

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA
ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO**

ERIC PORTILHO DE ARAUJO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP

AGOSTO/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO

ERIC PORTILHO DE ARAUJO
Zootecnista

ORIENTADORA: Prof.^a.Ass. Dra. Margarida M. Barros

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Agosto – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP -
FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

A663p Araujo, Eric Portilho, 1989-
 Plasma sanguíneo desidratado na alimentação da Tilápia-
do-Nilo / Eric Portilho Araujo. - Botucatu : [s.n.], 2015
 vi, 51 f. : fots. color., tabs.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2015
 Orientador: Margarida M. Barros
 Inclui bibliografia

 1. Peixe - Alimentação e rações. 2. Hematologia. 3. Ti-
lápia-do-Nilo - Desempenho. 4. Plasma sanguíneo I. Barros,
Margarida M. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medici-
na Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Edson e Edna, pelo exemplo de vida, ensinamentos, lições, conselhos e apoio incondicional. Obrigada pai e mãe, amo muito vocês.

À minha irmã, Ellen, pelo carinho, amizade e amor.

Aos meus avós maternos e paternos, por todos os ensinamentos, conselhos, incentivos e exemplos de vida. Amo vocês.

À toda minha família que me apoia, torceu e torce pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Agradecimentos

À Deus pela proteção divina e vida abençoada;

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Margarida M. Barros, pelos ensinamentos, conselhos, ajuda, dedicação, paciência, amizade, exemplo de pessoa e profissionalismo, além da oportunidade de estudo e trabalho ao seu lado;

Ao Prof.^o Dr. Luiz Edivaldo Pezzato pelos conselhos, atenção, ajuda e exemplo profissional;

Ao Prof.^o Dr. Dirlei Berto pela atenção, ajuda e disposição referente à concessão do plasma sanguíneo desidratado, bem como auxílio científico e sugestões inerentes às dúvidas, além do exemplo profissional;

À Prof. Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pelo auxílio nas análises estatísticas, dicas e conselhos;

Ao Prof.^o Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira e Prof.^a Dra. Elizabeth M. S. Schmidt, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e Departamento de Clínica Veterinária, respectivamente, – FMVZ/UNESP Botucatu, pela concessão do laboratório e equipamentos para a leitura das lâminas histológicas;

À Prof.^a Dra. Renée L. Amorim, Departamento de Patologia Veterinária – FMVZ/UNESP Botucatu, pela disposição e atendimento nas dúvidas referentes às análises histológicas;

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Jakeline M. A. De Freitas, Mariucha K. H. R. Rocha, Flávia Mota Damasceno; Rafael Lopes da Silva, Lara W. Genovez, Renan de M. Botelho, Caroline P. Teixeira, Ademir C. Fernandes Júnior, João Fernando A. Koch, Pedro L. P. F. de Carvalho, Guilherme Eduardo Sassi; Leornado entre muitos outros que passaram pelo AquaNutri, agradeço à todos vocês pela ajuda, amizade e alegrias;

À minha querida amiga Mônica Megumi Aoyagi pela sua amizade, carinho, ajuda e conselhos;

Ao meu amigo João Vitor de Queiroz pela sua amizade, alegria e companheirismo em todos os momentos;

Aos meus amigos da época de graduação Bruna Boaro Martins, Viviane Ferreira, Paola Tomotani, Francesco Vieira Muniz, Érica Tagima Marcelo, Andressa, Elise, pela torcida e amizade ainda presentes;

Aos professores e funcionários do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal por todo auxílio;

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FMVZ, Carlos Pazini Júnior, Seila C. C. Vieira, Aline Couto e Ellen C. Guilhen;

À Gisele Setznagl, Laboratório de Bromatologia – FMVZ/UNESP Botucatu, pela atenção e auxílio nas análises químico-bromatológicas;

À Valéria Dalanezi pela confecção das lâminas histológicas;

À empresa APC An LGI Company, do Brasil, pela doação do plasma sanguíneo desidratado, utilizado neste estudo;

À empresa Falcon Aditivos pela doação do antifúngico (Fungittract Dry®) utilizado na confecção das dietas;

Ao Programa de Pós-graduação, à Capes e bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1. Introdução.....	02
2. Imunoestimulantes.....	02
3. Plasma sanguíneo na alimentação animal.....	03
4. Estresse em peixes.....	05
5. Estresse por baixa temperatura.....	07
6. Hematologia.....	08
7. Histologia.....	09
8. Referências Literárias.....	10

CAPÍTULO II

PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1. Introdução.....	18
2. Materiais e métodos.....	20
2.1. Dietas experimentais.....	20
2.2. Desempenho produtivo e viabilidade econômica.....	21
2.3. Análises hematológicas.....	23
2.4. Análise histológica.....	24
2.5. Desafio por baixa temperatura.....	25
2.6. Análises estatísticas.....	25
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	27
5. Referências literárias.....	33

TABELA 01 - Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.....	41
--	----

TABELA 02 - Peso final (Pf), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de sobrevivência (So), taxa de eficiência proteica (TEP),	
---	--

taxa de retenção proteica (TRP) e índice de gordura visceral (GV) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).....	42
---	----

TABELA 03. Custo médio (\$) de alimentação por quilograma de peso vivo de peixe produzido (CMA), índice de eficiência econômica (IEE) e índice de custo (IC) de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).....	43
---	----

TABELA 04 - Altura de vilosidade (V), profundidade de cripta (C) e relação vilosidade:cripta (V:C) de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).....	44
---	----

TABELA 05 - Eritrócitos (Erit), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.....	45
--	----

TABELA 06 -Contagem diferencial de leucócitos totais (Leu), linfócitos (Linf), neutrófilos (Neut) e monócitos (Mon) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.....	46
---	----

TABELA 07 -Proteína plasmática total (PPT), albumina (Alb), globulina (Glob), relação albumina:globulina (A:G) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.....	47
--	----

FIGURAS

FIGURAS.....	48
--------------	----

Figura 01. Cortes histológicos do epitélio intestinal, região proximal, de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com níveis de inclusão de plasma sanguíneo desidratado durante 60 dias.....	49
--	----

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES.....	50
------------------	----

Implicações.....	51
------------------	----

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

Pertencente à família ciclidae, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie resistente e de ótima adaptabilidade a novos ambientes. Seu hábito onívoro permite ocupar diversos habitats, como rios, lagos e represas. Além disso, o rápido crescimento, resistência a doenças e variações de temperatura a tornam atrativa para a aquicultura, destacando-a como um dos peixes mais cultivados no mundo (CHAKRABORTY; BANERJEE, 2009; GRAMMER, *et al.* 2012).

Devido a demanda na produção aquícola, a intensificação do sistema produtivo foi necessária para que houvesse melhor eficiência, exigindo maior controle de variáveis para maximização da produção, tais como a qualidade da água, densidade, nutrição e saúde dos animais.

Atenção especial é necessária a dieta empregada, pois esta necessita atender as exigências do organismo, permitindo que além de manter-se, permita que o animal possa crescer, reproduzir e ter higidez. Segundo Pezzato *et al.* (2004) e Kiron (2012) a boa saúde dos animais está diretamente associada a dieta que ingerem, portanto, deve ser de boa qualidade e assegurar o atendimento das exigências dos animais. Gatlin III (2002) afirmou que a falta ou excesso de nutrientes essenciais aos peixes pode afetar a saúde, tornando-os mais susceptíveis aos agentes oportunistas causadores de doenças. Desta forma, pode-se lançar mão de ingredientes com princípios imunoestimulantes, que adicionados à dieta, possam trazer melhores benefícios aos animais.

2. Imunoestimulantes

O sistema imune desempenha função fundamental na defesa do organismo do animal, de modo a oferecer-lhe proteção contra a invasão de patógenos, conferindo respostas adequadas no combate à infecções e ao estabelecimento de doenças. Diversos produtos podem ser utilizados como estimulantes do sistema imunológico, podendo causar aumento na produção de anticorpos, células fagocitárias e atividade de células fagocitárias (SAKAI, 1999; XAVIER *et al.*, 2006).

Segundo Blazer (1992), o uso de ingredientes com ação imunoestimulante, pode beneficiar a produção aquícola, principalmente em fases iniciais, devido sua importância na manutenção da higidez em peixes. Sakai (1999) cita que os imunoestimulantes podem causar aumento na resistência do organismo por mecanismo

não específico de defesa, o qual possui curta duração, e é de uso mais seguro quando comparado a quimioterápicos, além de sua amplitude de ação ser mais longa do que a vacinação propriamente dita.

Usualmente, para o controle e combate a doenças em peixes, muitos produtores utilizam produtos às vezes tóxicos e agressivos aos próprios animais, tais como antibióticos e quimioterápicos, os quais podem deixar efeito residual na carne, e ainda tem alto poder poluente ao ambiente. Desta maneira, estudos devem buscar novos ingredientes que ofereçam maiores subsídios à saúde animal, pois além de melhorarem as condições de desenvolvimento ao animal, reduzam a incidência de doenças e, conseqüentemente, o uso de eventuais produtos tóxicos para combatê-las.

3. Plasma sanguíneo na nutrição animal

Segundo Campbell *et al.* (1998), o plasma sanguíneo é caracterizado por ser pó de coloração marrom clara, com aproximadamente 78% de proteínas. Quando produzido pelo processo “spray dry” preserva suas características proteicas. É ainda, mistura de componentes funcionais composta por imunoglobulinas, albumina, fibrinogênio, lipídeos, peptídeos biologicamente ativos (defensinas e transferrina), enzimas e outros fatores que têm atividade biológica no intestino, seja no desenvolvimento trófico da epiderme intestinal e/ou na imunidade local (CAMPBELL *et al.*, 2008).

Para Russel (1994), Rantanen *et al.* (1994) e Pierce *et al.* (1996), citados por Muniz *et al.* (2001), o plasma bovino e suíno apresentam efeitos semelhantes no desempenho de suínos após o desmame. Segundo Campbell *et al.* (2008) diversos modos de ação têm sido propostos para o plasma produzido pelo processo “spray dry”, tais como melhorador de desempenho, estímulo trófico e/ou manutenção da integridade intestinal e imunoestimulante.

Diversos estudos realizados com leitões na fase pós-desmame comprovam que o plasma utilizado como ingrediente na dieta, pode trazer resultados benéficos, pois contém proteínas de alto valor biológico, é fonte de imunoglobulinas e de ácido glutâmico, que devido às suas propriedades palatáveis pode melhorar o consumo de ração (LAWRENCE *et al.*, 2004). Segundo Coffey & Cromwell (2001), os benefícios funcionais do plasma sanguíneo em suínos, são mais evidentes quando os animais são

submetidos em elevado nível de mudança imunológica, por exemplo, quando são expostos a um elevado desafio sanitário.

Em estudos realizados com suínos na fase de creche, Touchette *et al.* (1997) e Spencer *et al.* (1997), demonstraram que o plasma atua como estimulador da ingestão, manutenção e aumento na altura das vilosidades intestinais em leitões. Dalto *et al.* (2011) constataram melhor conversão alimentar para leitões leves ao desmame suplementados com 20g de plasma sanguíneo/animal/dia desidratado na dieta (21 a 70 dias de criação).

Melhora no desempenho, com maior ganho de peso com a inclusão de até 8,0% de plasma sanguíneo nas dietas, também foi descrita por Barbosa *et al.* (2007), ao trabalhar com suínos desmamados dos 21 aos 28 dias de idade, sendo encontrado melhores resultados com 6,0% de inclusão. Resultado semelhante, também foi descrito por Gattás *et al.* (2008), que ao incluir níveis de até 8,0% de plasma sanguíneo na ração para suínos desmamados com 14 dias e criados até os 28 dias, observaram maior ganho de peso e consumo de ração, para os respectivos níveis de 6,0 e 7,5% de inclusão.

Barbosa *et al.* (2012) avaliaram o efeito do plasma sanguíneo na dieta sobre as vilosidades intestinais, o desenvolvimento bacteriano no intestino delgado e o desempenho de leitões desmamados aos 35 dias de idade, verificaram maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e maior altura de vilosidades no intestino delgado. Confirmando os benefícios para ganho de peso e consumo de ração, Lora Grãna *et al.* (2010) observaram melhores índices bionutricionais $[IB = (a \times \text{consumo de ração médio diário}) + (b \times \text{ganho de peso médio diário})]$ quando da inclusão de 5,0% de PD na dieta sem antibióticos durante a primeira semana para leitões desmamados com 21 dias, e da inclusão de 2,5% de PD na dieta na segunda semana pós-desmame.

