

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**SIMONE ANTONELLO DE LIMA**

**NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS NA DIETA DE FÊMEAS DE TILÁPIA DO NILO  
EM REPRODUÇÃO**

**Marechal Cândido Rondon**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**SIMONE ANTONELLO DE LIMA**

**NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS NA DIETA DE FÊMEAS DE TILÁPIA DO NILO**  
**EM REPRODUÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em “Produção e Nutrição Animal”, para a obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Coorientadora: Prof. Dra. Sílvia Romão

**Marechal Cândido Rondon**

**2018**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Lima, Simone Antonello de  
Nucleotídeos purificados na dieta de fêmeas de tilápia do Nilo em reprodução / Simone Antonello de Lima; orientador(a), Robie Allan Bombardelli; coorientador(a), Sílvia Romão, 2018.  
59 f.

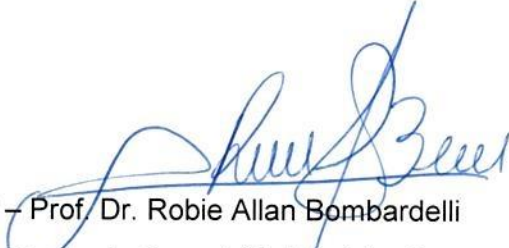
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Tilápia do Nilo. 2. Reprodução. 3. Estresse oxidativo. 4. Sistema imune. I. Bombardelli, Robie Allan. II. Romão, Sílvia. III. Título.

## SIMONE ANTONELLO DE LIMA

### Nucleotídeos purificados na dieta de fêmeas de tilápia do Nilo em reprodução

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Mestra em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Aqüicultura”, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



Orientador – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Toledo



Membro – Prof. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon



Membro – Dr. Eduardo Raele de Oliveira

NutriQuest-TechnoFeed

Marechal Cândido Rondon, 28 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Manoel e Helena, por sempre estarem ao meu lado, pela educação e valores repassados, pela força e torcida por mais esta conquista na minha vida. Obrigado por tudo, sem palavras para expressar minha gratidão e o quanto vos amo!

Ao meu esposo, Wilson Ricardo, pelo amor, dedicação, paciência, carinho e força em cada etapa desta caminhada, principalmente como “grande” pai que se tornou neste mesmo período, com seu imenso amor, cuidado e responsabilidade com nossa amada filha, Isadora.

Aos meus queridos sogro e sogra, Osni e Tecla, pelo incentivo e dedicação à nossa família.

A todos meus familiares, minhas irmãs, Solange, Maria Teresa, Maria Aparecida, cunhados e cunhadas, pelo carinho e torcida nesta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade de concluir o mestrado.

Ao professor Dr. Robie Allan Bombardelli, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade, e por ter acreditado em mim.

À professora Dr<sup>a</sup>. Sílvia Romão, pela coorientação, pela paciência e pelos conhecimentos e experiências repassados no desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais.

Ao Instituto de Pesquisa em Aquicultura Avançada da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Toledo, local de realização do experimento.

À NutriQuest-Technofeed pela colaboração e apoio na realização desta pesquisa e pela doação do Ascogen<sup>®</sup>.

À Piscicultura Sgarbi, por meio do Sr. Ari Sgarbi e da Sra. Ariane Sgarbi pela colaboração e apoio para a realização desta pesquisa e pela doação das matrizes e reprodutores de tilápia utilizados nos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, por meio dos processos CNPq n<sup>o</sup>311658/2016-4 e CNPq n<sup>o</sup> 429239/2016-5.

Ao secretário do Programa de Pós Graduação, Paulo Henrique Morsh, pela dedicação e respeito no auxílio acadêmico.

À equipe do Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis (Latraac), pela dedicação e colaboração na realização do experimento, pelo compromisso, responsabilidade e amizade.

À Marli Terezinha Dalmolin Kock e família, durante a realização das análises laboratoriais em Laranjeiras do Sul, pela acolhida e hospitalidade, pela amizade, confiança e pelos momentos de descontração.

E a todos aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

*“Não deixe que as circunstâncias te transformem, seja você  
o que transforma as circunstâncias.”*

(Jackie Chan-Ator)

## NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS NA DIETA DE FÊMEAS DE TILÁPIA DO NILO EM REPRODUÇÃO

**Resumo** – Neste trabalho, objetivou-se avaliar o crescimento e o desempenho reprodutivo de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados, considerando seu efeito sobre o sistema imune e o estresse oxidativo. Neste experimento foram utilizadas 420 fêmeas ( $286\text{g}\pm 7,15$ ) e 140 machos ( $536\text{g}\pm 13,4$ ) de tilápia do Nilo da linhagem GIFT em fase reprodutiva, alojadas separadamente em “hapas” instalados em viveiro escavado. Os reprodutores e as matrizes foram alimentados com rações contendo 280g de proteína digestível (PD) e 11,72 MJ de energia digestível (ED) por kg de ração e cinco níveis de inclusão de nucleotídeos purificados (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10g/kg de ração). Machos e fêmeas foram submetidos ao manejo reprodutivo em “hapas”, permanecendo 12 dias separados e 5 dias em acasalamento. Ao término do acasalamento, os ovos foram coletados e incubados. Esse procedimento foi repetido ao longo de cinco meses. Os animais alimentados com rações contendo 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram ( $p<0,05$ ) maior ganho em peso, menor conversão alimentar (ração:peso corporal) e maior conversão alimentar em ovos produzidos (ração:nº ovos). Esses animais também apresentaram ( $p<0,05$ ) menor fecundidade relativa e menor percentual de fêmeas desovantes. As concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina diminuíram ( $p<0,05$ ), enquanto que os teores de glicogênio hepático e gonadal aumentaram ( $p<0,05$ ) nos peixes alimentados com rações contendo 5,0 e 7,5g/kg de nucleotídeos. As concentrações de hemoglobina e albumina plasmática aumentaram ( $p<0,05$ ) de forma diretamente proporcional à inclusão dos nucleotídeos. Por outro lado, as concentrações de triglicerídeos plasmáticos diminuíram ( $p<0,05$ ) em animais alimentados com 7,5g/kg. A atividade de catalase foi menor ( $p<0,05$ ) nas gônadas de animais alimentados 5,0g/kg de nucleotídeos, enquanto que a peroxidação lipídica foi maior ( $p<0,05$ ). As concentrações da superóxido dismutase também aumentaram ( $p<0,05$ ) no fígado dos animais tratados com 5,0, 7,5g/kg e 10g/kg de nucleotídeos. O maior nível de inclusão de nucleotídeos promoveu o aumento ( $p<0,05$ ) da concentração da glutathione transferase no fígado e diminuiu ( $p<0,05$ ) a concentração de nitrito/nitrato no baço. Finalmente, as rações não influenciaram na morfologia do tecido hepático e na altura das vilosidades intestinais, mas os animais alimentados com 10g/kg de nucleotídeos apresentaram gônadas com a maior ( $p<0,05$ ) quantidade de ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento. A adição de nucleotídeos na dieta



das tilápias do Nilo não inibiu a vitelogênese. As baixas fecundidades ocorreram devido ao reduzido período de acasalamento, pois os ovários apresentavam grandes quantidades de ovócitos vitelogênicos. A suplementação dietética de nucleotídeos promoveu ganhos no crescimento, melhoria na conversão alimentar e melhorias na saúde dos peixes. Mesmo assim, atenção deve ser dispensada para suplementação dietética em níveis acima de 7,5g/kg, pois pode causar a médio e longo prazo alterações hepáticas e no sistema imune.

