio experimental; RBC= Contagem total de glóbulos vermelhos; HB= Hemoglobina; HT= Hematócrito.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Variáveis de Desempenho

Com relação ao desempenho do presente trabalho (tabela 4), nenhuma variável expressou diferença significativa.

Tabela 4 – Variáveis de desempenho zootécnicos de tilápias alimentadas com β -glucano, durante 15 e 30 dias, e desafiadas com estresse de manejo.

Variáveis	GP	TEC	CAD	CA	TEP	K	
15 dias	C	26,607	177,382	46,996	14,354	1,310	1,796
	C+D	31,325	208,834	50,620	11,994	1,118	2,060
	β	48,376	161,252	51,725	16,633	0,718	1,825
	β +D	50,052	166,839	50,606	15,177	0,683	1,948
30 dias	C	29,574	197,160	48,646	12,935	1,160	1,815
	C+D	29,199	194,658	53,261	12,620	1,169	1,905
	β	54,370	181,232	50,426	14,040	0,627	1,808
	β +D	56,795	189,170	52,272	13,413	0,606	2,038

Legenda: C= Dieta controle; β = Dieta com β -glucano; D= Desafio experimental; GP= Ganho de peso; TEC= Taxa de crescimento específico; CAD= Consumo alimentar diário; CA= Conversão alimentar; TEP= Taxa de eficiência proteica; K= Fator de condição.

Fonte: Elaborada pela autora.

O estudo de Chagas *et al.* (2013), não relatou aumento significativo nas variáveis de desempenho (peso, comprimento final, ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência) de tambaquis, suplementados com β -glucano a 0, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8% durante 60 dias. Amphan *et al.* (2019), ofertou 0,1% de β -glucano em períodos alternados de 2 e 4 semanas, e a cada 2 semanas, para tilápias, e analisou taxa de crescimento específico, crescimento médio diário, taxa de conversão alimentar e taxa de sobrevivência, e apesar do irrisório aumento da taxa de crescimento e crescimento médio diário do tratamento suplementado por 2 semanas quando comparado com o controle, todas as variáveis de desempenho não apresentaram diferença significativa.

Apresentando resultados parecidos Koch *et al.* (2021) alega em seu estudo que a oferta de 1% β -glucano, durante 15, 30 e 45 dias, não causou efeitos expressivos no desempenho de tilápias. Apesar de relatos positivos com o uso do imunostimulante, autores relatam que não existe literatura que afirme a ação do β -

glucano, no desempenho de peixes, portando o aumento de ganho de peso pode estar ligado com uma possível degradação do β -glucano pela glucanase, gerando energia, e levando ao seu uso como nutriente (LOPÉZ *et al.*, 2003; AI *et al.*, 2007).

Outra possível resposta para impactos positivos, está relacionada a ação benéfica para a microbiota intestinal do animal, que tem seu crescimento estimulado ao ser exposta ao β -glucano, causando uma melhora na saúde intestinal, levando o animal a maior aproveitamento do alimento (MEENA *et al.*, 2013; MIEST *et al.*, 2016; GHAEDI *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÃO

A inclusão β -glucano não causou alterações nas variáveis histológicas, hematológicas e de desempenho avaliadas. Novos estudos com diferentes períodos de inclusão poderão avaliar a eficiência do aditivo, e quanto ao desempenho, não há comprovações da eficiência do imunoestimulante.