Avaliando-se os efeitos do plasma sanguíneo desidratado na dieta de leitões leves desmamados aos 21 dias de idade sobre desempenho, perfil imunológico, histológico, microbiológico e peso de órgãos, constatou-se que a adição de 20g de plasma na dieta melhorou o ganho diário de peso, aumentou o peso do baço e o título de IgA no soro, e a inclusão de 10g de plasma na dieta aumentou o comprimento e a largura do linfonodo ileocólico (DALTO *et al.*, 2013). Em ratos, Pérez-Bosque *et al.* (2004) avaliaram o efeito do plasma durante a inflamação intestinal, desafiando-os com a enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, que é um potente ativador do sistema imune e resulta em elevada porcentagem de ativação de células T, por meio de uma ligação cruzada por meio do complexo principal de histocompatibilidade classe II. Houve

aumento dos linfócitos α -T e da população de células citotóxicas no tecido linfóide do intestino. Portanto, a inclusão do ingrediente na dieta diminuiu o efeito destes desafios, indicando a não super estimulação do sistema imune. Ainda com ratos e usando o mesmo modelo anterior de desafio por *Staphylococcus aureus*, Pérez-Bosque *et al.* (2006) constataram que a inclusão de plasma na dieta de ratos previne a maior permeabilidade intestinal, causada pela infecção induzida de *S. aureus*. Logo, tais resultados indicam que o plasma sanguíneo desidratado reduz os danos induzidos pela inflamação da estrutura epitelial, aumentando a barreira intestinal, por exemplo com a maior produção de muco, culminando em melhor saúde intestinal.

Pérez-Bosque *et al.* (2007) avaliaram o efeito do plasma na expressão de citocinas de ratos desafiados com *Staphylococcus aureus*, e observaram aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- α e TNF- α) nos tecidos linfóides e difuso, além do aumento na secreção de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Portanto, tais fatos permitem inferir que o plasma reduz a super estimulação de citocinas pró-inflamatórias em ratos, levantando e reforçando a hipótese de que este é o mecanismo primário de ação do plasma (CAMPBELL *et al.*, 2008), proporcionando melhor recuperação, estímulo, do consumo de alimento, o que leva a redução dos efeitos deletérios no organismo que podem resultar em condições subletais e até mesmo doenças.

Em peixes, avaliando-se a inclusão de plasma em dietas de crescimento para dourada (*Sparus aurata*), Gisbert (2015) encontrou respostas benéficas quanto ao peso e comprimento corporal, maior densidade de células caliciformes e atividade moduladora de defesa antioxidante intestinal, além do estímulo à resposta imunológica não específica. Com base nestes estudos, nota-se que o plasma desidratado, favorece a resposta imunológica e, portanto, pode ser importante ferramenta em situações de estresse no sistema produtivo.

4. Estresse em peixes

Práticas de manejo inerentes ao sistema produtivo bem como variáveis, como por exemplo, a temperatura da água de cultivo, o nível de oxigênio dissolvido, densidade de estocagem e a competição por alimento, podem gerar situações de estresse aos peixes, podendo causar mudanças fisiológicas no organismo do animal desencadeando as mais diversas respostas que podem causar desequilíbrio na homeostase e o bom funcionamento do mesmo.

As respostas devido ou desequilíbrio na homeostase são classificadas de acordo com sua intensidade de duração, portanto são divididas em três fases sendo elas aguda ou primária, crônica ou secundária e crônica prolongada ou terciária (PICKERING, 1981). Segundo Gamperl *et al.* (1994), na fase aguda ou primária, há o estado alterado, que desencadeia a resposta neuroendócrina, que faz parte da resposta ao estresse generalizado no peixe havendo, assim, a rápida liberação de hormônios, como catecolaminas e cortisol na circulação sanguínea. Na fase seguinte, crônica ou secundária, em decorrência da maior mobilização e liberação hormonal ocorrem inúmeras alterações nos parâmetros sanguíneos devido a ativação de diversas vias metabólicas, tais como o aumento da pressão sanguínea, maior irrigação do sistema muscular, maior oxigenação dos tecidos, mobilização e disponibilização de reservas corporais, que preparam o animal para as mais variadas situações, de modo que o animal responda prontamente ao agente estressor, por exemplo, empregando a rota de fuga (WEDEMEYER, 1969). Segundo Iwama (1998), na fase terciária ou crônica prolongada, a resposta desencadeada representa o animal como um todo em nível de população. Logo, se o peixe for incapaz de se adaptar ou combater o agente estressor, alterações intrínsecas ao animal poderão ocorrer como resultado da energia redistribuída, de modo que os substratos energéticos serão desviados para garantir melhor resposta associada a este, ou seja, processos vitais tais como a reprodução e processos anabólicos, por exemplo o crescimento, serão prejudicados, o que possivelmente afetará a população deste com menores índices reprodutivos, menor taxa de natalidade e também retardo na maturação sexual, quando esta estiver relacionada com o peso do animal, visto que estes terão menor taxa de crescimento.

De acordo com Conte (2004), o rompimento do equilíbrio do organismo é um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de doenças e, consequentemente, por níveis consideráveis de mortalidade na produção aquícola mundial. Tais alterações podem ser melhor elucidadas com o respaldo de análises, por exemplo hematológicas, a fim de que possamos melhor entender os mecanismos de resposta e defesa do organismo animal, buscando sua homeostase e bom funcionamento.

5. Estresse por baixa temperatura

Em experimento analisando a tolerância da tilápia-do-Nilo à baixa temperatura Atwood *et al.* (2003) notaram mudanças visíveis de comportamento, de modo que os peixes exibiram declínio de atividade, escurecimento corporal e abrupta perda de equilíbrio. Verificaram, ainda, que conforme houve queda de temperatura, os peixes permaneciam próximos ao fundo do aquário e se orientavam de frente para a corrente de água. Quanto à alimentação, os autores verificaram que os peixes deixaram de comer antes que ficassem desorientados ou morressem, principalmente quando expostos à faixa de temperatura correspondente de 18 a 13°C. Conforme a queda de temperatura para 10,6°C os autores verificaram níveis de mortalidade mais elevados, sendo confirmado óbito de todos os peixes ao final, quando atingido a temperatura de 6,8°C.

Em estudo realizado por Falcon *et al.* (2008) com tilápias-do-Nilo arraçadas com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo e submetidas ao estresse por baixa temperatura, durante 25 dias à 18°C e mais 11 dias à 15°C, houve redução da resistência dos peixes quando submetidos ao estresse, de modo que estes apresentaram quadros de leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitose. Quadro de leucopenia também foi constatado por Araújo *et al.* (2011), ao submeterem tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais ao estresse por baixa temperatura durante três dias (17°C), sugerindo declínio geral no estado de saúde devido ao estresse. Fernandes Junior *et al.* (2010) ao avaliarem a resposta hematológica de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura durante sete dias (17°C) verificaram quadros de linfopenia e neutrofilia, associados à baixa temperatura e, consequente queda de resistência dos peixes. Signor *et al.* (2010) também utilizaram o mesmo tipo de estresse por sete dias (13°C) para tilápias alimentadas com a dieta suplementada com levedura e zinco para tilápias-do-Nilo e também determinaram prejuízos nos parâmetros hematológicos, resultando nas condições descritas por Falcon *et al.* (2008).

Em estudo com *Oreochromis niloticus* avaliando diferentes períodos de administração de β -glucanos e vitamina C na dieta sobre os parâmetros fisiológicos, imunológicos e resistência por infecção à *Aeromonas hydrophila*, Barros *et al.* (2014), observaram leucopenia quando da exposição ao estresse por baixa temperatura (14°C

durante quatro dias), culminando em menor resistência orgânica dos peixes, confirmada pela elevação de células fagocíticas.

Barros *et al.* (2015) avaliando o desempenho produtivo e saúde de tilápias-do-Nilo quando da suplementação de nucleotídeos na dieta sobre a resistência orgânica dos peixes expostos à *Aeromonas hydrophila* e estresse por baixa temperatura, observaram que a baixa temperatura culminou em queda nos leucócitos e linfócitos, com aumento em neutrófilos. Neutrofilia e queda no número de células sanguíneas vermelhas, além de hemorragia aparente, quando da suplementação de níveis de vitamina A na dieta para *Oreochromis niloticus* em condições de criação similares aos autores citados anteriormente, foram descritos por Guimarães *et al.* (2014), sobre o perfil hematológico e sistema imune na resistência orgânica dos peixes à *Aeromonas hydrophila* e estresse por baixa temperatura.

Segundo Signor *et al.* (2010) peixes submetidos à baixa temperatura apresentaram redução do metabolismo, o que afetou a higidez e alterou as respostas fisiológicas, bem como as hematológicas. Estes ainda citaram alterações celulares relacionadas ao sistema imunológico dos peixes, tais como leucopenia, neutrofilia, monopenia e/ou linfopenia. Portanto, fica evidente que o estresse por baixa temperatura afeta a higidez dos peixes, mesmo em condições nutricionais adequadas.

6. Hematologia

Segundo Ranzani-Paiva (2004), por meio das análises hematológicas, consegue-se o perfil do estado geral do organismo do animal, uma vez que o sangue é o principal veículo de nutrientes atuando no transporte de gases e na defesa do mesmo. Portanto, qualquer alteração fisiológica será evidenciada nos parâmetros sanguíneos facilitando a detecção de doenças e de condições subletais, não favoráveis ao desenvolvimento produtivo dos peixes (HRUBEC *et al.*, 2000). Desta forma, em sua linha de pesquisa Barros *et al.* (2006), evidenciam a importância da adequada nutrição aliada a correta manutenção da higidez em peixes e, portanto a busca por novas tecnologias e pesquisas, tais como novos métodos de diagnóstico de doenças, condições subletais, bem como a prevenção, mas também ingredientes promotores de saúde e dietas funcionais, venham a suprir as reais necessidades de produção.

Situações de estresse podem causar alterações fisiológicas no organismo do animal, a fim de combater os agentes estressores. Desta maneira, tais alterações podem

ser detectadas pela avaliação hematológica, indicando o possível estado de saúde do indivíduo (RANZANI-PAIVA, 2004).

De acordo com Cle *et al.* (1991) os parâmetros hematológicos são importante ferramenta que pode ser utilizada para a avaliação da resposta ao estresse, pois nesta situação o organismo tentará reestabelecer a homeostase, logo, espera-se aumento na taxa de oxigênio circulante, bem como nas células de defesa para o combate ao agente estressor, além da modificação de outros parâmetros sanguíneos.

7. Histologia

Segundo Wilson & Castro (2011), o trato gastrintestinal dos peixes é similar ao de outros vertebrados, porém contem variações em nível filogenético, ontogênico, ambiental e relacionados ao hábito alimentar. O trato gastrintestinal dos peixes pode ser dividido em três porções, sendo estas anterior, média e distal. A porção anterior é composta pelo esôfago e estômago, onde há o início da digestão química dos alimentos, sendo que a quebra mecânica destes, pode ocorrer em partes ou na totalidade no estômago. A porção média é composta pelo intestino delgado, onde há continuidade da digestão química e, principalmente, absorção dos nutrientes. Já a porção final, é composta pelo intestino grosso, onde há principalmente a absorção de água, sendo difícil a distinção morfológica entre as porções média e final (WILSON & CASTRO, 2011).

O trato gastrintestinal da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é caracterizado por um sistema complexo, repleto de espirais e alças intestinais, sendo considerado um dos mais elaborados relatados em peixes (SMITH *et al.*, 2000). Também podem haver modificações ao longo do trato digestório, a fim do melhor aproveitamento dos nutrientes, ou mesmo, na defesa do organismo à algum agente estressante. Segundo Touchette *et al.* (1997) o plasma sanguíneo para suínos estimulou o aumento e manutenção das vilosidades, o que pode ter contribuído para o melhor aproveitamento da dieta.

Diante do exposto, o Capítulo II, intitulado "**PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO**" foi adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico Aquaculture Research.

8. Referências Literárias

- ARAÚJO, D. M. et al. Hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 294-302, 2011.
- ATWOOD, H. L. et al. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. **Aquaculture Research**, United Kingdom, v. 34, n. 3, p. 241-251, 2003.
- BARBOSA, F. F. et al. Efeitos de plasma sanguíneo sobre vilosidades, desenvolvimento bacteriano e desempenho de leitões criados em condições de desafio pós-desmame aos 35 dias. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 2, p. 469-479, abr./jun. 2012.
- BARBOSA, F. F. et al. Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasil, v. 36, n. 4, p. 1052-1060, 2007.
- BLAZER, V. S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Netherlands, v. 2, p. 309-323, 1992.
- BARROS, M. M. et al. Non-specific 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**, United Kingdom, v. 39, n. 2, p. 188-195, 2014.
- BARROS, M. M. et al. Nutrição e saúde de peixes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 1-15, 2006.
- BARROS, M. M. et al. The effects of dietary nucleotide mixture on growth performance, haematological and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, United Kingdom, v. 46, n. 4, p. 987-993, 2015.
- CAMPBELL, J. et al. Uso do plasma para modular a resposta inflamatória e o seu impacto na produção de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Brasil, v. 36, p. 53-59, 2008.
- CAMPBELL, J. M. et al. The use of plasma and blood cells in swine feeds In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E MANEJO DE LEITÕES, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1998. p. 18-32.