**Palavras-chave:** fecundidade, glutathione, ovário, superóxido dismutase, vitelogênese.

## **PURIFIED NUCLEOTIDES IN THE DIET OF NILE TILAPIA FEMALES IN REPRODUCTION**

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the growth and reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) females fed with diets containing purified nucleotides, considering its effect on the immune system and oxidative stress. In this experiment, 420 females ( $286\text{g} \pm 7.15$ ) and 140 males ( $536\text{g} \pm 13.4$ ) of Nile tilapia of the GIFT line were used in the reproductive phase, housed separately in hapas installed in an excavated nursery. Breeders and matrices were fed diets containing 280g of digestible protein (PD) and 11.72 MJ of digestible energy (ED) per kg of feed and five levels of inclusion of purified nucleotides (0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10g/kg of feed). Males and females were submitted to reproductive management in "hapas", remaining 12 days apart and 5 days in mating. At the end of the mating the eggs were collected and incubated. This procedure was repeated over five months. The animals fed rations containing 7.5 and 10g/kg of nucleotides presented higher weight gain, lower feed conversion (feed:body weight) and higher feed conversion in eggs (feed:no. eggs). These animals also presented ( $p < 0.05$ ) lower relative fecundity and lower percentage of spawning females. Plasma concentrations of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase decreased ( $p < 0.05$ ), whereas hepatic and gonadal glycogen levels increased ( $p < 0.05$ ) in fish fed diets containing 5.0 and 7.5g/kg of nucleotides. Hemoglobin and plasma albumin concentrations increased ( $p < 0.05$ ) in a manner directly proportional to the inclusion of nucleotides. On the other hand, plasma triglyceride concentrations decreased ( $p < 0.05$ ) in animals fed 7.5g/kg. The catalase activity was lower ( $p < 0.05$ ) in the gonads of animals fed with 5.0g/kg of nucleotides, whereas lipid peroxidation was higher ( $p < 0.05$ ). Concentrations of superoxide dismutase also increased ( $p < 0.05$ ) in the liver of animals treated with 5.0, 7.5g/kg and 10g/kg of nucleotides. The higher level of inclusion of nucleotides promoted the increase ( $p < 0.05$ ) of glutathione transferase concentration in the liver and decreased ( $p < 0.05$ ) the concentration of nitrite/nitrate in the spleen. Finally, feeds did not influence the morphology of hepatic tissue and the height of intestinal villi, but animals fed 10g/kg of nucleotides had gonads with the highest ( $p < 0.05$ ) quantity of developing vitellogenic oocytes. The addition of nucleotides to the diet of Nile tilapia did not inhibit vitellogenesis. The low fecundities occurred due to the reduced mating period, since the ovaries presented large numbers of vitellogenic oocytes. Dietary supplementation of nucleotides promoted gains in growth, improvement in feed conversion and improvements in

fish health. Even so, attention should be given to dietary supplementation at levels above 7.5g/kg, as they may cause liver and immune system disorders in the medium and long term.

**Key-words:** fecundity, glutathione, ovary, superoxide dismutase, vitellogenesis.

## SUMÁRIO

1 ABORDAGEM GERAL.....	12
2 Revisão .....	14
2.1 Efeitos dos nucleotídeos na dieta de peixes .....	14
2.1.1 Reprodução .....	15
2.1.2 Sistema imune.....	16
2.1.3 Saúde intestinal.....	17
2.1.4 Estresse oxidativo .....	18
REFERÊNCIAS.....	20
3 NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS NA DIETA DE FÊMEAS DE TILÁPIA DO NILO EM REPRODUÇÃO .....	25
3.1 Introdução.....	29
3.2 Material e métodos .....	30
3.3 Resultados .....	38
3.4 Discussão.....	47
3.5 Conclusões .....	52
REFERÊNCIAS .....	53

## 1 ABORDAGEM GERAL

A produção mundial de tilápia do Nilo vem aumentando gradualmente sob uma taxa de aproximadamente 6% ao ano, obtendo-se em 2018 um total de 4,5 milhões de toneladas (FAO, 2018). Entre as espécies de água doce, a tilápia do Nilo é a segunda espécie mais cultivada mundialmente, sendo superada apenas pelas carpas.

A tilápia é a mais importante espécie de peixe cultivada no Brasil, sendo produzida em praticamente todos os estados do país representando 51,7% da piscicultura brasileira. De acordo com o levantamento realizado pela PeixeBR (2018), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia com uma produção de 357.639 toneladas em 2017.

A espécie *Oreochromis niloticus* se destaca das demais principalmente pela sua capacidade de crescimento em situações ambientais adversas, como variações de temperatura, pH e oxigenação da água (EL-SAYED, 2006). A intensificação na produção de tilápias aumenta a demanda por produção de ovos, larvas e alevinos, sejam para a produção de carne, reposição ou ampliação do lote de reprodutores.

Uma característica reprodutiva das fêmeas de tilápia do gênero *Oreochromis* é o cuidado parental, em que incubam os ovos e protegem as larvas no interior de sua boca. Além disso, produzem um número relativamente baixo de ovos em cada desova. Esse aspecto negativo na produção em massa de larvas de tilápia é ainda mais acentuado devido ao baixo grau de sincronia na desova e, com o tempo, uma conseqüente queda na produção de ovos (NG & WANG, 2011).

A tilápia do Nilo possui, naturalmente, um ciclo reprodutivo que tem duração de aproximadamente 28 dias, sendo este considerado muito curto uma vez que envolve as atividades de corte, ovulação, desova, incubação oral dos ovos, cuidado das larvas eclodidas e desenvolvimento ovariano para a próxima ovulação (MACINTOSH & LITTLE, 1995).

Com a intensificação da produção, o período reprodutivo da tilápia do Nilo pode ser ainda mais reduzido em função do sistema de reprodução em *hapas* e manejo de coleta de ovos na boca para posterior incubação artificial (MACINTOSH & LITTLE, 1995), promovendo a sincronização e o aumento da frequência das desovas.

As atividades rotineiras que o sistema de criação exige, no entanto, ocasionam estresse e, conseqüentemente, risco ao desempenho dos peixes (SMALL, 2004; LIMA et al., 2006). A recrudescência do ovário é muito rápida, exigindo do organismo elevadas taxas metabólicas

para suportar a rápida formação do ovócito, garantindo a produção de ovos e larvas de qualidade e bom desempenho produtivo (OLIVEIRA, 2012).

A resposta ao estresse resulta em mudanças nas respostas fisiológicas, incluindo mudanças no status osmótico, capacidade imunológica, mudanças nos estoques de energia, biossíntese de energia e eficiência de uso. Particularmente, este último também leva a uma capacidade reprodutiva alterada, considerando que a fisiologia da maturação e desova esteja estreitamente associada à fisiologia do estresse em peixes, o que pode ameaçar a qualidade e quantidade de gametas produzidos (SCHRECK, 2010).

A nutrição dos reprodutores é reconhecida como um dos principais fatores que podem influenciar o desempenho de desova e a produção de larvas de tilápia (BHUJEL et al., 2001; EL-SAYED, 2006), por isso o desenvolvimento de alimentos de qualidade em termos de nutrientes para a tilápia é pertinente e crucial a fim de otimizar os resultados reprodutivos (EL-SAYED & KAWANNA, 2008; SCHRECK, 2010; NG & WANG, 2011).

Com o objetivo de melhorar a produtividade, muitos ingredientes têm sido estudados como aditivos na dieta de peixes para a melhoria da resposta ao estresse e do sistema imune. Dentre eles podemos citar os nucleotídeos, que são compostos bioquímicos de baixo peso molecular e desempenham diversas funções fisiológicas e bioquímicas essenciais para a célula, como a construção de unidades monoméricas de ácidos nucléicos, modulação do metabolismo energético, vias biossintéticas, reguladores biológicos e componentes de coenzima (LI & GATLIN III, 2006).

A suplementação de nucleotídeos na dieta de peixes pode melhorar a qualidade larval via fortificação dos reprodutores, alterar a estrutura intestinal, aumentar a tolerância ao estresse, bem como modular respostas imunes inatas e adaptativas (LI & GATLIN III, 2006; FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2009; RINGO et al., 2012). Devido ao seu efeito na melhoria das condições fisiológicas e morfológicas, os nucleotídeos dietéticos podem aumentar a assimilação e utilização dos outros nutrientes essenciais para a vitelogenese e o desempenho reprodutivo (ARSHADI et al., 2018).