REFERÊNCIAS

- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary - 1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker *Pseudosciana crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394-402, 2007.
- ALKAHEM, H. F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **Journal of University Kuwait Science**, v. 21, p. 243-252, 1994.
- AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika. Journal of Tropical Agricultural Science*, v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.
- AMPHAN, S.; UNAJAK, S.; PRINTRAKOON, C.; AREECHON, N. Feeding-regimen of β -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p.120-128, 2019.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vacine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annu. Rev. Fish Dis.**, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ARAMLI, M. S.; KAMANGAR, B.; NAZARI, R. M. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 606-10, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2021. **Anuário 2021 Peixe Br**, p. 71, 2021.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIAM.G.; ABELLI L.; SCAPIGLIATI G.; TISCAR P. G., SARTI M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast b-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311-325, 2005.
- BARROS, M. M.; FALCON, D. R.; ORSI, R. O.; PEZZATO, L. E.; FERNANDES, A. C.; GUIMARÃES, I. G. FERANDES, A.; PADOVANI, C. R.; SARTORI, M. M. P. Nonspecific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, p. 188-195, 2014.
- BEN-SHAANAN, T. L. *et al.* Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. **Nature medicine**, n. jul., p. 1–8, 2016.
- BIDO, A. F. **Efeitos da restrição alimentar nos sistemas metabólicos, imunológico e antioxidante em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2020. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2020.
- BILLER, J. D. **Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em Pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 beta-Glucano**. 2008. x,

103 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. Imunoestimulantes e imunidade de organismos aquáticos. *In*: MALDI, R. R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de ambientes aquáticos**. Maringá: Editora Massoni, 2014. p. 295.

BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do Jundiá *Rhamdia quelen***. 2005. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BOSCOLO, W. R. *et al.* Desempenho e características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 443–447, 2004.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, London, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CAIN, C. K.; BLOUIN, A. M.; BARAD, M. Temporally massed CS presentations generate more fear extinction than spaced presentations. **J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.** v. 29, p. 323–333, 2003.

CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 55, p. 299-308, 1992.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of different beta-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 529- 541, 1999.

CEROZI, B. S. **Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CHAGAS, E. C.; PILARSKI.; SAKABE, R.; MORAES F. R. de. Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas e tambaquis alimentados com ração suplementada com β -glucano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, 2013.

CHAGAS, E. C.; MAJOLO, C.; BOIJINK, C. L.; CHAVES, F. C. M.; HASHIMOTO, G. S. O.; FIGUEREDO, A. B.; MARTINS, M. L. Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento de enfermidades de peixes. *In*: MALDI, R. R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Responsabilidade intelectual. Patologia e sanidade de ambientes aquáticos**. Maringá: Editora Massoni, 2014. p. 269.

CHAGAS, E. C. **'beta'-glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas**. 2010. 141 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura de Jaboticabal, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100188>>.

CHING, J. J.; SHUIB, A. S.; ABDUL MAJID, N.; MOHD TAUFEEK, N. Immunomodulatory activity of β -glucans in fish: Relationship between β -glucan administration parameters and immune response induced. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1824–1845, 2020.

CRUZ, T. M. P. **Alterações histológicas no epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* alimentados com dietas contendo fontes proteicas vegetais**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMAR, S. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review), **Fish Physiol. Biochem.** v. 39, p. 431–457, 2013.

DASH, S. S.; DAS, B. K.; PATTNAIK, P.; SAMAL, S. K.; SAHU, S.; GHOSH, S. Biochemical and Serological Characterization of *Flavobacterium columnare* from Freshwater Fishes of Eastern India. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, p. 236–247, 2009.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and β -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 172–183, 2020b.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* The influence of dietary β -glucan on immune, transcriptomic, inflammatory and histopathology disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 98, n. jan., p. 301–311, 2020c.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, v. 523, p. 735205, jun. 2020.

DOTTA, G.; PIAZZA, R. **Manejo e Sanidade no Cultivo**. Instituto Federal do Paraná, 2012. 1-136.

DÜGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 99–106, 2003.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia Culture**. London: CABI International Publishing, 2006.

EMBRAPA – **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**. Mercado da Tilápia – 2o trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2017. (Informativo Mercado da Tilápia, n. 8)

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v. 11, n. 6, p. 1115-1147, 1997.

FALCON, D. R. **β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração.** 2007. 146 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2007.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: sustainability in action. Rome: FAO. p. 224, 2020.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO. p. 200, 2020.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Rev. AcuaTic**, v. 16, 2002.