- CHAKRABORTY, S. B.; BANERJEE, S. Culture of monosex Nile tilapia under different traditional and non-traditional methods in India. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, United Arab Emirates, v. 1, n. 3, p. 212–217, 2009.
- CLE, L. W.; MILLER, N. W.; BLY, J. E. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions, and temperature sensitivities . In: COHEN, N.; WARR, G. W. (Ed.). **The Phylogeny of Immune Functions** . Boca Raton: CRC Press: 1991. p. 191-213.
- COFFEY, R. D.; CROMWELL, G. L. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. **Pig News and Information**, United Kingdom, v. 22, p. 39-48, 2001.
- CONTE, F. S. Stress and welfare of culture fish. **Applied Animal Behavior Science**, Netherlands, v. 86, p. 205. 2004.
- DALTO, D. B. et al. Efeito de dietas contendo plasma sanguíneo desidratado sobre características microbiológicas, imunológicas e histológicas de leitões leves ao desmame. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 65, n. 1, p. 189-197, 2013.
- DALTO, D. B. et al. Plasma sanguíneo desidratado na recuperação de leitões leves ao desmame: desempenho zootécnico, perfil hematológico, frequência de diarreia e viabilidade econômica”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, p. 1989-2000, 2011.
- DIEHL, J. All in good taste: creating natural savoury flavorings from yeast. In: **Nutritional biotechnology in the feed and food industries**. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry, Lexington, Kentucky, USA, 23-26. May 2004. Alltech UK, p. 257-263, 2004.
- FALCON, D. R. et al. Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, Brasil, v. 9, p. 543-551, 2008.
- FERNANDES JUNIOR, A. C. F. et al. Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasil, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010.
- GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: Techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 215–255, 1994.
- GRAMMER G. L. et al. Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) establishment in temperate Mississippi, USA: multi-year survival confirmed by otolith ages. **Aquatic Invasions**, Finland, v. 7, n. , p. 367-376, 2012.

- GATLIN III, D. M. Nutrition and Fish Health. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. 3rd. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 671-702.
- GATTÁS, G. et al. Plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasil, v. 37, n. 2, p. 278-285, 2008.
- GISBERT, E. Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and enhances the immune status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. **Journal of Animal Science**, United States, v. 93, n. 1, p. 278-86, 2015.
- GUIMARÃES, I. G. et al. Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Animal Feed Science and Technology**, Netherlands, v. 188, p. 126-136, fev. 2014.
- HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, United States, v. 29, n. 1, p. 7-12, 2000.
- IWAMA, G. Stress in fish. **Annals of the New York Academy of Science**, United States, v. 851, n.1 , p. 304-310, 1998.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, Netherlands, v. 173, p. 111-133, 2012.
- LAWRENCE, K. R. et al. Comparison of wheat gluten and spray-dried animal plasma in diets for nursery pigs. **Journal of Animal Science**, United States, v. 82, p. 3635-3645, 2004.
- LORA GRAÑA, G. et al. Plasma sanguíneo em dietas sem antibióticos para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Brasil, v. 11, n. 3, p. 815-826, jul/set. 2010.
- MUNIZ, M. H. B. et al. Plasma bovino desidratado na dieta de leitões desmamados. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 1003-1010, 2001.
- PÉREZ-BOSQUE, A. et al. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. **Journal of Nutrition**, United States, v. 136, n. 11 , p. 2838- 2843, 2006.
- PÉREZ-BOSQUE, A. et al. Plasma protein supplements modulate the activation of gut associated immune system induced by *S. aureus* enterotoxin B in rats. In: **1st International Immunonutrition Workshop**. Valencia, Spain, 2007.

- PÉREZ-BOSQUE, A. et al. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. Aureus* superantigen B. **Journal of Nutrition**, United States, v. 134, n. 10, p. 2667-2672, 2004.
- PEZZATO, L. E. et al. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Aquabil, 2004. v. 1, p. 75-170.
- PICKERING, A. D. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A. D. **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981. p. 1-9.
- PIERCE, J. L. et al. Spray-dried bovine globulin for early weaned pigs. **Journal of Animal Science**. Savoy, v. 74, n. 1, p. 171, 1996.
- RANZANI-PAIVA, M. J. et al. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela Publishing, 2004. p. 89-120.
- RUSSELL, L. E. Effect of plasma source and processing method on postweaning performance of pigs. **Journal of Animal Science**., Savoy, v. 72, n. 1, p. 166, 1994.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.
- SIGNOR, A. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ciência Animal Brasileira**, Brasil, v. 11, n. 3, p. 509-519, 2010.
- SMITH, B. J. et al. Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* L. **Cells Tissues Organs**, Switzerland, v. 166, n. 3, p. 294-303; 2000.
- SPENCER, J. D. et al. Effect of spray-dried plasma and fructooligosaccharide on nursery performance and small intestine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 1, p. 199, 1997.
- TOUCHETTE, K. J. et al. Impact of feed intake and spraydried plasma on nursery performance and intestinal morphology of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 1, p. 198, 1997.
- WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 1247-1251, 1969.
- WILSON, J. M.; CASTRO, L. F. C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: GROSELL, M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **The multifunctional gut of fish**. London: Elsevier, 2011. p. 1-55.

XAVIER, E. G.; RUTZ, F.; ROLL, V. F. B. Imunonutrientes na produção de suínos **Anais I Simpósio UFRGS de Produção Reprodução e Sanidade Suína, Porto Alegre, RS**, p. 174-195, 2006.

YU, I. T.; WU, G. F.; YANG, P. C. Roles of glutamine and nucleotides in combination in growth, immune responses FMD antibody titres of weaned pigs. **Animal Science**, Australia, v. 75, p. 379-385, 2002.

CAPÍTULO II

PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO

PLASMA SANGUÍNEO DESIDRATADO NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA-DO-NILO

Resumo: Este estudo avaliou a inclusão de plasma sanguíneo desidratado (PD) na dieta da tilápia-do-Nilo por meio de uma pesquisa dividida em duas fases: na Fase I, com duração de 60 dias, avaliou-se o desempenho produtivo e parâmetros histológicos dos peixes alimentados com cinco dietas: PD0 (controle); PD 1,66; PD 3,32; PD 4,97; PD 6,63% de inclusão de PD. Para isto distribuiu-se 440 peixes em 40 aquários de 250 L dotados de filtro físico e biológico com controle de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Na Fase II avaliou-se os parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia-do-Nilo, antes e após o estresse por baixa temperatura (16°C) durante sete dias, utilizando-se de 60 peixes distribuídos aleatoriamente em 30 aquários de 40 L, dotados de biofiltros e aeração individuais. A inclusão de PD determinou maior ganho de peso e peso final e melhora da integridade intestinal. Manutenção e/ou estímulo à eritropoiese foi observado com a inclusão de PD inferindo melhor higidez e resistência orgânica aos peixes expostos ao estresse por baixa temperatura. Aumento na produção de neutrófilos e manutenção de monócitos demonstrou o efeito estimulatório do PD sobre o sistema imune inato. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram realizadas análises de regressão nos casos em que o modelo foi significativo ($R^2 > 0,70$). Para dados fora da curva de normalidade, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), complementados com o teste de comparações de Mann-Whitney. A inclusão de PD à dieta de *Oreochromis niloticus* melhora o desempenho produtivo, a saúde intestinal, perfil hematológico e resistência orgânica ao estresse por baixa temperatura. Com base nos resultados de desempenho e histologia, recomenda-se o nível de inclusão de 4,97% à dieta, pois traz mais benefícios quando comparado ao tratamento sem inclusão.

Palavras Chave: desempenho produtivo, hematologia, histologia, estresse, plasma sanguíneo desidratado

DEHYDRATED BLOOD PLASMA IN THE FEEDING NILE TILAPIA

Abstract: This study evaluated the inclusion of dehydrated blood plasma (PD) on Nile tilapia diet by a research divided in two stages: 1° Stage, after 60 days, was measured the productive performance and histological parameters of fish, whose received five diets: PD0 (control); PD 1,66; PD 3,32; PD 4,97; PD 6,63% of dehydrated blood plasma inclusion. 440 fish was randomized into 40 aquariums (250 L) with physic-biological filter and automatic system water control ($26 \pm 1^{\circ}\text{C}$) on the 1st. On the second stage, was evaluated hematological parameters of Nile tilapia juveniles, before and after the cold stress (16°C). During seven days, 60 fish were allocated in 30 aquariums (40 L), with individual aeration and filters, provided by a division in each, that assure individuals spaces. PD inclusion results presented greater weight gain, final weight and improves the intestinal integrity. Maintenance and/or stimulation of erythropoiesis was observed with the addition of PD, inferring better health and fish organic resistance exposed to stress by low temperature. Increased production of neutrophils and monocytes maintenance, demonstrated the stimulatory effect of PD on the innate immune system. The data was submitted to the analysis technique variance ($P < 0.05$), complemented by the multiple comparison Tukey test. Regression analyzes were performed when the model was significant ($R^2 > 0.70$). For outresults of the normal curve, was applied the nonparametric Kruskal-Wallis analysis ($P < 0.05$), complemented by Mann-Whitney test comparisons. The inclusion of PD for *Oreochromis niloticus* on diet, improves growth performance, gut health, blood profile and organic resistance to stress by low temperature. Based on the results of growth performance and histology, is recommended the PD inclusion of 4.97 % on the diet, because it brings more benefits when compared to PD treatment without inclusion.

Key words: blood plasma, cold-stress, hematology, histology, productive performance.

1. Introdução

A produção brasileira de tilápias tem apresentado crescimento anual de 17; 7 e 9%, respectivamente para os anos de 2010, 2011 e 2012 (FAO, 2015). Tal crescimento justificou-se pela necessidade em atender a crescente demanda por pescado, a qual culminou com mudanças circunstanciais nos sistemas de produção, logo tornando os sistemas intensivos mais, frequentemente, utilizados. Com isto aumentou-se a necessidade por novos alimentos, insumos, subprodutos, rações entre outros que sustentem esta evolução (SCORVO FILHO, FRASCÁ-SCORVO, ALVES & SOUZA, 2010). Somada a essa necessidade busca-se, ainda, alimentos alternativos e/ou produtos funcionais que melhorem a higidez dos peixes, visto que a criação em espaços cada vez mais reduzidos e com alta taxa de lotação gera ambiente fisiologicamente não desejado, o que aumenta a susceptibilidade à infecções e doenças (SAKAI, 1999).

Dentre os alimentos alternativos a serem utilizados em dietas para peixes pode-se considerar o plasma sanguíneo desidratado (PD). O PD é ingrediente proteico de alta qualidade, produzido a partir do sangue de suínos ou bovinos e, composto por proteínas de alto valor biológico, imunoglobulinas, albumina, fribrirogênio, lipídeos, enzimas, fatores de crescimento, peptídeos biologicamente ativos, por exemplo transferrinas (CAMPBELL, CRENSHAW, RUSSELL, HAYES, BARANCELLI & RANGEL, 2008); é também rico em ácido glutâmico, glutamina e treonina, além de ser considerado seguro para uso em diversas espécies de animais (FERREIRA, BARBOSA, TOKACH & SANTOS, 2009; FRUGÉ, BIDNER, & SOUTHERN, 2009; CAMPBELL, POLO, RUSSELL & CRENSHAW, 2010; HENN, BOCKOR, VIEIRA, RIBEIRO, KESSLER, ALBINO, ROSTAGNO, CRENSHAW, CAMPBELL & RANGEL, 2013; GISBERT, 2015).

Algumas propriedades do PD, como por exemplo a alta qualidade proteica, são atribuídas ao processo de produção "spray-dry", pois este preserva as características nutricionais e funcionais, por exemplo a presença de imunoglobulinas, de sua composição culminando em menor perda de suas propriedades comparando-se com métodos de processamentos convencionais (LUZIER, SUMMERFELT, & KETOLA, 1995; CAMPBELL et al., 2008). Ainda, segundo Bureau, Harris & Cho (1999) apresenta digestibilidade aproximada de 99%, excelente perfil de aminoácidos e boa palatabilidade aos animais, devido à presença do glutamato (LAWRENCE, GOODBAND, TOKACH, DRITZ, NELSEN & DEROUCHÉY, 2004). A melhora no

consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar têm sido relatada para leitões em fase de creche (GATTÁS, FERREIRA, BARBOSA, SILVA, DONZELE & LOPES, 2008; MUNIZ, BERTO, WECHSLER & LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2009).

Além disso, ao PD têm-se atribuído propriedades funcionais diretas e indiretas no que se refere à imunologia, pelo aumento de imunoglobulinas específicas e leucócitos e à histologia, pelo aumento da altura de vilosidades, diminuição da profundidade de criptas e aumento no número de células caliciformes; além da maior atividade enzimática e capacidade antioxidante (PÉREZ-BOSQUE, AMAT, POLO, CAMPBELL, CRENSHAW, RUSSELL & MORETÓ, 2006; CAMPBELL *et al.*, 2010; GAO, JIANG, LIN, ZHENG, ZHOU & CHEN, 2011; GISBERT, 2015). Sua relação direta e indireta na manutenção e/ou estímulo da saúde intestinal comprovada em diversos estudos, principalmente com suínos, deve-se à rica composição de aminoácidos, tais como a glutamina, glutamato e treonina, pois estes estão relacionados com a nutrição dos enterócitos, produção de mucina, fonte energética, síntese de bases nitrogenadas (nucleotídeos), estímulo à barreira mecânica contra patógenos e estímulo à resposta imune inata pelo aumento dos leucócitos e imunoglobulinas (WU, KNABE, YAN & FLYNN, 1995; RHOADS, ARGENZIO, CHEN, RIPPE, WESTWICK, COX, BERSCHNEIDE & BRENNER, 1997; SILVA, FURUYA, SANTOS, SANTOS, SILVA & PINSETTA, 2006).