Durante períodos de grande estresse, como a reprodução, a suplementação de nucleotídeos na dieta supre a demanda de nucleotídeos disponíveis para a proliferação celular, e ajuda a combater os efeitos imunossupressores do estresse (LOW et al., 2003). Portanto, os nucleotídeos se apresentam como potenciais suplementos na alimentação de peixes.

## 2 Revisão

### 2.1 Efeitos dos nucleotídeos na dieta de peixes

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada purina ou pirimidina, um açúcar ribose ou desoxirribose e um ou mais grupos fosfato. As principais bases de purina incluem: adenina, guanina, hipoxantina e xantina enquanto que as de pirimidina incluem: uracila, timina e citosina (NELSON, 2014).

Purinas e pirimidinas são sintetizadas a partir da “*via de novo*” ou obtidas a partir de vias de salvamento. Anéis de purina são sintetizados no citosol de células de mamíferos a partir de glicina, aspartato, glutamina, derivados de tetra-hidrofolato de CO<sub>2</sub> e com uma entrada de energia considerável, enquanto pirimidinas são sintetizadas a partir de aspartato, glutamina e CO<sub>2</sub> no citosol e mitocôndria de células de mamíferos (NELSON, 2014). Presumivelmente, essas vias são também operativas em peixes (BERTO, 2013).

Embora a maioria dos tecidos possa sintetizar nucleotídeos a partir da “*via de novo*”, outras células, como as células imunes, não possuem essa capacidade e dependem de nucleotídeos pré-formados. Os nucleotídeos da dieta podem poupar o custo da síntese de nucleotídeos e otimizar a função de células que se dividem rapidamente, como os linfócitos, que, ao serem ativados, provocam um rápido aumento na síntese de nucleotídeos que são necessários primeiramente para o aumento do metabolismo energético e, posteriormente, como precursores para a síntese de ácidos nucleicos (LOW et al., 2003).

Partindo-se do princípio de que os animais podem sintetizar quantidades adequadas de nucleotídeos necessários para o crescimento e desenvolvimento normal, estes não são considerados nutrientes essenciais. Entretanto, alguns tecidos como a mucosa intestinal, a medula óssea, e as células hematopoiéticas, do sistema imune e cerebrais apresentam capacidade limitada de síntese *de novo* de nucleotídeos, dependendo fundamentalmente dos nucleotídeos dietéticos (CÓRDOBA et al., 2008). Além disso, as células envolvidas na resposta imune não sintetizam nucleotídeos, sendo provável que, assim como há maior exigência de outros macronutrientes sob condições de estresse, os requisitos de nucleotídeos também sejam maiores (HUU, 2016).

Os nucleotídeos dietéticos também podem modular o metabolismo de nucleotídeos no fígado, o qual é considerado o órgão mais importante para o armazenamento e transporte de

nucleótídeos para atender às necessidades fisiológicas do organismo (LI & GATLIN III, 2006).

Os nucleotídeos desempenham diversas funções importantes nas células e sua utilização como suplemento em dietas para alimentação animal vem sendo discutida há muito tempo, pois sabe-se que desempenham funções fisiológicas e bioquímicas, que incluem codificação da informação gênica, modulação do metabolismo energético, ação como componentes de coenzimas entre outros (LI & GATLIN III, 2006). Portanto, os nucleotídeos se apresentam como potenciais suplementos para alimentação animal, incluindo os peixes.

### 2.1.1 Reprodução

Em algumas espécies de peixe ocorre a transferência da imunidade materna para a prole através do ovo, a qual é fundamental para permitir o desenvolvimento extracorpóreo do embrião e da larva (KREUTZ et al., 2017). Em peixes como as tilápias, que protegem os ovos na cavidade oral, os fatores de imunidade materna são transferidos para os ovos através do muco bucal, mas isso depende dos componentes do sistema imune inato (ZHANG et al. 2013).

Por isso a nutrição das fêmeas em atividade reprodutiva desempenha um papel crucial no fornecimento dos nutrientes essenciais e necessários para o desenvolvimento gonadal e o desempenho de seus ovos e larvas (LI & GATLIN III, 2006). Especialmente na criação da tilápia, o suprimento de alevinos de alta qualidade pode se tornar um grande fator limitante devido à sua baixa fecundidade (MACINTOSH & LITTLE, 1995).

Pesquisas têm mostrado que os nucleotídeos podem afetar a qualidade da desova de peixes e camarões. Dietas enriquecidas com nucleotídeos proporcionaram maior fecundidade em *Hippoglossus hippoglossus* e *Melanogrammus aeglefinus* (GONZÁLEZ-VECINO, 2005 apud FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2009), e também melhoraram o desempenho reprodutivo em fêmeas de camarões do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (ARSHADI et al., 2018). Além disso, a suplementação de nucleotídeos na dieta de fêmeas de camarões do pacífico (*Litopenaeus vannamei*) teve um efeito positivo sobre o estado nutricional aumentando os níveis de glicose e proteínas totais no plasma (ARSHADI et al., 2018).

A adição de nucleotídeos na dieta de arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) promoveu uma melhora na sobrevivência das larvas sugerindo-se que tal fato pode ter sido causado por



um melhor desenvolvimento do intestino dessas larvas e, como consequência, melhor utilização da primeira alimentação exógena (GONZÁLEZ-VECINO et al., 2004 apud FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2011).

### 2.1.2 Sistema imune

A suplementação de nucleotídeo na dieta melhora a imunidade celular e humoral, (CARVER & WALQUER, 1995), é importante no desenvolvimento de tecido com rápido *turnover* celular, quando a capacidade de síntese endógena não é suficiente para responder à demanda, como em períodos de rápido crescimento e após agressões ao organismo, tais como doenças ou traumas (BERTO, 2003). Assim, quando suplementados na dieta, os nucleotídeos podem proporcionar efeitos benéficos sobre o sistema imune, crescimento e regeneração celular, além de promover redução de gasto energético para a produção de nucleotídeos pelo próprio organismo. (ORTEGA et al., 1995).

Burrels et al. (2001) corrobora a informação acima e indica ainda o uso de dietas suplementadas com nucleotídeos antes da realização de algum manejo na aquicultura, já que em momentos de estresse os animais tendem à maior dependência de fornecimento exógeno desses nutrientes.

Estudos realizados por Sakai et al. (2001) mostraram que os nucleotídeos exógenos podem aumentar a atividade da lisozima, bem como a produção de ânion superóxido de fagócitos na região cranial do rim de carpa comum (*Cyprinus carpio* L.).

A lisozima possui propriedades antivirais, antibacterianas e antiinflamatórias, por isso sua atividade é um parâmetro imunológico importante (MAGNADOTTIR, 2006) uma vez que o aumento desta é considerado mecanismo de proteção natural nos peixes. A lisozima pode ser encontrada em maior concentração no rim, podendo ser detectada em outros tecidos como o baço (CHAGAS, 2010).

O óxido nítrico (NO) é um radical antimicrobiano produzido por macrófagos (NATHAN et al., 1991), o qual têm importante papel em uma variedade de processos biológicos como neurotransmissão, morte de células tumorais, imunidade e processos inflamatórios (MOSHAGE et al., 1995) bem como protege a função cardiovascular (ASL et al., 2008). Nitrito e nitrato são os produtos finais estáveis circulatórios de NO, e sua mensuração tem sido sugerida para a avaliação da disfunção endotelial (ASL et al., 2008).

Tahmasebi-Kohyani et al. (2011) verificaram que a suplementação dietética de nucleotídeos a partir de 0,5g/kg aumenta a resposta imune humoral, mensurada pela atividade de lisozima, de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e os melhores resultados são encontrados em peixes alimentados com rações contendo 2,0g/kg. Com o mesmo nível de suplementação, Samir et al. (2017) também observaram um aumento no efeito estimulador sobre os parâmetros imunológicos e a resistência da tilápia do Nilo desafiadas com *Aeromonas hydrophila*.