FLETCHER, T. C. Dietary effects on stress and health. *In*: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPETER, J. P.; SCHRECK, C. B. (eds.). **Fish stress and health in aquaculture.** Cambridge: University Press, 1997. p. 223-245.

GHAEDI, G.; KEYVANSHOKOOH, S.; MOHAMMADI AZARM, H. Proteomic analysis of muscle tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary beta-glucan, Iran, **J. Vet. Res.** v. 17, n. 3, p. 184–189, 2016.

GALLANI, S. U. **Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro.** 157 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2019.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com 'beta'-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede.** 2008. 100 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2008.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E. E.; DANGUY, A. 2009. **Atlas of fish histology.** Editora Enfield: Science Publ. 2015p.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 4, p. 35-39, 1971.

GONÇALVES, L. U.; RODRIGUES, A. P. O.; MORO, G. V.; FERREIRA, E. C.; CYRINO, J. E. P. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes. *In*: FRACALOSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. (eds.). **Nutriaqua.** Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1. ed. amp. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013.

GUDDING, R.; VAN MUISWINKEL, W. B. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 6, p. 1683- 1688, 2013.

GUSELLE, N. J.; MARKHAM, R. J. F.; SPEARE, D. J. Timing of intraperitoneal administration of β -1,3/1,6 glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), affects protection against the microsporidian *Loma salmonae* - Short communication. **Journal of Fish Diseases**. v. 30, p. 111–116, 2007.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias-vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, p. 73-84, 1995.

HINES, R. S.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocytes na erythrocyte counts for same normal israeli mirror carp. Israeli. **Journal Aquaculture-Bamidgeh**. v. 22, p. 106-113, 1970.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**. v. 29, n. 1, p. 7-12, 2000.

MIEST, J. J.; ARNDT, C.; ADAMEK, M. *et al.*, Dietary beta-glucan (MacroGard(R)) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota, **Fish Shellfish Immunol**. v. 48, p. 94–104, 2016.

KALASHNIKOVA, Z. M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **Journal of Ichthyology**, n. 3, v. 16, p. 459-472, 1979.

KOCH, J. F. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56-63, 2021.

KUMARI, J; SAHOO, P. K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 95-101, 2006.

LEHMANN, J.; STUERENBERG, F. J.; MOCK, D. The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to na artificial na a natural infection with *Yersina ruckeri*. **Journal Appl. Ichthyol**. v. 4, p.174-183, 1987.

LEIRA, M. H. *et al.* As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. **Nutri Time**, v. 14, n. 2, p. 15, 2017.

LEIRA, M. H. *et al.* Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet**, v. 11, n. 6, p. 538–544, 2017

LIBARONI, M. C. M. **Efeitos da suplementação dietética de diferentes concentrações do ácido orgânico benzoico na alimentação de tilápia-do-nilo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 1-5, 1989.

- LIMA, K. S. **Aditivos alimentares na nutrição de juvenis de piavuçu, *Leporinus macrocephalus*: desempenho e parâmetros hematológicos**. 2013. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santo Cruz, Ilheus - BA, 2013.
- LOPES, L. M. F. **β -GLUCANA EM RESPOSTAS DE ESTRESSE, IMUNIDADE E DO METABOLISMO ENERGÉTICO DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**, 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018.
- LOPÉZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ROSAS, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary beta 1-3 glucan and ascorbic acid-2 monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, v. 224, n. 1 - 4, p. 223 - 243, 2003.
- MAHMOUD A. O.; DAWOOD, A. B.D; EL-SALAM M.; MOHAMED E. E.; AHMED M. A.; ZIZY I. E.; HANY M. R. A.; BILAL A. P. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities, **Aquaculture**, v. 523, p. 735205, 2020a.
- MAHMOUD A. O. D.; MAHMOUD S. G.; HANI S. The growth performance, antioxidative capacity, and histological features of intestines, gills, and livers of Nile tilapia reared in different water salinities and fed menthol essential oil. **Aquaculture**, v. 554, p. 738122, 2022.
- MELLO, M. M. M. de. **Uso do β -glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacus após manejo de transporte**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2016.
- MIANI VERRI, B. L. **Vacina e peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib realmente garante maior sobrevivência da tilápia-do-Nilo?**. 2022. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2022
- MOHAMMADIAN, T.; NASIRPOUR, M., TABANDEH, M. R.; MESBAH. M. Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*, **Aquaculture**, v. 511, p. 634197, 2019.
- MOKHBATLY, A. A. A.; ASSAR, D. H.; GHAZY, E. W. The protective role of spirulina and β -glucan in African catfish (*Clarias gariepinus*) against chronic toxicity of chlorpyrifos: hematobiochemistry, histopathology, and oxidative stress traits. **Environ Sci Pollut**, v. 27, 2020.
- MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. *In*: RODRIGUES, A. P. O. *et al.* (org.). **Espécies de peixe para piscicultura**. Brasília: Embrapa, 2013. p. 440.