Apesar do conhecimento benéfico do plasma sobre os animais nos diferentes sistemas produtivos, pouco tem sido pesquisado para espécies aquícolas (JOHNSON & SUMMERFELT, 2000). Desta forma, a indústria e produtores, ainda, desconhecem a possibilidade de utilização do PD visando a melhora dos índices zootécnicos e/ou diminuição dos possíveis impactos fisiológicos negativos, oriundos do estresse produtivo ou alto desafio sanitário e/ou ambiental.

Apesar de todos os benefícios gerados com o uso do PD deve-se atentar quanto ao uso e finalidade do mesmo, visto que seu custo pode exercer importante impacto no custo final das dietas e, conseqüentemente na produção. Wilson (1995) ressalta que a quantidade a ser utilizada dependerá da espécie, custo, palatabilidade, disponibilidade e processamento empregado. Logo, estratégia cautelosa deve ser empregada no desenvolvimento e utilização de dieta funcional.

Com base no exposto o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de plasma sanguíneo desidratado no desempenho

produtivo, composição bromatológica da carcaça, viabilidade econômica das dietas, parâmetros histológicos e hematológicos de juvenis de tilápias-do-Nilo.

2. Materiais e Métodos

A realização do presente estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEAU/FMVZ, sob Protocolo N° 134/2013. A pesquisa foi dividida em duas fases e conduzida na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Laboratório de Nutrição e Saúde de Organismos Aquáticos – AquaNutri.

Na Fase I foram avaliados os efeitos de níveis de inclusão de plasma sanguíneo na dieta sobre o desempenho produtivo, custo das dietas e respostas histológicas. O desempenho produtivo foi avaliado após 60 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições. Na Fase II foram avaliadas as respostas hematológicas, antes e após estresse por baixa temperatura, com duração de sete dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições.

2.1. Dietas experimentais

Foram confeccionadas cinco dietas, constituindo os tratamentos com os respectivos níveis percentuais de inclusão de PD, baseando-se nos valores médios de inclusão encontrados na literatura para leitões, sendo o tratamento PD 0 (controle); PD 1,66; PD 3,32; PD 4,97 e PD 6,63 (Tabela 01). As dietas foram confeccionadas de modo a conterem níveis de 13 MJ.kg⁻¹ de energia digestível (ED) e 26,8% proteína digestível (PD) baseadas em recomendações de Furuya, Pezatto, Barros, Boscolo, Cyrino, Furuya & Feiden (2010) e NRC (2011).

Para a elaboração das dietas, os ingredientes foram moídos em moinho tipo facas para obtenção de partículas de diâmetro geométrico médio inferior a 0,42 mm. Após pesagem e homogeneização foi acrescida água à mistura e as dietas foram peletizadas. Após processamento as dietas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada à 55°C durante 24 horas. O tamanho dos péletes foi adequado a fase e tamanho de desenvolvimento dos peixes. O armazenamento foi realizado em câmara fria à 4°C.

As dietas foram ofertadas manualmente quatro vezes ao dia, às 8h30, 11h30, 14h30 e 17h30, até a saciedade aparente.

2.2. Desempenho produtivo e custo das dietas

A estrutura experimental utilizada foi constituída por 40 aquários com capacidade para 250 litros cada. O conjunto de aquários foi dotado de sistema de filtragem de água físico e biológico, por meio de biofiltro e sistema de aquecimento. Foi realizada a distribuição aleatória de 440 juvenis de tilápia-do-Nilo invertidos sexualmente, com peso médio inicial de $12,44 \pm 0,64$ g perfazendo lotação de 11 peixes/aquário.

Semanalmente foi efetuado o monitoramento da qualidade da água avaliando-se a temperatura, oxigênio dissolvido e pH (sonda YSI®). Semanalmente ou sempre que necessário, foram realizadas sifonagens e limpeza dos aquários experimentais para a retirada de eventuais sobras de dietas e acúmulo de excretas.

As variáveis físico-químicas da água se mantiveram dentro da faixa considerada de conforto para a espécie *Oreochromis niloticus*, sendo os valores $25,5 \pm 1^\circ\text{C}$, $5,8 \pm 0,4$ mg/L e $6,7 \pm 0,5$ respectivamente para temperatura, oxigênio dissolvido e pH (BOYD, 1996).

Todos os peixes foram pesados em balança digital no início e final do período experimental (60 dias) para determinação do ganho de peso (GP), peso final (Pf) e taxa de crescimento específico (TCE). Além destas também foram avaliados o consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de sobrevivência (Sbv), taxa de eficiência proteica (TEP), taxa de retenção proteica (TRP), e índice de gordura visceral (GV) (Tabela 02).

$$GP = Pf - Pi \text{ (g/peixe)}$$

$$CR = \text{consumo de ração (g/peixe)}$$

$$Pf = \text{peso final (g/peixe)}$$

$$CA = \frac{I}{GP}$$

$$TEP = \frac{GP}{Ip} \times 100 \quad (\%)$$

$$Ip = \frac{(PB \times CR)}{100}$$

$$Sbv = \frac{n^\circ \text{ peixes vivos final}}{n^\circ \text{ peixes total}} \times 100 \quad (\%)$$

$$TRP = \frac{(Pf \times PCf) - (Pi \times PCi)}{Ip} \times 100 \quad (\%)$$

$$TCE = \frac{\ln(Pf) - \ln(Pi)}{t} \times 100 \quad (\%)$$

$$GV = \frac{\text{peso da gordura visceral}}{\text{peso do peixe}} \times 100 \quad (\%)$$

Em que:

Pi = peso inicial;

PCi = peso corporal inicial;

Pf = peso final;

PCf = peso corporal final;

I = ingestão de ração;

PB = proteína bruta dieta;

GP = ganho de peso;

CR = consumo ração.

Ip = ingestão de proteína;

Para determinação da composição bromatológica da carcaça, com amostragem inicial e ao final do período experimental, cada peixe foi individualmente moído por duas vezes (moedor de carne Arbel MCR08), sem as escamas, homogeneizado manualmente e, posteriormente, levado à estufa (65 °C) por 48 horas para a pré-secagem. Após, este foi novamente processado e homogeneizado, sendo posteriormente identificadas as amostras e acondicionadas em freezer à -20 °C, em recipientes plásticos livres de contaminantes. Finalmente, após processadas estas foram encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia da FMVZ – Botucatu e, conforme a metodologia AOAC (2000) foi determinado o teor de matéria seca, proteína bruta, matéria mineral e extrato etéreo.

Ao final da Fase I foi calculada a viabilidade econômica em relação a utilização do PD nas dietas, sendo determinado o custo aproximado de alimentação por quilograma de peso vivo de peixe produzido (CMA), segundo Bellaver, Fialho, Protas & Gomes (1985). Posteriormente, foi calculado o Índice de Eficiência Econômica (IEE) e o Índice de Custo (IC) segundo Barbosa, Fialho, Ferreira, Lima & Gomes (1992) (Tabela 03).

$$Y_i = \frac{Q_i \times P_i}{G_i} \quad (\$/kg \text{ PV}) \quad \quad \quad IC = \frac{CT_{ei}}{MC_e} \times 100 \quad (\%)$$

$$IEE = \frac{MC_e}{CT_{ei}} \times 100 \quad (\%)$$

Em que:

Y_i = custo médio da ração por quilograma ganho no i -ésimo tratamento; Q_i = quantidade média de ração consumida no i -ésimo tratamento;

P_i = preço médio por quilograma de ração utilizada no i -ésimo tratamento;

G_i = ganho médio de peso do i -ésimo tratamento;

MC_e = menor custo médio observado em ração por quilograma de peso vivo ganho entre os tratamentos;

CT_{ei} = custo médio do tratamento i considerado.

Os preços dos ingredientes (\$/kg) utilizados na elaboração dos custos foram: milho (\$0,11), farelo de soja (\$0,3), farelo de trigo (\$0,16), óleo de soja (\$0,83), plasma (\$4,89), amido (\$0,48), calcário calcítico (\$0,02), fosfato bicálcico (\$0,41), sal comum (\$0,04), L-lisina (\$2,22), DL-metionina (\$8,90), L-treonina (\$4,9), L-triptofano (\$18,75) premix mineral e vitamínico (\$8,99), BHT (antioxidante) (\$3,5), vitamina C (\$3,5), cloreto de colina (\$1,6) e antifúngico (\$3,78). O valor referência do dólar utilizado foi \$1,00 = R\$3,17, segundo Banco Econômico Central do Brasil na data de 27/05/2015.

2.3. Análises hematológicas

Para a realização das análises hematológicas foram retirados oito peixes/tratamento (dois por aquário), ao final do período experimental (60 dias). Os peixes foram anestesiados (benzocaína, 0,06g L⁻¹ de água) e, após completa dessensibilização, foi coletado o sangue por punção da veia caudal, com seringa de 1 mL banhada com o anticoagulante EDTA a 3,0%.

A contagem do número de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01% diluído em solução fisiológica 0,9% em pipeta de Thoma, na proporção 1:200. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina,

utilizando-se kit comercial Hemoglobina Analisa Diagnóstica® para determinação colorimétrica. O hematócrito foi obtido utilizando-se o método do microhematócrito. Essas variáveis foram obtidas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). Foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), os quais são úteis na classificação morfológica das anemias.

A diferenciação dos leucócitos foi realizada em extensão sanguínea, corada com May-Grünwald Giemsa. Para tal, foram utilizadas lâminas previamente limpas e desengorduradas, primeiramente em solução de água e detergente, enxaguadas em água destilada e posteriormente em solução de álcool etílico P.A. (50,0%) e éter etílico P.A. (50,0%) e secas com auxílio de gaze. Para a confecção dos esfregaços, as lâminas foram devidamente identificadas e confeccionadas duas lâminas/peixe. Após a confecção essas foram acondicionadas em caixas apropriadas e posteriormente coradas utilizando-se técnica descrita por Jain (1986). A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento 100x em óleo de imersão. Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

A proteína plasmática total foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg, pela quebra do capilar de microhematócrito logo acima da camada de leucócitos, após a leitura do hematócrito. Para a análise de albumina foram utilizadas as mesmas amostras de sangue colhidas para o hemograma. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20°C para posterior análise. A quantidade de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial Albumina Analisa Diagnóstica® para determinação colorimétrica. De posse dos resultados de albumina e proteína plasmática total foi então estimada a quantidade de globulina no plasma e, posteriormente, calculada a relação albumina:globulina (A:G).

2.4. Análise histológica

Para a análise histológica foram utilizados 30 peixes (seis peixes de cada tratamento) para estudo da vilosidade e da cripta do tecido epitelial do intestino dos peixes. Ao final de 60 dias os peixes foram eutanasiados pela secção da medula espinhal, após insensibilização por benzocaína (0,06g l⁻¹). Fragmentos representativos do terço inicial, região proximal, do intestino foram devidamente coletados, por cortes

longitudinais e fixados em placas de isopor, e imediatamente submetidos à fixação em formalina 10% tamponada. Após 48 horas as amostras foram lavadas em água corrente e imersas no álcool etílico 70% onde permaneceram até o momento do processamento. Os fragmentos foram então submetidos a desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. Por ato contínuo, foram realizados cortes de 4 μ m em micrótomo automático (Leica®). Em seguida procedeu-se a desparafinização, reidratação e coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), conforme protocolo histotécnico padrão. Após realizou-se leitura morfométrica das vilosidades e cripta do intestino, altura e profundidade respectivamente, sendo que trinta mensurações por parâmetro foram consideradas para o estudo. O processo, bem como a leitura das lâminas histológicas foram realizados com auxílio de microscópio ótico acoplado ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27) no Laboratório de Clínica Veterinária, FMVZ - Unesp, Botucatu.

2.5. Desafio por baixa temperatura

Após as avaliações hematológicas, um lote diferente e não manejado foi transferido para a sala de desafio. Esta sala experimental continha 30 aquários de 40 L cada com filtros individualizados, aeração e sistema trocador de calor, que permite o abaixamento da temperatura ambiente e, conseqüentemente, o resfriamento da água.

Foram distribuídos aleatoriamente 60 peixes, na densidade de dois peixes/aquário, com seis repetições/tratamento. Após a transferência dos peixes foi efetuada a redução gradual da temperatura em dois graus por dia até atingir a temperatura de 16°C. Ao final de sete dias foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos iniciais.

2.6. Análises estatísticas

Quando houve normalidade, os dados foram submetidos à técnica de análise de variância para o modelo com um fator e complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram realizadas análises de regressão nos casos em que o teste de médias foi significativo ($R^2 > 0,70$) para determinar o nível ótimo de inclusão de PD. Quando os dados não se encontraram na curva de normalidade, estes foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e complementados com o teste de

comparações de Mann-Whitney. Considerou-se como resultados significativos para $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010).