A inclusão de nucleotídeos na dieta melhorou alguns componentes da resposta imune inespecífica de *Sciaenops ocellatus* (CHENG et al., 2011) em que a produção de ânion superóxido no rim foi aumentada nos peixes alimentados com dietas contendo 10,0g de nucleotídeo/kg. A tolerância ao estresse e elevação das respostas imunes não específicas com a suplementação com nucleotídeos na dieta também foram observadas no robalo listrado híbrido (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) (LI et al., 2004), no camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) (LI et al. 2007b), no pargo (*Pagrus major*) (HOSSAIN et al., 2016), na garoupa (*Epinephelus malabaricus*) (Lin et al., 2009) e linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) (SONG et al., 2012), tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) com 0,6 e 0,8% de inclusão de nucleotídeo na dieta (XU et al., 2015).

No entanto, Li et al. (2007a) estudando o peixe *Sciaenops ocellatus* alimentado com dieta com mistura de nucleotídeos, observaram que não houve alteração na resposta imune e resistência a doenças, sugerindo a necessidade da realização de mais estudos que possam esclarecer melhor o papel dos nucleotídeos no crescimento e respostas imunes em peixes.

As análises hematológicas também são utilizadas na avaliação do estado de saúde de peixes. Podem ser utilizados como parâmetros hematológicos o hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (ERI) na determinação da qualidade do alimento (RANZANI-PAIVA et al., 2013). As constantes corpusculares, como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), podem fornecer informação complementar na caracterização de anemias (CHAGAS, 2010).

### 2.1.3 Saúde intestinal

No intestino médio, encontram-se as dobras e cristas do epitélio mucoso que aparecem em grande quantidade e variedade e que servem para aumentar a superfície de secreção e absorção de nutrientes. A superfície da mucosa intestinal dos peixes tem numerosas

projeções, denominadas vilos, que são evaginações da mucosa (epitélio e lâmina própria) que se projetam na luz do intestino com o objetivo de aumentar a área de superfície para a digestão e absorção intestinal (LIMA et al., 2014).

O desenvolvimento da mucosa intestinal ocorre pelo processo de renovação celular (proliferação e diferenciação) com mitoses ou por perda de células (extrusão) que ocorrem nas criptas. Desta forma, ocorre aumento da altura e densidade dos vilos, que corresponde a um aumento no número de suas células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas) (GRACIANO, 2012).

Nucleotídeos dietéticos têm demonstrado ser benéficos para a saúde intestinal de peixes. Burrells et al. (2001) detectaram que, para o salmão do atlântico, nucleotídeos dietéticos aumentaram a altura média de dobra proximal, médio e distal do intestino bem como a área de superfície total do intestino em relação aos peixes alimentados com a dieta controle. Borda et al. (2003) relataram observações semelhantes em pargo juvenil.

A suplementação de nucleotídeos na dieta de *Sciaenops ocellatus* também aumentou a altura da dobra no intestino proximal e a altura do enterócito no ceco pilórico, com maior altura de microvilos (CHENG et al., 2011).

Como Li&Gatlin III (2006) demonstraram, o nucleotídeo como componente dietético tem um impacto benéfico no trato gastrointestinal, melhorando as influências fisiológicas, morfológicas e microbiológicas que, por sua vez, podem aumentar a assimilação e utilização dos outros nutrientes, essenciais para a vitelogênese e o desempenho reprodutivo. Além disso, durante períodos de estresse extraordinário, como a reprodução, nucleotídeos adicionais devem estar prontamente disponíveis para a absorção intestinal e, conseqüentemente, para a proliferação celular (ARSHADI et al., 2018).

#### 2.1.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são intermediários dos processos de redução parcial do O<sub>2</sub> durante a respiração mitocondrial e outros processos pró-oxidantes. Em níveis baixos, as EROs desempenham funções fisiológicas importantes, como a ativação e modulação das vias de sinalização e dos fatores de transição, que são sensíveis a reações de oxidação-redução (LUSHCHAK, 2011).

Quando o indivíduo não consegue manter as concentrações adequadas de EROs, estes podem provocar efeitos deletérios, pois em elevadas quantidades podem causar danos às

moléculas biológicas e aos componentes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios. A alteração na função destas macromoléculas nas células leva ao estado conhecido como estresse oxidativo (EO) (LUSHCHAK, 2011). Portanto, as intervenções que favorecem à extinção e/ou depuração de EROs devem atenuar o estresse oxidativo, suavizando assim o subsequente dano toxicológico (ABDEL-DAIM et al., 2015). O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da lipoperoxidação (LPO), sendo um potencial biomarcador de dano oxidativo (ZHAO et al, 2014).

Um dos sistemas de defesa antioxidante consiste no sistema enzimático, representado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST) (SACCOL et al., 2017).

Os neutrófilos e macrófagos atacam os patógenos intra e extracelularmente, produzindo espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERN e ERO) como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (CHAGAS, 2010). A enzima superóxido dismutase transforma o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que possui ação bactericida (YAMAMOTO, 2015).

A catalase é a principal enzima responsável pela desintoxicação celular, promovendo a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  mais  $O_2$  (GARCIA, 2016). Já a glutatona S-transferase é uma enzima que promove a conjugação da glutatona (GSH) com uma grande variedade de compostos eletrofílicos, resultando na formação de substâncias que são facilmente excretadas do corpo (VASCONCELOS et al. 2007). A GST também pode atuar como enzima antioxidante, uma vez que sua isoforma alfa possui atividade peroxidase (GARCIA, 2016).

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M., ABDELKHALEK, N. K., HASSAN, A.M. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, p.146–152, 2015.
- ARSHADI, A.; YAVARI, V.; OUJIFARD, A.; et al. Dietary nucleotide mixture effects on reproductive and performance, ovary fatty acid profile and biochemical parameters of female Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v.24, p.515-523, 2018.
- ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F.; Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clinical Biochemistry*, v.41, p.1342-1347, 2008.
- BERTO, R. S. **Extrato de leveduras no crescimento, utilização dos nutrientes e respostas hemato-imunológicas em tilápia-do-Nilo**. 2013. 59f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BHUJEL, R. C.; YAKUPITIYAGE, A.; TURNER, W. A.; et al. Selection of a commercial feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish breeding in a hapa-in-pond system. **Aquaculture**, v.194, p.303–314, 2001.
- BORDA, E., MARTINEZ-PUIG, D., CORDOBA, X.A balanced nucleotide supply makes sense. **Feed Mix**, v.11, p.24– 26, 2003.
- BURRELLS, C.; WILLIAMS, P. D.; SOUTHGATE, P. J.; et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v.199, p.171–184, 2001.
- CARVER, J. D., WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **Nutritional Biochemistry**. v.6, p.58–72, 1995.
- CHAGAS, E. C.  **$\beta$ -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas**. 2010. 141f. Tese (doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CHENG, Z.; BUENTELLO, A. ; GATLIN III, D. Dietary nucleotide influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.30, p.143-147, 2011.
- CÓRDOBA, X.; BORDA, E.; MARTÍNEZ-PUIG, D. et al. The role of nucleotides in piglet nutrition. **Pig Progress**. v.24, n.1, 2008.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. London: AMA DataSet Ltda. 2006. 277p.

- EL-SAYED, A.M.; KAWANNA, M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. **Aquaculture**. v.280, p.179–184, 2008.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome.2018. 228 p.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M. S. Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. In: ESTÉVEZ, M A. C. **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009. p.339-400.
- GARCIA, D. P. **Metabolismo do malondialdeído em peixes: implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática**. 2016, 93f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- GRACIANO, T. S. **Aminogut® em dietas para larvas e alevinos de tilápia do Nilo**. 2012. 80f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- HOSSAIN, M. S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; et al. M. Dietary nucleotide administration influences growth, immune responses and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture**, v.455, p.41–49, 2016.
- HUU, H. Overview of the application of nucleotide in aquaculture. **Journal of Coastal LifeMedicine**, v.4, n.10, p.816-823, 2016
- KREUTZ, L. C.; PIETRETTI, D.; DOMENICO, J. D. Imunoestimulantes para uso na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. HEINZMANN, B. M.; CUNHA, A. C. **Farmacologia aplicada a aquicultura**. Santa Maria: UFSM, 2017. p. 281- 289.
- LI, P., GATLIN III, D.M. Nucleotide nutrition in fish: current status and future applications. **Aquaculture**, v.251, p.141–152, 2006.
- LI, P., GATLIN III, D. M.; NEILL, W. H. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.281–286, 2007a.
- LI, P.; LAWRENCE, A. L., CASTILLE, F. L.; et al. Preliminary evaluation of a purified nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v.38, p.887–890, 2007b.
- LI, P., LEWIS, D. H.; GATLIN, D. M. III. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* · *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish Shellfish Immunology**, v.16, p.561–569, 2004.

- LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S.Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture Nutrition*, v.15,p.117-122, 2009.
- LIMA, F. W. **Colonização e morfometria intestinal de lambaris-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* alimentados com dietas contendo levedura *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico.** 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.
- LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117. 2006.
- LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELLS, C.; et al. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v.221, p.23–40, 2003.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.13–30, 2011.
- MACINTOSH, D.J., LITTLE, D.C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: BROMAGE, N.R., ROBERTS, R.J. **Broodstock management and egg and lerval quality**. London : Blackwell Science, 1995. p.277-320.
- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity o fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**. London, v.20, n.2, p.137-151, 2006.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JANSEN, P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v.41, p.892-6, 1995.
- NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthases in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v.3, p.65-70, 1991.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.281-312.
- NG, W.; WANG Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture**, v.314, p.122–131, 2011.
- OLIVEIRA, M. M. **Dietas para reprodutores de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2012. 95f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ORTEGA, M. A.; NUÑEZ, M.C.; GIL, A.;et al. Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1413–1418, 1995.

- PeixeBR - Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Peixe Br da Piscicultura. São Paulo. 2018.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª Ed., Maringá: Edum, 2013.
- RINGØ, E.; OLSEN, R. E.; VECINO, J. L. G.; et al. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. **Journal of Marine Science: Research & Development**. v.2, n.1, p.1-22, 2012.
- SACCOL, E. M. H.; LLESUY, S. F.; PAVANATO, M. A. Antioxidantes na aquicultura. In: Farmacologia aplicada a aquicultura. Santa Maria, RS: Ed. UFSM, 2017. p.569-591.
- SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; et al. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**. v.24, p.433–438, 2001.
- SAMIR, S.; EL-NABY, A. S. A.; KHATTABY, A. A.; et al. Improvement of growth rate, feed utilization, body composition and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by supplementation of nucleotide in diets. In: 1st International Conference (Central Laboratory For Aquaculture Research In Cooperation With Worldfish), Cairo. 2017, p.62-88.
- SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**. v.165, p.549–556. 2010
- SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v.197, p.3-24, 2001.
- SMALL, B. C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.589-596, 2004.
- SONG, J. W.; LIM, S. J.; LEE, K. J. Effects of dietary supplementation of inosine monophosphate on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish Shellfish Immunol**, v.33, p.1050–1054, 2012.
- TAHMASEBI-KOHYANI, A.; KEYVANSHOKOOH, S.; NEMATOLLAHI, A.; et al. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Fish shellfish Immunology**, v.30, p.189-93, 2011.
- XU, L.; RAN, C.; HE, S.; et al. Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ x *Oreochromis aureus* ♂. **Animal Nutrition**, v.1, p.244–251, 2015.
- YAMAMOTO, F. Y. Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus brasiliensis* (Curvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador. 2015. 73f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.



ZHANG, S.; WANG, Z.; WANG, H. Maternal immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.39, p.72–78, 2013.

ZHAO, J.; FENG, L.; LIU, Y.; et al. Effect of dietary isoleucine on the immunity, antioxidant status, tight junctions and microflora in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish Shellfish Immunol**, v.41, p.663–73, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

### 3 NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS NA DIETA DE FÊMEAS DE TILÁPIA DO NILO EM REPRODUÇÃO

**Resumo** – Neste trabalho, objetivou-se avaliar o crescimento e o desempenho reprodutivo de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados, considerando seu efeito sobre o sistema imune e o estresse oxidativo. Neste experimento foram utilizadas 420 fêmeas ( $286\text{g}\pm 7,15$ ) e 140 machos ( $536\text{g}\pm 13,4$ ) de tilápias do Nilo da linhagem GIFT em fase reprodutiva, alojados separadamente em “hapas” instalados em viveiro escavado. Os reprodutores e as matrizes foram alimentados com rações contendo 280g de proteína digestível (PD) e 11,72 MJ de energia digestível (ED) por kg de ração e cinco níveis de inclusão de nucleotídeos purificados (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10g/kg de ração). Machos e fêmeas foram submetidos ao manejo reprodutivo em “hapas”, permanecendo 12 dias separados e 5 dias em acasalamento. Ao término do acasalamento os ovos foram coletados e incubados. Esse procedimento foi repetido ao longo de cinco meses. Os animais alimentados com rações contendo 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram ( $p<0,05$ ) maior ganho em peso, menor conversão alimentar (ração:peso corporal) e maior conversão alimentar em ovos produzidos (ração:nº ovos). Esses animais também apresentaram ( $p<0,05$ ) menor fecundidade relativa e menor percentual de fêmeas desovantes. As concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina diminuíram ( $p<0,05$ ), enquanto que os teores de glicogênio hepático e gonadal aumentaram ( $p<0,05$ ) nos peixes alimentados com rações contendo 5,0 e 7,5g/kg de nucleotídeos. As concentrações de hemoglobina e albumina plasmática aumentaram ( $p<0,05$ ) de forma diretamente proporcional à inclusão dos nucleotídeos. Por outro lado, as concentrações de triglicerídeos plasmáticos diminuíram ( $p<0,05$ ) em animais alimentados com 7,5g/kg. A atividade de catalase foi menor ( $p<0,05$ ) nas gônadas de animais alimentados 5,0g/kg de nucleotídeos, enquanto que a peroxidação lipídica foi maior ( $p<0,05$ ). As concentrações da superóxido dismutase também aumentaram ( $p<0,05$ ) no fígado dos animais tratados com 5,0, 7,5g/kg e 10g/kg de nucleotídeos. O maior nível de inclusão de nucleotídeos promoveu o aumento ( $p<0,05$ ) da concentração da glutathione transferase no fígado e diminuiu ( $p<0,05$ ) a concentração de nitrito/nitrato no baço. Finalmente, as rações não influenciaram na morfologia do tecido hepático e na altura das vilosidades intestinais, mas os animais alimentados com 10g/kg de nucleotídeos apresentaram gônadas com a maior ( $p<0,05$ ) quantidade de ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento. A adição de nucleotídeos na dieta

das tilápias do Nilo não inibiu a vitelogênese. As baixas fecundidades ocorreram devido ao reduzido período de acasalamento, pois os ovários apresentavam grandes quantidades de ovócitos vitelogênicos. A suplementação dietética de nucleotídeos promoveu ganhos no crescimento, melhoria na conversão alimentar e melhorias na saúde dos peixes. Mesmo assim, atenção deve ser dispensada para suplementação dietética em níveis acima de 7,5g/kg, pois pode causar a médio e longo prazo alterações hepáticas e no sistema imune.