- MURRAY, C. K.; FLETCHER, T. C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology**, v. 9, p. 329-334, 1976.
- MUZZOLON, A. **Efeito do extrato de própolis sobre o desempenho, a hematologia, sistema imune e morfologia intestinal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chickens. **Poultry Science**, v. 31, p. 182-8, 1952.
- OSMOND, A. T. Y.; COLOMBO, S. M. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 3, p. 490-509, 2019.
- PALAKSHA, K. J.; SHIN, G.; KIM, Y.; JUNG, T. Evaluation Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 479-488, 2008.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes**: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3. ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2008. p. 311.
- PEIXE BR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura Brasileira**: piscicultura brasileira, uma atividade em constante expansão. 2020. p. 148.
- PILARSKI, F., DE OLIVEIRA, C. A. F., DE SOUZA, F. P. B. D., ZANUZZO, F. S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25-29.
- PRABU, E. *et al.* Tilapia – An Excellent Candidate Species for World Aquaculture: A Review. **Annual Research & Review in Biology**, p. 1–14, 2019.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células Sanguíneas e Contagem Diferencial de Leucócitos em Pirapitinga-do-Sul, Bryconsp, sob Condições Experimentais de Criação Intensiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, n. 250, 1996.
- RANZANI-PAIVA, T. J. M.; PÁDUA, B. S.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, I. M. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Editora UEM, 2013. p. 13-135.
- REIS, I. C. **Suplementação dietética com β -glucano potencializado a expressão dos genes do sistema imune em tilápias-do-nilo vacinadas**. 2021. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, 2021.
- RIBEIRO, R. C. P. **Uso do selênio como modulador de estresse, sistema imune inato e antioxidante em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2019. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2019.

- RICARDO, A. C. A. **Blend de ácidos orgânicos no desempenho zootécnico, na histomorfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R. E.; JORGENSEN, J. B. β -glucans as immunostimulators in fish. *In*: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. (ed.). **Modulators of Fish Immune Responses**. SOS Publications: Fair Haven VT, 1994. p. 83-99.
- RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E. de P.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Innate immune system and the use of garlic as an immunostimulant: literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014, 2020.
- RODRÍGUEZ, F.; ESTEBAN, M.; MESEGUER, J.; BRAVO, M.; GÓMEZ, G.; ROJASLUNA, T.; JIMÉNEZ, G.; BALCÁZAR, J. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura. **II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA**, p. 624-654, 2003.
- ROED, H. K.; FJALESTAD, K.; LARSEN, J. H.; MIDTHJEL, L. Genetic in haemolytic activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Fish Biology**, v. 40, p. 739-750, 1992.
- ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.G.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. **In Health and Environment in Aquaculture**, v. 159, p. 159-198, 2012.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. **Memórias de Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-328, 1947.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172 p. 63-92, 1999.
- SANTOS, C. H. A.; LOURENÇO, J. A.; IGARASHI, M. A. Crescimento de Tilápia do Nilo alimentados com peixes marinhos provenientes da pesca do camarão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 185–192, 2007.
- SAURABH, S.; SAHOO, P. K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223-239.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, O. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**, n. 2328, ago. 2017.
- SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWANA, G.; NAKANISH, T. (ed.) **The Fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 95-103.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhancer survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus*

carpio) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 19, p. 293-306, 2015.