3. Resultados

A inclusão dietética de 4,97 e 6,63% de PD determinou melhores Pf e GP ($P < 0,05$) em relação ao tratamento controle, porém não diferiu da inclusão de 1,66 e 3,32%. Com base em regressão linear (R^2 91%) para Pf e quadrática para GP (R^2 91%), com ponto ótimo de 7,5, o tratamento PD 6,63 determinou melhores resultados. As melhores TCE foram observadas para os peixes dos tratamentos PD 3,32 e PD 4,97 ($P < 0,05$) em relação ao controle, porém não diferindo de PD 1,66 e PD 6,63 e, com base na regressão quadrática (R^2 99%) observou-se ponto ótimo de 5,07. O melhor CR foi observado para os peixes do tratamento PD 6,63 ($P < 0,05$) em relação ao controle, regressão linear (R^2 94%), porém não diferiu dos peixes dos tratamentos PD 1,66, PD 3,32 e PD 4,97. A melhor CA foi observada para os peixes que receberam a dieta PD 6,63 ($P < 0,05$) em relação ao controle, porém não diferiu de PD 3,32 e PD 4,97, com base na regressão linear (R^2 98%). A melhor TEP foi determinada para os peixes que receberam PD 3,32 e PD 6,63, porém não diferiu de PD 0 e PD 4,97, para esta variável não houve ajuste para o modelo biológico (R^2 34%). A inclusão dietética de PD não exerceu influência sobre a composição bromatológica das carcaças ($P > 0,05$).

O maior nível de inclusão dietético de PD determinou o maior custo médio de alimentação/kg peso vivo peixe (CMA) ($P < 0,05$). Este maior nível de inclusão de PD foi o que determinou, conseqüentemente, pior índice de eficiência econômica e pior índice de custo.

A maior profundidade de cripta foi determinada nos peixes que receberam as rações PD 0 e PD 1,66. Já para V:C determinou-se melhor relação ($P < 0,05$) para os peixes do tratamento PD 4,97 em relação ao PD 0. Não houve efeito do PD na vilosidade do intestino dos peixes ($P > 0,05$) (Tabela 04 e Figura 01).

Após o desafio verificou-se que com a inclusão de 1,66% de PD determinou menor porcentagem de Htc e 6,63% a maior ($P < 0,05$). Comparando-se as condições, antes e após o estresse por baixa temperatura observou-se diminuição para as variáveis Htc e VCM ($P < 0,05$), para os peixes que receberam a dietas PD 1,66. Os peixes que receberam a dieta PD 4,97 tiveram aumento ($P < 0,05$) na CHCM entre os momentos. No

entanto, para as variáveis Erit e Hb não houve diferença ($P>0,05$) para os tratamentos nas Fases I e II separadamente, bem como entre as fases antes e depois (Tabela 05).

Na fase anterior ao estresse observou-se que a ausência de PD na dieta determinou menores valores de Leuc e Linf, enquanto que a inclusão de 6,63% PD o maior ($P<0,05$). Já para a variável Mon a ausência também determinou menor valor e a inclusão de 4,97% PD maior valor ($P<0,05$). Avaliando-se os tratamentos após o estresse por baixa temperatura observou-se menores valores de Leuc e Mon para os peixes que receberam, respectivamente, as dietas PD 0 e PD 1,66, sendo que para Neut menor valor foi determinado para os peixes que receberam a dieta PD 1,66 e maior valor para PD 3,32 ($P<0,05$). Comparando-se as condições, anterior e posterior ao estresse, observou-se diminuição dos valores de Leuc para os peixes de todos os tratamentos, exceto para os que receberam a dieta PD 3,32. Essa mesma redução foi observada para os Linf em todos os tratamentos. Observou-se aumento ($P<0,05$) para Neut em todos os peixes, independente no nível de inclusão de PD (Tabela 06).

Após o estresse observou-se menores valores de PPT para os peixes que receberam a dieta PD 1,66 e maiores valores para aqueles que receberam as dietas PD 4,97 e PD 6,63 ($P<0,05$). Para Glob menor valor foi determinado nos peixes que receberam a dieta PD 1,66 e maior valor para PD 6,63 ($P<0,05$). Comparando-se as condições, anterior e posterior ao estresse observou-se aumento da Alb ($P<0,05$) nos peixes de todos os tratamentos, exceto aqueles que receberam a dieta PD 3,32 e, para relação A:G houve aumento ($P<0,05$) para os peixes de todos os tratamentos independente do nível de inclusão de PD (Tabela 07).

4. Discussão

Melhora no desempenho produtivo, para animais alimentados com dieta contendo plasma sanguíneo desidratado tem sido relatada, principalmente para suínos na fase pós desmame, sendo descrito, por exemplo, aumento no consumo de ração (SPENCER, TOUCHETTE, LIU, ALLEE, NEWCOMB, KERLEY & PACE, 1997; TOUCHETTE, CARROLL, ALLEE, MATTERI, DYER, BEAUSANG & ZANNELLI, 2002), melhora no ganho de peso (BARBOSA, FERREIRA, GATTÁS, SILVA, DONZELE, BRUSTOLINI & LOPES, 2007; GATTÁS *et al.*, 2008;) e proteção das vilosidades intestinais (YU, WU & YANG, 2002). Alguns destes benefícios foram comprovados neste estudo quando da inclusão de até 6,63% PD determinando maior

peso final e ganho de peso para peixes que receberam dietas com maiores níveis de inclusão PD. Essa melhora do GP pode estar associada a melhora no CR, CA e TEP, fato que pode ser atribuído à boa palatabilidade do ingrediente, como já constatado anteriormente para suínos (DIEHL, 2004). Essa melhora do desempenho produtivo se justifica, ainda, pela presença de proteínas de alto valor biológico, devido ao bom perfil de aminoácidos do ingrediente (CAMPBELL *et al.*, 2008). Os benefícios do plasma sanguíneo desidratado foram constatados para dourada (*Sparus aurata*) quando da inclusão de até 6% do ingrediente na dieta resultando em maior peso corporal, em melhora da atividade moduladora antioxidante e aumento no número de células caliciformes intestinais, promovendo barreira imune efetiva contra possíveis agentes patogênicos, além de melhorar a resposta imune inata (GISBERT, 2015).

Ainda como fator responsável pelo melhor desempenho produtivo, deve ser destacada a maior integridade da mucosa intestinal, justificada pela menor renovação celular ilustrada pela diminuição da profundidade das criptas dos peixes alimentados com dietas contendo PD, pois tem sido conferido a este alimento ação protetora da mucosa intestinal (YU *et al.*, 2002). Também foi constatado efeito benéfico sobre as vilosidades intestinais em estudo feito por Barbosa *et al.* (2012), com leitões após o desmame, quando da inclusão de 2,5 e 7,5% de plasma sanguíneo na dieta, de modo a contribuir para a regeneração das vilosidades intestinais. Tal efeito também foi atribuído à rica composição do plasma, a qual segundo King, Morelb, Pluskec & Hendriks (2008) contribui para o desenvolvimento intestinal, aumento de células caliciformes e, consequentemente, imunidade inata, devido a barreira criada pela maior produção de muco, dificultando a invasão de patógenos, além da redução da atrofia intestinal. Segundo Dalto, Gavioli, Oliveira, Silva, Tarsitano, Altmann, Braz, Kobayashi, Venâncio, Bridi, Bracarense & Silva (2013) houve também melhora nos parâmetros histológicos intestinais de leitões desmamados alimentados com dietas contendo PD, conferindo melhora no desenvolvimento intestinal corroborando os resultados de Torrallardona, Conde, Badiola, Polo & Brufau (2003).

Também pode-se inferir que a regeneração e defesa da mucosa intestinal estejam relacionadas com o perfil de aminoácidos, visto que o plasma é rico em ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico e treonina, intrinsecamente ligados a estas funções (LORA GRAÑA, FERREIRA, SILVA, GRAÑA, ARAÚJO & CARLOS, 2010). A glutamina é considerada aminoácido condicionalmente essencial, pois segundo Pierzynowski, Pirdra, Hommel-Hansen & Studzinski (2001), a capacidade de síntese

endógena deste, pode não ser suficiente para atender a demanda do organismo em períodos de estresse.

Este aminoácido é encontrado em grande quantidade no tecido muscular e no plasma e, segundo Rhoads *et al.* (1997) é a principal fonte de nutrição dos enterócitos, além de ser doador de nitrogênio para a biossíntese de purinas e pirimidinas, elementos básicos de nucleotídeos, que também estão ligados à recuperação da mucosa intestinal. Ressalta-se também, segundo Wang, Viar, Blanner & Johnson (1996) e Emmerson, Turner, Foster, Anthony & Nestor (1997), que a glutamina também atua como precursor da enzima ornitina descarboxilase, a qual relaciona-se com o crescimento celular, síntese proteica (catalisa conversão de ornitina para putrescina), é precursora de poliaminas (espermidina e espermina) que atuam na integridade de membrana (mitocôndrias), além da ação direta na maturação dos enterócitos quando da migração da cripta para o ápice do vilo. Já o ácido glutâmico, é precursor da glutamina e, também fonte energética para estruturas de vilosidades conferindo ação protetora da mucosa intestinal (WU *et al.*, 1995). A treonina é considerada um dos aminoácidos mais limitantes em dietas de peixes, além de ser o mais limitante na produção de imunoglobulinas e mucina, a qual é sintetizada em grande quantidade no tubo digestivo contribuindo para a imunidade do organismo (TIBALDI & TULLI, 1999; LI DEFA, CHANGTING, SHYAN, JINHUIA, JOHNSONB & THACKER, 1999; DE BLAS, GARCÍA & CARABAÑO, 2000; OBLED, 2003; SILVA *et al.*, 2006).

Os dados hematológicos representam importante ferramenta para avaliação do estado de saúde dos peixes (NOGA, 2000). Segundo Mahajan & Dheer (1979) o perfil hematológico dos peixes é influenciado por fatores tais como temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e pH determinando variações na obtenção dos dados, de modo a variar em função da espécie e entre indivíduos da mesma espécie. De acordo com Ranzani-Paiva (1991), tais oscilações hematológicas podem decorrer, ainda, devido ao estresse, doenças, condição nutricional, ciclo sazonal, estágio de maturação das gônadas e sexo.

Observou-se que os dados hematológicos encontraram-se dentro da faixa considerada normal para a espécie corroborando os resultados encontrados por Feldman, Zinkl & Jain (2010) e Barros, Falcon, Orsi, Pezzato, Fernandes Junior, Guimarães, Fernandes Junior, Padovani & Sartori (2014). Nota-se que após o estresse por baixa temperatura houve maior Htc quando comparados os tratamentos PD 6,63 e

PD 1,66 ($P < 0,05$), o que sugere que o maior nível conferiu melhor estado de saúde aos peixes, dando-lhes melhor condição orgânica para enfrentar tal situação de estresse.

O glutamato, presente em concentrações consideráveis no plasma sanguíneo (ácido glutâmico 11,7%, nível de garantia do produto, empresa APC An LGI Company) é componente do ácido fólico, vitamina esta relacionada com a eritropoiese, importante para a maturação dos eritrócitos (KANEKO, HARVEY & BRUSS, 1997; BARROS, RANZANI-PAIVA, PEZZATO, FALCON & GUIMARÃES, 2009), também é componente do GABA (ácido gama-aminobutírico), glutamina e glutathione (BROSNAN, 2000; WU, 2013) que são potentes antioxidantes (GISBERT, 2015). Desta forma, esperava-se como resultado da inclusão do PD na dieta que houvesse a melhora da eritropoiese, anterior ao estresse e ou manutenção desta, após o estresse por baixa temperatura. Este fato pode ser observado para todas as variáveis, com exceção do Htc e VCM, que são variáveis correlacionadas. Embora tenha havido queda no Htc, a síntese de eritrócitos e hemoglobina se manteve nos valores considerados aceitáveis para a tilápia-do-Nilo híida (FERNANDES JUNIOR, PEZZATO, GUIMARÃES, TEIXEIRA, KOCH & BARROS, 2010; GUIMARÃES, LIMB, YILDIRIM-AKSOYB, LIC & KLESIUSB, 2014; BARROS, FALCON, ORSI, PEZZATO, FERNANDES JUNIOR, GUIMARÃES, FERNANDES JUNIOR, PADOVANI & SARTORI, 2014), podendo desta forma inferir que essas alterações não estão correlacionadas com o nível de inclusão do PD.

O estresse por baixa temperatura é rigoroso aos peixes de água quente resultando na diminuição do metabolismo e, conseqüentemente, ocasionando prejuízo à saúde. Pode-se citar como possíveis quadros decorrentes do estresse por baixa temperatura leucopenia, linfopenia, neutrofilia, e monopenia, como verificado por Falcon, Barros, Pezzato & Valle (2007); Falcon, Barros, Pezzato, Solarte & Guimarães (2008); Fernandes Junior, Pezzato, Guimarães, Teixeira, Koch & Barros (2010); Signor, Pezzato, Falcon, Guimarães & Barros (2010); Araújo, Pezzato, Barros, Pezzato & Nakagome (2011) e Guimarães et al. (2014).