**Palavras-chave:** fecundidade, glutathione, ovário, superóxido dismutase, vitelogênese.

### 3 PURIFIED NUCLEOTIDES IN THE DIET OF NILE TILAPIA FEMALES IN REPRODUCTION

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the growth and reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) females fed with diets containing purified nucleotides, considering its effect on the immune system and oxidative stress. In this experiment, 420 females ( $286\text{g}\pm 7.15$ ) and 140 males ( $536\text{g}\pm 13.4$ ) of Nile tilapia of the GIFT line were used in the reproductive phase, housed separately in hapas installed in an excavated nursery. Breeders and matrices were fed diets containing 280g of digestible protein (PD) and 11.72 MJ of digestible energy (ED) per kg of feed and five levels of inclusion of purified nucleotides (0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10g/kg of feed). Males and females were submitted to reproductive management in "hapas", remaining 12 days apart and 5 days in mating. At the end of the mating the eggs were collected and incubated. This procedure was repeated over five months. The animals fed rations containing 7.5 and 10g/kg of nucleotides presented higher weight gain, lower feed conversion (feed: body weight) and higher feed conversion in eggs (feed: no. eggs). These animals also presented ( $p<0.05$ ) lower relative fecundity and lower percentage of spawning females. Plasma concentrations of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase decreased ( $p<0.05$ ), whereas hepatic and gonadal glycogen levels increased ( $p<0.05$ ) in fish fed diets containing 5.0 and 7.5g/kg of nucleotides. Hemoglobin and plasma albumin concentrations increased ( $p<0.05$ ) in a manner directly proportional to the inclusion of nucleotides. On the other hand, plasma triglyceride concentrations decreased ( $p<0.05$ ) in animals fed 7.5g/kg. The catalase activity was lower ( $p<0.05$ ) in the gonads of animals fed with 5.0g/kg of nucleotides, whereas lipid peroxidation was higher ( $p<0.05$ ). Concentrations of superoxide dismutase also increased ( $p<0.05$ ) in the liver of animals treated with 5.0, 7.5 and 10g/kg of nucleotides. The higher level of inclusion of nucleotides promoted the increase ( $p<0.05$ ) of glutathione transferase concentration in the liver and decreased ( $p<0.05$ ) the concentration of nitrite/nitrate in the spleen. Finally, feeds did not influence the morphology of hepatic tissue and the height of intestinal villi, but animals fed 10g/kg of nucleotides had gonads with the highest ( $p<0.05$ ) quantity of developing vitellogenic oocytes. The addition of nucleotides to the diet of Nile tilapia did not inhibit vitellogenesis. The low fecundities occurred due to the reduced mating period, since the ovaries presented large numbers of vitellogenic oocytes. Dietary supplementation of nucleotides promoted gains in growth, improvement in feed conversion and improvements in fish health. Even so, attention

should be given to dietary supplementation at levels above 7.5g/kg, as they may cause liver and immune system disorders in the medium and long term.

**Key-words:** fecundity, glutathione, ovary, superoxide dismutase, vitellogenesis.

### 3.1 Introdução

A tilápia do Nilo é a quarta espécie de peixe mais cultivada no mundo, e sua produção em 2018 um total de 4,5 milhões de toneladas (FAO, 2018), e o Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia com uma produção de 357.639 toneladas em 2017 (PEIXEBR, 2018). A espécie *Oreochromis niloticus* se destaca das demais principalmente pela sua capacidade de crescimento em situações ambientais adversas, como variações de temperatura, pH e oxigenação da água (EL-SAYED, 2006).

A intensificação na produção de tilápias aumenta a demanda por produção de ovos, larvas e alevinos, sejam para a produção de carne, reposição ou ampliação do lote de reprodutores. Para que seja atendida essa demanda, esforços têm sido dispensados no desenvolvimento de alimentos de qualidade em termos de nutrientes para a tilápia a fim de otimizar os resultado reprodutivos (EL-SAYED & KAWANNA, 2008; NG & WANG, 2011; SCHRECK, 2010).

As fêmeas de tilápia do gênero *Oreochromis*, exercem cuidado parental, incubando os ovos e protegendo as larvas no interior de sua boca. Com a intensificação da produção, o período reprodutivo da tilápia do Nilo pode ser reduzido em função do sistema de reprodução em *hapas* e manejo de coleta de ovos na boca para posterior incubação artificial (MACINTOSH & LITTLE, 1995).

No entanto, esse manejo ocasiona estresse, comprometendo o desempenho reprodutivo das fêmeas (LIMA et al., 2006; SMALL, 2004). A recrudescência do ovário é muito rápida exigindo do organismo elevadas taxas metabólicas para suportar a rápida formação do ovócito, garantindo a produção de ovos e larvas de qualidade e bom desempenho produtivo (OLIVEIRA, 2012).

A nutrição dos reprodutores é reconhecida como um dos principais fatores que podem influenciar o desempenho de desova e a produção de larvas de tilápia (BHUJEL et al., 2001; El-Sayed, 2006), por isso o desenvolvimento de alimentos de qualidade em termos de nutrientes para a tilápia é pertinente e crucial a fim de otimizar os resultado reprodutivos (EL-SAYED & KAWANNA, 2008; NG & WANG, 2011; SCHRECK, 2010).

Os nucleotídeos têm sido estudados como suplementos na dieta de peixes com o intuito de promover melhorias no desempenho reprodutivo, na modulação do sistema imune e no aumento da tolerância ao estresse. (LI & GATLIN III, 2006; FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2011; RINGØ et al., 2012). Durante períodos de grande estresse, como a reprodução, a

suplementação de nucleotídeos na dieta supre a demanda de nucleotídeos disponíveis para a proliferação celular, e ajuda a combater seus efeitos imunossupressores (LOW et al., 2003). Portanto, os nucleotídeos se apresentam como potenciais suplementos para alimentação animal, incluindo os peixes.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o crescimento e o desempenho reprodutivo de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados, considerando seu efeito sobre o sistema imune e o estresse oxidativo.

### 3.2 Material e métodos

#### *Animais, instalações e delineamento experimental.*

O experimento foi realizado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Campus de Toledo, totalizando um período de 150 dias (outubro de 2016 a fevereiro de 2017), atendendo às exigências do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/Unioeste).

Foram utilizadas 560 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT em fase reprodutiva, sendo 420 fêmeas ( $286g \pm 7,15$ ) e 140 machos ( $536g \pm 13,4$ ).

Fêmeas e machos foram alojados separadamente, em 40 “hapas” de malha 1mm, sendo 20 hapas de dimensões 3m x 2m para as fêmeas (21 fêmeas cada) e 20 “hapas” de 2m x 1m para os machos (7 machos cada). Os “hapas” foram instalados em viveiro escavado revestido em alvenaria e com o fundo de terra.

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por rações isoproteicas e isoenergéticas contendo 280g de proteína digestível (PD) e 11,72 MJ de energia digestível (ED) por kg de ração, com cinco níveis de inclusão de nucleotídeo (NT) na proporção de 0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10g/kg de ração.

#### *Rações experimentais, manejo alimentar e manejo reprodutivo*

As dietas experimentais foram formuladas com base no conhecimento prévio da composição nutricional dos ingredientes, de modo a conter 280g de proteína digestível (PD) e

11,72 MJ de energia digestível (ED) por kg de ração (Tabela 1). Os valores de proteína e energia digestíveis foram calculados de acordo com Boscolo et al. (2002), Meurer et al. (2012) e Meurer et al. (2003).

Tabela 1 – Composição percentual dos alimentos e conteúdo de nutrientes das rações experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de nucleotídeo, utilizadas na alimentação de matrizes e reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingredientes (g/kg)	Nucleotídeo (g/kg)				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Farelo de soja <sup>1</sup>	533,2	533,2	533,2	533,2	533,2
Milho <sup>1</sup>	286,9	286,9	286,9	286,9	286,9
Farinha de peixe <sup>2</sup>	73,1	73,1	73,1	73,1	73,1
Inerte <sup>3</sup>	51,6	49,1	46,6	44,1	41,6
Fosfato bicálcico	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5
Supl. Mineral e Vitamínico <sup>4</sup>	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Calcário	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
Sal comum	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Antioxidante <sup>5</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nucleotídeo <sup>6</sup>	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
<b>Nutrientes</b>					
Acido linoleico (g/kg)	09,6	09,6	09,6	09,6	09,6
Amido (g/kg)	210,0	210,0	210,0	210,0	210,0
Cálcio (g/kg)	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Cinzas (g/kg)	124,3	124,3	124,3	124,3	124,3
Energia bruta (MJ/kg)	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7
Energia digestível (MJ/kg)	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
Fibra bruta (g/kg)	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4
Fósforo total (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Gordura (g/kg)	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5
Lisina total (g/kg)	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8
Matéria seca (g/kg)	895,0	895,0	895,0	895,0	895,0
Met.+cistina total (g/kg)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Proteína digestível (g/kg)	280,0	280,0	280,0	280,0	280,0
Proteína bruta (g/kg)	313,0	313,0	313,0	313,0	313,0