SHAKYA, S. R; LABH, S. N. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 2, n. 4, p. 44-47, 2014.

SILVA, D. V. **Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: Isolamento e infecção experimental de tilápia do Nilo com *klebsiella pneumoniae***. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2020.

SILVA, T. D. **Duração do efeito imunoestimulante da Glucana pós administração em pacu**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2021.

SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental**, n. 17, 2017.

SNA - **Sociedade Nacional de Agricultura**. Produção de peixes em 2020 atinge quase 803 mil toneladas no Brasil. 2021. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/producao-de-peixes-em-2020-atinge-803-mil-toneladas-no-brasil/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SOUSA, A. D. L. **Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia-do-nilo mantidos em tanques-rede**. 2010. 42 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2010.

STOSIK, M.; DEPTULA, W.; TRÁVNICEK, M.; BALDY-C HUDZIK, K. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). **Veterinárni Medicína**, v. 47, n.1, p. 21-25, 2002.

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**, v. 218, p. 149-56, 1981.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 1, n. 3, p. 254-263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Biblioteca Central FMRP-USP. 2004. 144p.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas Para a Prevenção E O Controle De Patógenos Em Piscicultura Alternatives for the Prevention and Control of Pathogens in Fish Farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335–341, 2009.

TELLI, G. S. ***Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na alimentação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*: desempenho zootécnico, sanidade e**

modulação da microbiota intestinal, 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2017.

TOCIDLOWSKI, M. E.; LEWBART, G. A.; TOSKOPF, M. K. Hematological study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). **Veterinary Clinical Pathology**. v. 26, n. 3, p.119-125, 1997.

TOLOSA, E. M. C. de *et al*. **Manual de técnicas para histologia: normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003.

TREWAVAS, E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, **Oreochromis and Danakilia**. London: [s.n.], 1983. Bulletin of the British Museum (Natural History).

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva. *In*: CYRINO, J. E. P.; URBINATI E. C.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical**. São Paulo: Editora TecArt, 2004. p.171-193.

VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulantes: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, n. 3, p.1079–1091, 2013.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. **Roche Vitamins**, Switzerland: 4070 Basle, 1997.

VOLOSKI, A. P. S. **Cicatrização de lesões cutâneas e imunomodulação em Jundiá expostos à β -glucana**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2018.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**. v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

YU, V. L. HANSEN, D. S.; KO, W. C.; SAGNIMENI, A.; KLUGMAN, K. P.; VON GOTTBURG, A.; GOOSSENS, H.; WAGENER, M. M.; BENEDI, V. J. The International Klebsiella Study Group, Virulence Characteristics of Klebsiella and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. **Emerg. Infect. Dis.** v. 13, p. 986–993, 2007.

ZAMBRANO, L. A. C. **Prebióticos na alimentação da tilápia-do-nilo sob baixa temperatura: desempenho produtivo, respostas fisiológicas e morfologia intestinal**. 2021. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2021.

ZAPATA, A. G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. *In*: IWAMA, G., NAKANISHI, T. (eds.). **The Fish Immune System**. London: Academic Press, 1996. p.1-62.

ANEXO



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



ANEXO I

Orientação Técnica CONCEA nº 8, de 18.03.2016 – DOU de 21.03.2016

Expediente CEUA nº **07/2020.R2**

Finalidade	Pesquisa Científica.
Vigência da Autorização	Dezembro/2020 a Agosto/2021.
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe/O.niloticus.
Número de Animais	450.
Peso/Idade	50 kg/ 90 dias.
Sexo	Macho.
Origem	Psicultura Comercial.



Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br