De modo geral observou-se melhora na produção de células brancas, tanto na fase anterior quanto posterior ao estresse nos peixes que receberam PD na dieta, sugerindo que o PD determinou peixes com melhor condição orgânica para o enfrentamento do estresse, o que pode ser confirmado pela maior produção de neutrófilos. Os neutrófilos representam as células de defesa inata com função de fagocitose, seguido dos monócitos que são precursores de macrófagos, os quais também

exercem importante função fagocítica (TIZARD, 2002; FELDMAN *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem novos estudos visando, não só a avaliação do número de células brancas e seu diferencial, mas também a ativação destas, principalmente de monócitos/macrófagos em animais submetidos à infecção bacteriana para comprovar a possível ação imunomoduladora do PD (TOUCHETTE, 2002; BOSI, CASINI, FINAMORE, CREMOKOLINI, MERIALDI, TREVISI, NOBILI & MENGHERI, 2004; CAMPBELL, QUIGLEY III & RUSSELL, 2004; PÉREZ-BOSQUE *et al.*, 2004; NOFRARÍAS, MANZANILLA, PUJOLS, GIBERT, MAJÓ, SEGALÉS & GASA, 2006; PÉREZ-BOSQUE *et al.*, 2006; PÉREZ-BOSQUE *et al.*, 2007), bem como, a avaliação da expressão de genes relacionados à imunidade (WILSON & WARR, 1992; HIKIMA, JUNG & AOKI, 2011; WAN, GEA, LIUA, XIEA, CUIA, ZHOUA, XIAA & CHENA, 2014).

Segundo Wiegertjes, Stet, Parmentier & Muiswinkel (1996) a quantificação da proteína plasmática total permite ilustrar a imunidade inata do organismo do animal. Tahmasebi-Kohyani, Keyvanshokooa, Nematollahib, Mahmoudic & Pasha-zanoosid (2011) enfatizam a essencialidade da albumina e globulina no sistema imune saudável. Tal afirmação baseia-se no fato da albumina estar relacionada ao transporte de nutrientes e equilíbrio osmótico no sangue, enquanto a globulina relaciona-se ao sistema de defesa do organismo. Neste estudo, de modo geral, os resultados de PPT e relação A:G se contrapõem à melhora da resistência orgânica dos peixes, até então apresentada. Entretanto, para melhor entender a ação do PD na defesa do organismo, ou síntese de imunoglobulinas, é necessária a identificação dos diferentes tipos de imunoglobulinas buscando saber quais estariam aumentadas, pois possuem diferentes propriedades biológicas (KAATARI, 1992; TIZARD, 2002). Esses resultados diferem dos determinados por Barros, Falcon, Orsi, Pezzato, Fernandes Jr., Guimarães, Fernandes Jr., Padovani & Sartori (2014) para tilápia-do-Nilo desafiadas com *Aeromonas hydrophila*.

A viabilidade econômica da dieta é fator importante da atividade aquícola, pois a dieta representa mais de 60% do custo total de produção (EL-SAYED, 1999) refletindo o sucesso ou fracasso do produtor. Porém, tal custo não deve ser o único fator analisado na decisão do uso da dieta, pois deve-se considerar os resultados de produção. Neste estudo, apesar do maior custo das dietas conforme o aumento no nível de inclusão de PD pode-se observar melhores índices zootécnicos e de saúde. Esta melhora, provavelmente, será melhor evidenciada em condições de produção, na qual mesmo

com maior custo, o efeito da dieta denominada funcional, será justificado em períodos específicos de maior estresse, uma vez que os ingredientes funcionais atuam direta e indiretamente na função imunológica do organismo reforçando a resposta imune inata (PEREIRA, 2012).

A inclusão de plasma sanguíneo desidratado à dieta de *Oreochromis niloticus* melhora o desempenho produtivo, saúde intestinal, perfil hematológico e resistência orgânica ao estresse por baixa temperatura. Contudo, novos estudos são necessários para melhor elucidar a resposta do plasma na dieta de tilápias-do-Nilo e, nas diferentes fases de criação, visto que este foi um estudo pioneiro. Apesar do maior custo das dietas conforme o nível de inclusão de PD, a recomendação não deve considerar somente este, mas também a relação custo x benefício. Com base nos resultados de desempenho e histologia, recomenda-se o nível de inclusão de 4,97% à dieta, pois traz mais benefícios quando comparado ao tratamento sem inclusão.

5. Referências Literárias

- ARAÚJO D.M., PEZZATO A. C., BARROS M.M., PEZZATO L.E. & NAKAGOME F.K. (2011). Hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, p.294-302.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC (2000). *Official methods of analysis*. Washington: USA.
- BARBOSA, H.P., FIALHO, E.T., FERREIRA, A.S., LIMA G.J.M.M. & GOMES M.F.M. (1992). Triguilho para suínos nas fases inicial de crescimento, crescimento e terminação. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.21, n.5, p.27-37.
- BARBOSA F.F., SILVA, F.C.O., FERREIRA A.S., PUPA J.M.R., BRUSTOLINI P.C. & CAMPOS, P.F. (2012). Efeitos de plasma sanguíneo sobre vilosidades, desenvolvimento bacteriano e desempenho de leitões criados em condições de desafio pós-desmame aos 35 dias. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.13, n.2, p.469-479.
- BARBOSA F.F., FERREIRA A.S., GATTÁS G., SILVA F.C.O., DONZELE J.L., BRUSTOLINI P.C. & LOPES D.C. (2007). Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4S), p.1052-1060.
- BARROS M.M., RANZANI-PAIVA M.J.T., PEZZATO L.E., FALCON D.R. & GUIMARÃES I.G. (2009). Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, v.40, p.895-903.
- BARROS M.M., FALCON D.R., ORSI R.O., PEZZATO L.E., FERNANDES JR. A.C., GUIMARÃES I.G., FERNANDES JR. A., PADOVANI C.R. & SARTORI M.M.P. (2014). Non-specific 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.
- BOSI P., CASINI L., FINAMORE A., CREMOKOLINI C., MERIALDI G., TREVISI P., NOBILI F. & MENGHERI E. (2004). Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science*. 82: 1764-1772.

- BELLAVER, C., FIALHO, E.T., PROTAS, J.F.S. & GOMES P.C. (1985). Radícula de malte na alimentação de suínos em crescimento e terminação. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.20, n.8, p.69-74.
- BOYD C.E. (1996). Water Quality in Ponds for Aquaculture. Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd. Hatyai, Songkhla, Thailand. p.482.
- BROSNAN J.T. (2000). Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.988S-990S.
- BUREAU D.P., HARRIS A.M. & CHO C.Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout. *Aquaculture*, 180, 345-358.
- CAMPBELL J.M., QUIGLEY III J.D. & RUSSELL L.E. (2004). Impact of spray-dried bovine serum and environment on turkey performance. *Poultry Science*. 83: 1683-1687.
- CAMPBELL J., CRENSHAW J., RUSSELL L., HAYES S., BARANCELLI G.V. & RANGEL L.F.S. (2008). Uso do plasma para modular a resposta inflamatória e o seu impacto na produção de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36 (Supl 1): s53-s59.
- CAMPBELL J.M., POLO J., RUSSELL L.E. & CRENSHAW J.D. (2010). Review of spray-dried plasma's impact on intestinal barrier function. *Livest. Sci.* 133:239-241.
- DALTO D.B., GAVIOLI D.F., OLIVEIRA E.R., SILVA R.A.M., TARSITANO M.A., ALTMANN Á.H.S., BRAZ D.B., KOBAYASHI R.K.T., VENÂNCIO E.J., BRIDI A.M., BRACARENSE A.P.F.R.L. & SILVA C.A. (2013). Efeito de dietas contendo plasma sanguíneo desidratado sobre características microbiológicas, imunológicas e histológicas de leitões leves ao desmame. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.1, p.189-197.
- DE BLAS C., GARCÍA A.I. & CARABAÑO R. (2000). Necesidades de treonina en animales monogástricos. In: CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, 16., 2000, Madrid. Proceedings... Madrid: INRA, Uniti de Nutrition et Metabolisme Proteique, p.1-24.
- DIEHL J. (2004). All in good taste: creating natural savoury flavorings from yeast. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Nottingham: Nottingham University Press, p.258-263.
- EL-SAYED, A.F.M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture*, v.179, p. 149- 168.
- EMMERSON D.A., TURNER K.A., FOSTER D.N., ANTHONY N.B. & NESTOR K.E. (1997). Ornithine decarboxylase activity in muscle, liver, and intestinal tissue of

turkeys during a short-term feed withdrawal and following refeeding Poult. Sci., 76 (1997), pp. 1563–1568.

FALCON D.R., BARROS M.M., PEZZATO L.E., SOLARTE W.V.N. & GUIMARÃES I.G. (2008). Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, p. 543-551.

FALCON D.R., BARROS M.M., PEZZATO L.E. & VALLE J.B. (2007). Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno para tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science*, v. 36, p.1462-1472.

FAO (2015). Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 14 April 2015. [Cited 15 June 2015]. Italy.

FELDMAN B.F., ZINKL J.G. & JAIN N.C. (2010). Schalm's Veterinary Hematology . 6ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1344.

FERNANDES JUNIOR A.C.F., PEZZATO L.E., GUIMARÃES I.G., TEIXEIRA C.P., KOCH J.F.A. & BARROS M.M. (2010). Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. *R. Bras. Zootec*, 39(8), p.1619-1625.

FERREIRA A.S., BARBOSA F.F., TOKACH M.D. & SANTOS M. (2009). Spray dried plasma for pigs weaned at different ages. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 1:231–235.

FRUGÉ E.D., BIDNER T.D., & SOUTHERN L.L. (2009). Effect of incremental levels of red blood cells on growth performance and carcass traits of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 87:2853–2859.

FURUYA W.M., PEZZATO L.E., BARROS M.M., BOSCOLO W.R., CYRINO J.E.P., FURUYA V.R.B. & FEIDEN A. (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM, Toledo, ed.21, p.81.

JOHNSON J.A. & SUMMERFELT R.C. (2000). Spray-dried blood cells as a partial replacement for fish meal in diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. World Aquacul. Soc.* 31:96–104.

GAO Y.Y., JIANG Z.Y., LIN Y.C., ZHENG C.T., ZHOU G.L. & CHEN F. (2011). Effects of spray-dried animal plasma on serous and intestinal redox status and cytokines of neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* 89:150–157.

- GATTÁS, G. FERREIRA A.S., BARBOSA F.F., SILVA F.C.O., DONZELE J.L. & LOPES D.C. (2008). Plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(2), 278-285.
- GISBERT E. (2015). Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and enhances the immune status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *J Anim Sci.*, 93(1):278-86.
- GUIMARÃES I.G., LIMB C., YILDIRIM-AKSOYB M., LIC M.H. & KLESIUSB P.H. (2014). Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 188, p.126–136.
- HENN J. D., BOCKOR L., VIEIRA M.S., RIBEIRO A.M.L., KESSLER A.M., ALBINO L., ROSTAGNO H., CRENSHAW J.D., CAMPBELL J.M. & RANGEL L.F.S. (2013). Inclusion of porcine spray-dried plasma in broiler diets. *J. Appl. Poult. Res.* 22:229–237.
- HIKIMA J.I., JUNG T.S. & AOKI T. (2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*, 35 (9), p. 924-936.
- JAIN N.C. (1986). *Schalm's veterinary haematology*. 4.ed.: Lea & Febiger, Philadelphia.
- KAATARI L.S. (1992). Fish B lymphocytes: defining their form and function. *Annud Rev. of Fish Diseases*, pp. 161-180.
- KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSS M.L. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th edn. Academic Press, San Diego, California, USA.
- KING M.R., MORELB P.C.H., PLUSKEC J.R. & HENDRIKS W.H. (2008). A comparison of the effects of dietary spray-dried bovine colostrums and animal plasma on growth and intestinal histology in weaner pigs. *Livestock Science*, n.119, p.167–173.
- LAWRENCE K.R., GOODBAND R.D., TOKACH M.D., DRITZ S.S., NELSEN J.L. & DEROUCHÉY J.M. (2004). Comparison of wheat gluten and spray-dried animal plasma in diets for nursery pigs. *Journal of Animal Science*, v.82, p.3635-3645.
- LI DEFA L., CHANGTING X., SHYAN Q., JINHUIA Z., JOHNSONB E.W. & THACKER P.A. (1999). Effects of dietary threonine on performance, plasma parameters and immune function of growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, v.78, p.179-188.

- LORA GRAÑA G., FERREIRA A.S., SILVA F.C.O., GRAÑA A.L., ARAÚJO W.A.G. & CARLOS C.M. (2010). Plasma sanguíneo em dietas sem antibióticos para leitões desmamados aos 21 dias de idade. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.11, n.3, p.815-826.
- LUZIER J.M., SUMMERFELT R.C. & KETOLA H.G. (1995). Partial replacement of fish meal with spray-dried blood powder to reduce phosphorous concentrations in diets for juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult. Res. 26:577–587.
- MAHAJAN, C.L. & DHEER, J.C. (1979). Cell types in the peripheral blood of air-breathing fish *Channa punctatus*. Journal Fish Biology, v. 14, p.481-487.
- MINITAB (2010). INC: Minitab: Data analysis software, release 16.1.1.0., 2010. State College, Pa, Minitab Inc.
- MUNIZ M.H.B., BERTO D.A., WECHSLER F.S. & LOPES A.B.R.C. (2001). Plasma bovino desidratado na dieta de leitões desmamados. Acta Scientiarum, MARINGÁ, v. 23, n.4, p.1003-1010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: Academy Press; p.376.
- NOFRARÍAS M., MANZANILLA E. G., PUJOLS J., GIBERT X., MAJÓ N., SEGALÉS J. & GASA J. (2006). Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. Journal Animal Science. 84: 2735-2742.
- NOGA E. (2000). Fish leukocyte responses. In: FELDMAN B. F., ZINKL J. G., JAIN N. C. Veterinary hematology. Hoboken: Wiley Blackwell. 5. ed., p.436-439.
- OBLED C. (2003). Necesidades de aminoácidos en estados inflamatorios. In: CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, 19., 2003, Madrid. Proceedings... Madrid: INRA - Unité de Nutrition et Métabolisme Protéique, p.73-88.
- PEREIRA F.A. (2012). Melhorias no desempenho de leitões através da aplicação dos conceitos da imunonutrição. Agrocere/Multimix. IV Simpósio Mineiro de Suinocultura. Lavras/MG, Brazil.
- PÉREZ-BOSQUE A., AMAT C., POLO J., CAMPBELL J.M., CRENSHAW J., RUSSELL L. & MORETÓ M. (2006). Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. Journal of Nutrition. 136: 2838- 2843.