<sup>1</sup>Valores de digestibilidade dos nutrientes determinados por Boscolo et al. (2002). <sup>2</sup>Valores de digestibilidade dos nutrientes determinados por Meurer et al. (2003). <sup>3</sup>Bentonita. <sup>4</sup>Suplemento vitamínico mineral, composição básica: ácido fólico: 200mg, ácido pantotênico: 4.000mg; Biotina: 40 mg; Cobre: 2.000mg; Ferro: 12.500mg; Iodo:200mg; Manganês: 7.500mg; Niacina: 5.000mg; Selênio:70mg; Vitamina A: 1.000.000UI; Vitamina B1:



1.900mg; Vitamina B12: 3.500mg; Vitamina B2: 2.000mg; Vitamina B6: 2.400mg; Vitamina C: 50.000mg; Vitamina D3: 500.000UI; Vitamina E: 20.000UI; Vitamina K3: 500mg; Zinco:25.000mg. <sup>5</sup>BHT. <sup>6</sup>Ascogen®.

Para a elaboração das rações, os ingredientes foram triturados em moinho de martelo, utilizando-se peneira de 0,5mm (MEURER et al., 2005), misturados e em seguida as dietas foram extrusadas.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10:00 e 16:00h) (SIDDIQUI et al., 1998; EL-SAYED et al., 2005) com uma taxa de alimentação de 1% da biomassa por dia (BHUIJEL, 2000), corrigida a cada 17 dias. Nesse período, machos e fêmeas foram submetidos ao manejo reprodutivo, permanecendo isolados pelo período de 12 dias (adaptado de TACON et al., 1996; BOMBARDELLI et al., 2009). Após esse período os machos foram transferidos para os “hapas” das fêmeas para o acasalamento que teve a duração de cinco dias (adaptado de MACINTOSH & LITTLE, 1995; BOMBARDELLI et al., 2009).

Ao término do período de acasalamento, todas as fêmeas foram individualmente submetidas aos procedimentos de verificação da presença, coleta e incubação dos ovos, conforme a metodologia descrita por MacIntosh & Little (1995).

Durante a coleta dos ovos, foram mensurados o peso (balança Marte® AS2000;  $\pm 0,01$ g) e o comprimento individual (ictiômetro;  $\pm 0,1$ cm) das fêmeas e dos machos. Em seguida, os reprodutores foram novamente separados em seus respectivos “hapas”. Esse procedimento foi repetido durante todo o período experimental para condicionar as fêmeas ao manejo reprodutivo e garantir a guarda dos ovos na boca. Para a mensuração dos parâmetros reprodutivos e desempenho de prole, foi utilizada a média das três últimas coletas de ovos.

#### *Parâmetros reprodutivos das fêmeas*

Entre os meses de novembro e fevereiro, o volume total de ovos presentes na cavidade bucal de cada fêmea foi mensurado. Em seguida, amostras de 0,5mL dos ovos de cada fêmea desovante foram fixadas em solução de formalina a 4%, tamponada com carbonato de cálcio (adaptado de EL-SAYED et al., 2005). Os ovos das amostras fixadas foram submetidos à contagem e mensuração do peso (balança Shimadzu® AY220;  $\pm 0,0001$ g) conforme adaptação de Ballestrazzi et al. (2003).

Nesse período, foram avaliados os seguintes parâmetros: a) o percentual de fêmeas desovantes (fêmeas que apresentavam ovos na cavidade bucal), b) o peso médio das fêmeas desovantes, c) o número total de ovos por fêmea desovante, d) o número de ovos por grama de fêmea desovante e, e) número de ovos por grama de fêmeas acasaladas (total de fêmeas

considerando as desovantes e aquelas que não apresentavam ovos na cavidade bucal) (BOMBARDELLI et al., 2009).

#### *Incubação dos ovos e desempenho das proles*

Os ovos provenientes das fêmeas de cada unidade experimental foram incubados separadamente em incubadoras de PVC, com fundo cego e redondo, com volume útil de 3,5L. As incubadoras foram instaladas em um sistema de recirculação, com filtro mecânico e biológico e volume de 5 m<sup>3</sup>. A água utilizada para a incubação dos ovos foi mantida em 27±1°C, por meio de aquecimento elétrico e termostato.

Apenas os ovos em estágio de gástrula ou até início de segmentação (FUJIMURA & OKADA, 2007) foram utilizados para avaliação dos parâmetros embrionários e de desempenho das proles. Esse procedimento foi adotado para padronizar a idade dos ovos a serem incubados. Em seguida, três dias após a eclosão foi mensurada a taxa de sobrevivência das proles à incubação, pela contagem do número total de proles vivas em cada unidade experimental (BOMBARDELLI et al., 2009).

Dessas proles, foram utilizadas 2000 larvas com idade de três dias, para avaliar os efeitos das rações fornecidas às matrizes sobre o tempo de sobrevivência das proles ao jejum. Essas proles foram distribuídas em 20 aquários de 70L, instalados em um sistema de recirculação de água, com filtros e aquecimento elétrico, idênticos aos descritos anteriormente para a incubação dos ovos. A água do sistema de recirculação foi aquecida de modo a manter a temperatura em 27±1°C. Em cada aquário foram alojadas 100 tilápias. Para a avaliação do tempo de sobrevivência ao jejum, foi considerado o tempo necessário para a mortalidade de 100% das tilápias presentes nos aquários (adaptado de LAVENS et al., 1999).

#### *Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água*

Nos viveiros escavados, a temperatura mínima (26,98±1,33°C) e máxima (28,98±1,68°C) da água foi mensurada diariamente por meio de termômetro digital de máxima e mínima (±1°C).

Quinzenalmente, às 6:00 h. foram mensurados os teores de oxigênio dissolvido (7,03±0,27 mg/L; Oxímetro YSI® 550A) e o pH da água (7,06±0,32; pHmetro digital Tecnal® Tec 5). Quinzenalmente, foram mensurados os teores de nitrogênio amoniacal (0,08±0,04 mg/L) (Korollef, 1976), nitrito (0,16±0,04 mg/L) (STRICKLAND & PARSONS, 1972), e alcalinidade total (39,33±1,30 mg CaCO<sub>3</sub>/L) (CARMOUZE, 1994).

A temperatura da água nas incubadoras dos ovos ( $27,09 \pm 1,15^\circ\text{C}$ ) e nos aquários de criação dos alevinos ( $27,22 \pm 1,12^\circ\text{C}$ ) foi mensurada diariamente, conforme descrito anteriormente. A cada três dias, foram mensurados os teores de oxigênio dissolvido e o pH da água das incubadoras ( $7,11 \pm 0,11\text{mg/L}$ ;  $7,87 \pm 0,23$ , respectivamente) e dos aquários ( $6,35 \pm 0,85\text{ mg/L}$ ;  $7,45 \pm 0,17$ , respectivamente), conforme descrito anteriormente.

#### *Mensuração do crescimento, dos índices corporais e de parâmetros hematológicos*

Após o último acasalamento, os peixes foram novamente separados, conforme descrito anteriormente. Ao término desse período, seis fêmeas de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionadas e anestesiadas pela imersão em solução de Benzocaína ( $75\text{mL/L}$ ), adaptado de Ranzani-Paiva et al. (2013) para realização das medidas individuais de peso, comprimento total e comprimento padrão.

Em seguida, as fêmeas foram submetidas à coleta de sangue, retirando-se pelo menos  $4,0\text{ mL}$  de sangue, por punção da veia caudal, inserindo o bisel da agulha perpendicularmente à veia caudal, abaixo da linha lateral (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). As amostras de sangue foram centrifugadas a  $2.800\text{ rpm}$  por cinco minutos e, em seguida foi retirado o plasma e/ou soro. Soro e plasma foram imediatamente congelados e armazenados em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior realização das análises.