- PÉREZ-BOSQUE A., MIRÓ L., POLO J., RUSSELL L., CAMPBELL J., WEAVER E., CRENSHAW J. & MORETÓ M. (2007). Plasma protein supplements modulate the activation of gut associated immune system induced by *S. aureus enterotoxin B* in rats. In: Abstract of 1st International Immunonutrition Workshop, Valencia, Spain.
- PÉREZ-BOSQUE A., PELEGRÍ C., VACARIO M., CASTELL M., RUSSELL L., CAMPBELL J. M., QUIGLEY J. D., POLO J., AMAT C. & MORETÓ M. (2004). Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. Aureus superantigen B*. *Journal of Nutrition*. 134: 2667-2672.
- PIERZYNOWSKI S.G., PIRDRA V.J.L., HOMMEL-HANSEN T. & STUDZINSKI T. (2001). Glutamine in gut metabolism. In: PIVA, A.; KNUDSEN, K.E.B.; LINDBERG, J.E. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham: University Press, 43-62.
- RANZANI-PAIVA M.J.T. (1991). Hematologia de peixes. In: Santos H.S.L. (Ed), *Histologia de Peixes*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, São Paulo, Brasil, p.65-70.
- RHOADS J.M., ARGENZIO R.A., CHEN W., RIPPE R.A., WESTWICK J.K., COX A.D., BERSCHNEIDE H.M. & BRENNER D.A. (1997). L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogenactivated protein kinase. *American Journal of Physiology*, n.272, p.943- 953.
- SAKAI M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*; 172: 63-92.
- SIGNOR A., PEZZATO L.E, FALCON D.R., GUIMARÃES I.G. & BARROS M.M. (2010). Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. *Ciência Animal Brasileira*, 11(3), 509-519.
- SILVA L.C.R., FURUYA W.M., SANTOS L.D., SANTOS V.G, SILVA T.S.C. & PINSETTA P.J. (2006). Níveis de treonina em rações para tilápias-do-Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* v.35, n.4, p.1258-1264.
- SCORVO FILHO J.D., FRASCÁ-SCORVO C.M.D., ALVES J.M.C. & SOUZA F.R.A. (2010). A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *R. Bras. Zootec.* [online].vol.39, suppl., ISSN 1806-9290, p.112-118.
- SPENCER J.D., TOUCHETTE K.J., LIU H., ALLEE G.L., NEWCOMB M.D., KERLEY M.S. & PACE L.W. (1997). Effect of spray-dried plasma and fructooligosaccharide on nursery performance and small intestine. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v.75, n.1, p.199.

- TAHMASEBI-KOBYANI A., KEYVANSHOKOOHA S., NEMATOLLAHIB A., MAHMOUDIC N. & PASHA-ZANOOSID H. (2011). Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Shellfish Immunol*, jan; 30(1):189-93.
- TIBALDI E. & TULLI F. (1999). Dietary threonine requirement of juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, v.175, p.155-166.
- TIZARD I.R. (2002). *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*, 6th edn. Roca, São Paulo, Brazil.
- TORRALLARDONA D., CONDE M.R., BADIOLA I., POLO J. & BRUFAU J. (2003). Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal morphology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.1220- 1226.
- TOUCHETTE K.J., CARROLL, J.A., ALLEE G.L., MATTERI R.L., DYER C.J., BEAUSANG L.A. & ZANNELLI M.E. (2002). Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.494-501.
- YU I.T., WU G.F. & YANG P.C. (2002). Roles of glutamine and nucleotides in combination in growth, immune responses FMD antibody titres of weaned pigs. *Animal Science*, v.75, p.379-385.
- WANG J.Y., VIAR M.J., BLANNER P.M. & JOHNSON, L.R. (1996). Expression of the ornithine decarboxylase gene in response to asparagine in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 271:G164–G171.
- WAN J., GEA X., LIUA B., XIEA J., CUIA S., ZHOUA M., XIAA S. & CHENA R. (2014). Effect of dietary vitamin C on non-specific immunity and mRNA expression of three heat shock proteins (HSPs) in juvenile *Megalobrama amblycephala* under pH stress. *Aquaculture*, v. 434, p. 325–333.
- WIEGERTJES G.F., STET R.J.M., PARMENTIER H.K. & MUISWINKEL W.B. (1996). Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Dev. Comp. Immunol.*, 20 (65): 365-381.
- WILSON R.P. (1995). Fish feed formulation and processing. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão : Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 126p. p.53-68.

WILSON M.R. & WARR G.W. (1992). Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, 2 (C), p.201-221.

WU G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 45:407–411.

WU G., KNABE D.A., YAN W. & FLYNN N.E. (1995). Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *American Journal Physiology*, v.37, p.334-342.

Tabela 01. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	PD 0,0	PD 1,66	PD 3,32	PD 4,97	PD 6,63
Farelo de Soja	56,0	53,5	50,9	48,4	45,8
Plasma sanguíneo desidratado ¹	-	1,66	3,32	4,97	6,63
Milho	33,1	33,1	33,1	33,1	33,1
Farelo de trigo	5	5	5	5	5
Óleo de soja	1,9	2,0	2,2	2,4	2,8
Amido	-	-	-	-	0,56
L-lisina	-	-	0,57	0,55	0,52
DL-metionina	0,22	0,88	0,88	0,89	0,89
L-treonina	0,26	0,37	0,51	0,49	0,46
L-triptofano	-	-	-	0,42	0,41
Fosfato bicálcico	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9
Calcário calcítico	-	-	0,04	0,3	0,4
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix vit/min ³	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Vit. C ⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloreto de colina ⁵	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Antifúngico ⁶	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
EB (MJ) ^{7*}	19	19	19	19	19
ED (MJ) ⁸	13	13	13	13	13
PB ^{9*}	31,05	35,06	33,23	36,33	36,65
PD ¹⁰	26,81	26,81	26,81	26,81	26,81
EE *	3,98	4,18	4,3	3,68	4,27
MM *	6,14	6,09	6,27	6,35	6,35
FB ^{11*}	4,71	4,54	4,54	4,15	4,22
MS *	94,11	93,83	94,07	94,2	94,12
Ca ¹²	0,69	0,68	0,68	0,8	0,8
P disp. ¹³	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51

¹ AP920[®] APC An LGI Company [ácido glutâmico (11,7%), ácido aspártico (7,9%), leucina (7,8%), lisina (6,8%), valina (5,3%), treonina (4,8%), serina e arginina (4,7%), fenilalanina (4,6%), alanina (4,2%), tirosina (3,6%), glicina (3,0%), isoleucina (2,9%), histidina e cistina (2,8%), triptofano (1,4) e metionina (0,7%)]; ² B-hidroxi tolueno – antioxidante; ³ Suplemento mineral e vitamínico (kg de produto): Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit.B1= 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. Fólico = 1.200mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina= 48 mg; ácido nicotínico= 24.000 mg; Mn= 4.000 mg; Zn= 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg; ⁴ Vitamina C Rovimix[®] Stay-35[®], DSM Nutritional Products, Suíça; ⁵ Veículo Q.S.P., cloreto de colina 60%, nível mínimo 600g/kg; ⁶ Fungittract-Dry[®] Falcon Aditivos (ácidos propiônico, acético, fórmico e sais) (4kg/ton), Tectron; ⁷ Energia bruta (MJ.kg⁻¹); ⁸ Energia digestível calculada (MJ. kg⁻¹); ⁹ Proteína bruta (mg.kg⁻¹); ¹⁰ Proteína digestível (mg.kg⁻¹); ¹¹ Fibra bruta (%); ¹² Cálcio total (%); ¹³ Fósforo disponível (%); * valores analisados. PD = plasma sanguíneo desidratado.

Tabela 02. Peso final (Pf), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de sobrevivência (Sbv), taxa de eficiência proteica (TEP), taxa de retenção proteica (TRP), taxa de crescimento específico (TCE) e índice de gordura visceral (GV) tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).

Tratamentos	Pf (g)	GP (g)	CR (g)	CA	Sbv (%)	TEP (%)	TRP (%)	TCE (%)	GV (%)
PD 0	76,3 ^b ± 3,80	63,5 ^b ± 3,79	80,3 ^b ± 3,26	1,183 ^a ± 0,05	100	2,551 ^{ab} ± 0,05	48,9 ± 10,79	2,99 ^b ± 0,15	1,1 ± 0,29
PD 1,66	79,9 ^{ab} ± 2,76	67,6 ^{ab} ± 2,79	82,8 ^{ab} ± 1,88	1,151 ^{ab} ± 0,03	100	2,329 ^b ± 0,01	49,0 ± 4,27	3,12 ^{ab} ± 0,07	1,4 ± 0,48
PD 3,32	81,6 ^{ab} ± 4,14	69,6 ^{ab} ± 4,17	81,0 ^{ab} ± 1,92	1,103 ^{abc} ± 0,08	98,9 ± 3,21	2,558 ^a ± 0,07	54,1 ± 5,60	3,18 ^a ± 0,11	1,1 ± 0,31
PD 4,97	86,9 ^a ± 8,06	74,2 ^a ± 8,07	82,8 ^{ab} ± 2,94	1,060 ^{bc} ± 0,09	97,9 ± 6,43	2,464 ^{ab} ± 0,08	56,6 ± 11,07	3,19 ^a ± 0,15	1,6 ± 0,36
PD 6,63	86,1 ^a ± 7,19	73,3 ^a ± 7,09	84,2 ^a ± 3,24	1,046 ^c ± 0,05	100	2,667 ^a ± 0,05	53,3 ± 12,31	3,16 ^{ab} ± 0,13	1,3 ± 0,69
P valor	0,003	0,003	0,047	0,032	0,533	0,008	0,399	0,017	0,316

Valores médios ± desvio padrão (n=8); Sobrescritos minúsculos diferem entre si na coluna pelo Teste de Tukey (P<0,05). Pf (g/peixe) = peso médio final g.kg⁻¹; CR (g/peixe) = consumo ração total g. /n° peixes; GP (g/peixe) = Pi - Pf; CA = ingestão total de alimento g. / GP; So (%) = n° peixes vivos ao final*100/n° de peixes inicial; TEP (%) = GP/ingestão total de proteína g. de peso seco*100; TRP (%) = (Pf*proteína corporal final g. de peso úmido)-(Pi*proteína corporal inicial g. de peso úmido)/ingestão de proteína g., peso seco*100; TCE (%) = (ln(Pf)-ln(Pi)/período de alimentação em dias)*100; GV (%) = peso gordura visceral g. *100/peso peixe g. Pf = 76,83+1,59x (R² = 91%); GP = 63,34+2,85x-0,19 x² (R² = 91%); CR = 80,63+0,31x (R² = 94%); CA = 1,184-0,021x (R² = 98%); TEP (R² = 34%); TCE = 2,993+0,091x-0,009x² (R² = 99%).

Tabela 03. Custo médio (\$) de alimentação por quilograma de peso vivo de peixe produzido (CMA), índice de eficiência econômica (IEE) e índice de custo (IC) de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).

Tratamentos	CMA (\$/kg PV)	IEE (%)	IC (%)
PD 0	0,4 ± 0,02 ^d	100	100
PD 1,66	0,6 ± 0,02 ^c	73,12	136,76
PD 3,32	0,7 ± 0,05 ^c	63,53	157,41
PD 4,97	0,8 ± 0,07 ^b	52,36	190,97
PD 6,63	0,9 ± 0,1 ^a	46,42	215,42
P valor	0,001	-	-

Valores médios ± desvio padrão (n=8) para variável Custo. Sobrescritos minúsculas diferem entre si na coluna pelo Teste de Tukey (P<0,05). CMA = 0,44-0,07x (R² = 89,5%). As variáveis IEE e IC não foram submetidas à análise estatística.

Tabela 04. Altura de vilosidade (V), profundidade de cripta (C) e relação vilosidade:cripta (V:C) de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas experimentais durante 60 dias (Fase I).

Tratamentos	V (μm)	C (μm)	V:C
PD 0	558,9 $\pm$ 66,6	63,4 $\pm$ 4,5 ^a	8,8 $\pm$ 1 ^b
PD 1,66	487 $\pm$ 99,6	55,2 $\pm$ 7,9 ^{ab}	8,8 $\pm$ 1,3 ^b
PD 3,32	508,7 $\pm$ 189	52,1 $\pm$ 6,8 ^b	9,6 $\pm$ 2,7 ^{ab}
PD 4,97	561,6 $\pm$ 66,5	48,9 $\pm$ 1,4 ^b	11,5 $\pm$ 1,5 ^a
PD 6,63	537,3 $\pm$ 76,2	49,9 $\pm$ 4,3 ^b	10,7 $\pm$ 0,9 ^{ab}
P valor	0,721	0,001	0,029

Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=12). Sobrescritos minúsculas diferem entre si na coluna pelo Teste de Tukey (P<0,05). C = 63,14-5,13x+0,47x² (R² = 98%); V:C = 8,87+0,34x (R² = 74%).

Tabela 5. Eritrócitos (Erit), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.

Trat	Erit ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)			Hb (g dL ⁻¹)			Htc (%)			VCM (fL)			CHCM (%)		
	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor
0	1,8 (1,85)	1,8 (1,78)	0,518	6,9 (6,79)	6,3 (6,55)	0,401	29,7 (28,2)	26,4 ^{ab} (26,5)	0,106	162 (158)	151 (147)	0,137	23,3 (23,7)	24,6 (23,7)	0,605
1,66	1,8 (1,80)	1,7 (1,72)	0,477	6,4 (6,52)	6,0 (5,79)	0,220	27,8 (27,2 ^A)	23,5 ^b (23,2 ^B)	0,033	156 (149 ^A)	136,3 (138 ^B)	0,017	23,1 (24,0)	25,6 (25,8)	0,061
3,32	1,8 (1,85)	1,8 (1,93)	0,651	6,6 (6,63)	6,7 (7,16)	0,846	28,4 (28,7)	26,8 ^{ab} (26,5)	0,477	159 (154)	151 (161)	0,846	23,0 (24,0)	25,0 (24,8)	0,081
4,97	2,0 (2,02)	1,8 (1,79)	0,333	7,0 (7,25)	7,2 (7,44)	0,477	29,2 (29,5)	28,1 ^{ab} (28,2)	0,796	147 (149)	154 (153)	0,106	23,9 (23,8 ^B)	25,8 (25,3 ^A)	0,017
6,63	1,9 (1,89)	2,0 (2,08)	0,106	6,9 (6,72)	7,5 (7,36)	0,137	28,9 (28,7)	30,9 ^a (31,2)	0,196	155 (152)	154 (154)	0,948	24,0 (24,7)	24,3 (24,4)	1,000
*P	0,291	0,190		0,559	0,099		0,715	0,019		0,218	0,238		0,639	0,643	

Período antes (n=8) e após (n=6).

*Sobrescritos minúsculas diferem entre si na mesma coluna pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$); diferença dentro de Fase.

**Sobrescritos maiúsculas diferem na linha entre os momentos antes e após estresse por baixa temperatura, pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$); diferença entre Fases .

Médias (n=8) e medianas (n=6).

Tabela 06. Contagem diferencial de leucócitos totais (Leu), linfócitos (Linf), neutrófilos (Neut) e monócitos (Mon) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.

Tratamentos	Leu (μL^{-1})			Linf (μL^{-1})			Neu (μL^{-1})			Mon (μL^{-1})		
	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor	antes	após	**P valor
0	59129 ^b (57635 ^A)	42411 ^b (38799 ^B)	0,045	55432 ^b (54028 ^A)	35541 ^b (30157 ^B)	0,033	230 (199 ^B)	2949 ^{ab} (2931 ^A)	0,002	3466 ^b (4056)	3919 ^b (3795)	0,846
1,66	69361 ^{ab} (72249 ^A)	44455 ^{ab} (45220 ^B)	0,045	64389 ^{ab} (67721 ^A)	37169 ^b (39278 ^B)	0,045	87 (0 ^B)	2863 ^b (2676 ^A)	0,002	4576 ^{ab} (4957)	4422 ^b (3034)	0,651
3,32	71642 ^{ab} (71630)	63462 ^{ab} (60675)	0,333	68074 ^{ab} (67475 ^A)	49481 ^b (49047 ^B)	0,045	55 (0 ^B)	6794 ^a (5953 ^A)	0,002	3512 ^b (3214)	7186 ^{ab} (6812)	0,061
4,97	83553 ^{ab} (89063 ^A)	50529 ^{ab} (51170 ^B)	0,033	74992 ^{ab} (78608 ^A)	40140 ^b (39978 ^B)	0,024	244 (203 ^B)	5686 ^{ab} (4456 ^A)	0,002	8317 ^a (10021)	4653 ^{ab} (4435)	0,081
6,63	97622 ^a (99227 ^A)	68863 ^a (65436 ^B)	0,017	90338 ^a (91615 ^A)	49135 ^b (50200 ^B)	0,003	100 (0 ^B)	5517 ^{ab} (5513 ^A)	0,002	7223 ^{ab} (6848)	9717 ^a (8806)	0,401
*P valor	0,014	0,017		0,026	0,274		0,270	0,021		0,003	0,013	

Período antes (n=8) e após (n=6).

*Sobrescritos minúsculas diferem entre si na mesma coluna pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$); diferença dentro de Fase.

**Sobrescritos maiúsculas diferem na linha entre os momentos antes e após estresse por baixa temperatura, pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$); diferença entre Fases .

Médias (n=8) e medianas (n=6).

Tabela 07. Proteína plasmática total (PPT), albumina (Alb), globulina (Glob), relação albumina:globulina (A:G) de tilápias-do-Nilo alimentadas com as dietas experimentais antes (Fase I) e após (Fase II) estresse por baixa temperatura.

Tratamentos	PPT (g dL ⁻¹)			Alb (g dL ⁻¹)			Glob (g dL ⁻¹)			A:G		
	antes	após	** P valor	antes	após	** P valor	antes	após	** P valor	antes	após	** P valor
0	2,8 (2,82)	2,9 ^{ab} (2,90)	0,744	0,5 (0,48 ^B)	0,7 (0,66 ^A)	0,028	2,3 (2,37)	2,3 ^{abc} (2,30)	0,796	0,2 (0,23 ^B)	0,3 (0,29 ^A)	0,039
1,66	2,8 (3,00)	2,5 ^b (2,60)	0,106	0,5 (0,53 ^B)	0,8 (0,79 ^A)	0,023	2,3 (2,26)	1,8 ^c (1,88)	0,057	0,2 (0,23 ^B)	0,4 (0,44 ^A)	0,023
3,32	2,8 (2,92)	2,7 ^{ab} (2,70)	0,106	0,5 (0,45)	0,8 (0,80)	0,121	2,6 (2,41 ^A)	1,9 ^{bc} (1,97 ^B)	0,011	0,2 (0,19 ^B)	0,4 (0,42 ^A)	0,017
4,97	2,8 (2,75)	3,3 ^a (3,05)	0,053	0,5 (0,41 ^B)	0,9 (0,90 ^A)	0,008	2,3 (2,33)	2,4 ^{ab} (2,33)	0,698	0,2 (0,17 ^B)	0,4 (0,39 ^A)	0,012
6,63	3,2 (2,82)	3,2 ^a (3,20)	0,053	0,5 (0,49 ^B)	0,8 (0,76 ^A)	0,006	2,3 (2,37)	2,4 ^a (2,46)	0,518	0,2 (0,20 ^B)	0,3 (0,31 ^A)	0,017
*P	0,205	0,005		0,913	0,433		0,348	0,004		0,919	0,305	

Período antes (n=8) e após (n=6).

*Sobrescritos minúsculas diferem entre si na mesma coluna pelo Teste de Tukey (P<0,05); diferença dentro de Fase.

**Sobrescritos maiúsculas diferem na linha entre os momentos antes e após estresse por baixa temperatura, pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05); diferença entre Fases .

Médias (n=8) e medianas (n=6).

FIGURAS

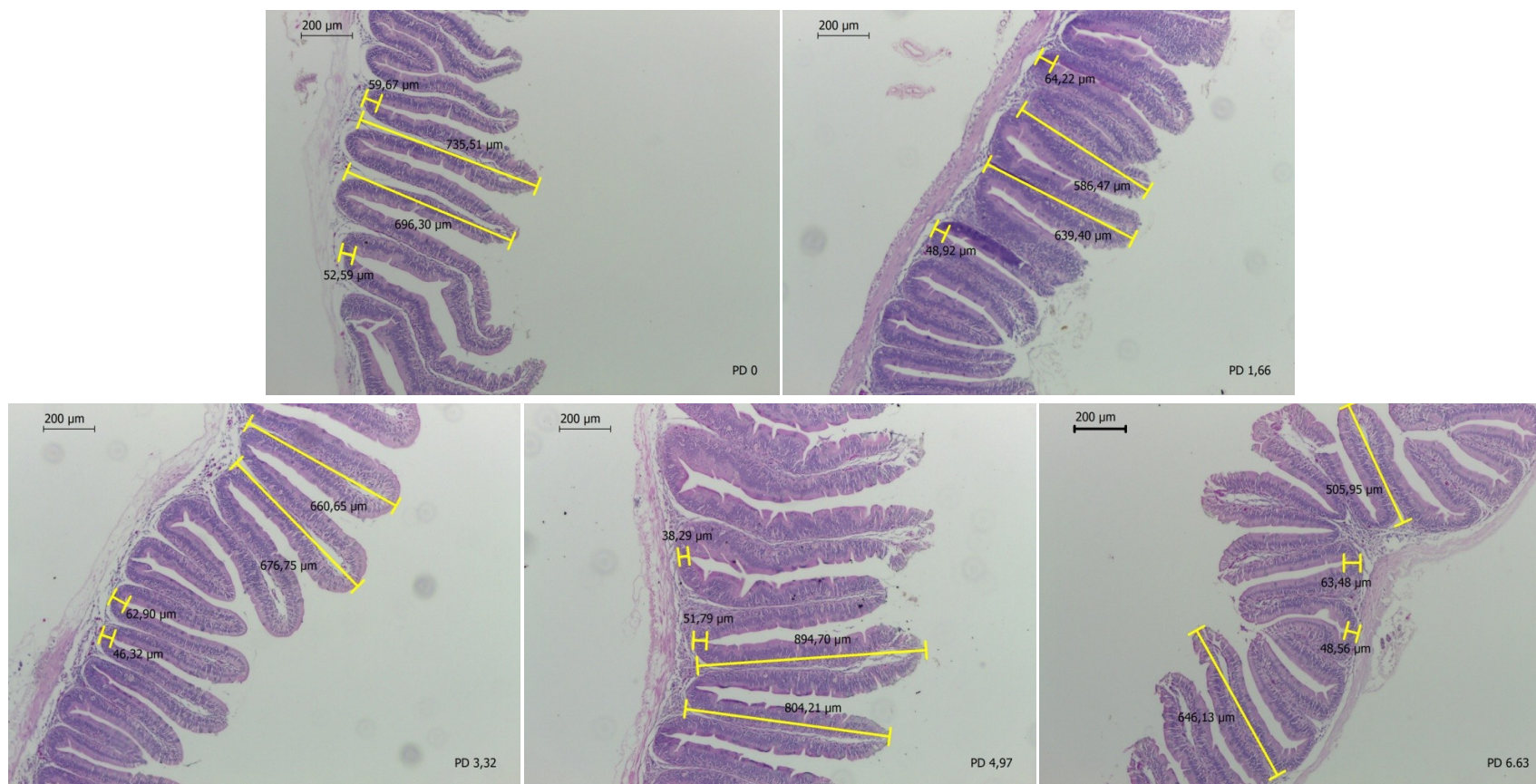


Figura 01. Cortes histológicos do epitélio intestinal, região proximal, de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com níveis de inclusão de plasma sanguíneo desidratado durante 60 dias.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

Implicações

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, é evidente que a inclusão de plasma sanguíneo desidratado na dieta de tilápias-do-Nilo traz benefícios para desempenho produtivo, manutenção da saúde intestinal, confere higidez e estímulo sobre o sistema imune dos animais. Porém, estudos complementares são necessários para que este seja empregado de modo amplo e seguro na produção aquícola, por exemplo, como integrante de dieta funcional em períodos produtivos específicos de maior estresse, a fim da redução de taxas de mortalidade, aparecimento de doenças e injúrias e/ou uso de produtos nocivos aos animais e ao meio ambiente.

Nota-se estímulo sobre o sistema imune de peixes, porém devido a escassa literatura, estudos envolvendo infecção bacteriana, análise de células de defesa, burst respiratório, ativação do sistema complemento, imunoglobulinas, capacidade antioxidante e análise de células caliciformes são necessários para melhor elucidar a ação imunomoduladora do plasma.

Além de estudos adicionais citados deve-se considerar a investigação para diferentes fases de criação, tal como a alevinagem, pois os benefícios do plasma sanguíneo desidratado talvez possam atenuar, por exemplo, a alta mortalidade para muitas espécies, diminuindo as perdas econômicas e maximizando a produção. Contudo, atenção quanto ao uso deve ser considerada, visto que atualmente não há estudo de viabilidade econômica, na produção como um todo, quanto da utilização do plasma sanguíneo desidratado para peixes e, também pelo fato do alto custo do ingrediente, o que pode torná-lo inviável a depender do nível de inclusão, duração de oferecimento ao animal na dieta, fase de criação e finalidade de uso.