Uma alíquota de sangue coletado com EDTA 10% (RANZANI-PAIVA et al., 2013) foi utilizada para a contagem de hematócrito, eritrócidos e análise de hemoglobina.

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (DRABKIN & AUSTIN, 1935.), utilizando o kit comercial “Hemoglobina Bioclin®”, e leitura em espectrofotômetro, conforme recomendação do fabricante.

A contagem de hematócrito foi realizada pelo método do microhematócrito, conforme Goldenfarb et al. (1971). Para a contagem de eritrócitos o sangue foi diluído na proporção de 1:200 em solução salina a 0,65% (RANZANI-PAIVA et al., 2013) e a contagem foi realizada em Câmara Hematimétrica de Neubauer.

Posteriormente foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio ( $\text{VCM} = (\text{Ht}/n^\circ \text{ eritrócitos}) \times 10$ ); hemoglobina corpuscular média ( $\text{HCM} = (\text{Hb}/N^\circ \text{ eritrócitos}) \times 10$ ); concentração de hemoglobina corpuscular média ( $\text{CHCM} = (\text{Hb}/\text{Ht}) \times 100$ ) (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Logo após a coleta do sangue, os animais foram submetidos à eutanásia pela imersão em solução contendo dose letal de benzocaína (250 mg/L), seguido pela secção da coluna vertebral e dissecados para a mensuração individual dos pesos do fígado, das gônadas e das vísceras. Foram calculados o peso médio, o comprimento padrão médio, o ganho de peso médio, a conversão alimentar aparente em peso corporal, a conversão alimentar aparente em ovos, fator de condição, índice hepatossomático (TESSARO et al., 2012), índice gonadossomático (VAZZOLER, 1996) e índice viscerossomático (NG & WANG 2011).

Também foram coletadas amostras de fígado, gônada, baço e rim, as quais foram acondicionadas em microtubos e posteriormente congeladas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

#### *Histologia das gônadas, do fígado e do intestino*

Das mesmas fêmeas submetidas à coleta de sangue, amostras de fígado, dos ovários e do intestino foram fixadas em solução Karnovsky. Porções medianas do fígado e das gônadas foram fixadas, enquanto que dos intestinos foram fixadas de forma aberta, porções de cinco (05) centímetros da parte anterior do intestino. Em seguida, o material foi desidratado pela passagem em séries crescentes de álcool, diafanizado em xilol e incluídos em parafina histológica. Os diferentes tecidos foram cortados em 7µm de espessura, os quais foram corados em hematoxilina e eosina (H.E.). As lâminas foram montadas em Permount® e fotografadas em microscopia óptica (Nikon Eclipse E200®).

Nas gônadas, foram avaliados os estágios de desenvolvimento do epitélio germinativo, (adaptado de Tessaro et al., 2014), sendo determinado o percentual de ovogônias, ovócitos em crescimento primário, ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento, ovócitos vitelogênicos maduro, folículo pós ovulatório e folículo atrésico. No fígado, foi analisado o grau de vacuolização hepática, determinando-se os escores de vacuolização entre 0 e 3, (adaptado de Caballero et al., 2004; Tessaro et al., 2012). Foi atribuído escore = 0 para ausência de vacúolos; escore = 1 para vacuolização reduzida; escore = 2 para vacuolização média e escore = 3 para vacuolização intensa. As avaliações do tecido hepático foram realizadas por meio da captura de imagens em objetiva de 40X, em campos aleatórios, em áreas adjacentes às veias centro lobulares. Finalmente, no intestino foi mensurada a altura das vilosidades intestinais. As análises morfométricas foram realizadas pelo programa Image Pro-plus 4.0® (SILVA et al., 2010).

### *Composição centesimal de tecidos corporais*

Das fêmeas submetidas à eutanásia, foram coletadas amostras da gônada, do fígado, das vísceras e do músculo, que foram armazenadas à -20°C para posterior determinação dos teores de extrato etéreo, matéria seca, matéria mineral e proteína bruta (AOAC, 2000).

### *Parâmetros bioquímicos de sangue*

As análises bioquímicas do sangue foram realizadas no Laboratório de Análises Bioquímicas da Unioeste – *Campus* de Marechal Cândido Rondon. Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas de sangue: cálcio, triglicerídeo, proteína total, albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, colesterol, HDL, creatinina, ácido úrico, imunoglobulina. Essas análises foram realizadas por meio de analisador bioquímico automático modelo Flexor EL 200, utilizando kits específicos ELI Tech (Clinical Systems).

### *Parâmetros bioquímicos de tecido*

As análises bioquímicas dos tecidos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal Fronteira Sul, na cidade de Laranjeiras do Sul-PR.

No fígado e nas gônadas, foram avaliadas a lipoperoxidação, a atividade de catalase, a atividade da superóxido dismutase e a atividade da glutathione transferase, além da quantificação dos teores de glicogênio. No baço e no rim, foi avaliada a atividade de lisozima e quantificados os níveis de nitrito e nitrato.

Antes da realização das análises, as amostras foram preparadas, sendo adicionado tampão fosfato salina e posteriormente homogeneizadas, centrifugadas a 11000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, fracionado em microtubos, congelado e armazenado em ultra freezer a -80°C para posteriores análises.

Uma fração da amostra preparada foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976). Esse método se baseia na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm. Após a leitura da proteína, as amostras foram normalizadas para a concentração de 1mg/mL para a realização dos ensaios posteriores.

A lipoperoxidação de lipídios foi analisada de acordo com Federici et al. (2007) que se baseia na reação de uma molécula de malondialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com a eliminação de duas moléculas de água, formando um pigmento rosa com absorção máxima a 535 nm.

Para a análise da atividade da enzima catalase seguiu metodologia de Aebi (1984), na qual ocorre o decréscimo de absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Para a determinação da catalase em gônadas, foram utilizadas amostras brutas e posteriormente os resultados transformados para 1mg de proteína por mL de amostra. Isso devido à baixa atividade e dificuldade de leitura das amostras diluídas.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme Crouch et al. (1981) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul de formazan pelo radical superóxido gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560 nm.

Para a determinação da atividade da glutathione transferase seguiu-se a metodologia descrita por Habig et al. (1976), a qual parte do princípio de que o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é metabolizado pela enzima glutathione transferase (GST) conjugado à enzima glutathione reduzida (GSH) com aumentos de absorbância em 340 nm. Durante o ensaio, a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético CDNB que produz um conjugado, o qual é detectado em 340 nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado.

O glicogênio foi analisado conforme metodologia de Krisman (1962). As amostras de fígado e gônada foram colocadas em KOH 30% e incubadas a 100°C por 15 min. Posteriormente, foi adicionado etanol 95% e incubadas por 15min a 70°C, seguido de banho de gelo por 20 min para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm e os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

Para a realização da atividade enzimática da lisozima, aderiu-se à metodologia proposta pelos autores Ellis (1990) e Sankaran & Gurnani (1972), realizando-se o ensaio turbidimétrico e medindo a concentração da atividade de lisozima por meio da redução da densidade óptica, a qual foi verificada durante a lise da parede celular da bactéria *Micrococcus lysodeikticus*, cujos resultados foram expressos em µg de lisozima/g de proteína.

A determinação de nitrito e nitrato foi realizada de acordo com Green et al., (1982), Miranda et al. (2001) e Villamil et al. (2002) por meio da reação de Griess. A reação de  $\text{NO}_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em PBS (pH 7,2) (0-150  $\mu\text{M}$ ) e expressos em  $\mu\text{M}$  nitri./nitra./mg de proteína.

#### *Análises estatísticas*

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos. Em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e, o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, ambos a um nível de 5% de probabilidade. Todos os procedimentos foram realizados no *software* Statistica 7.1<sup>®</sup>. Para os dados da atividade enzimática da superóxido dismutase, da glutatona transferase e da lisozima, foram realizadas transformações estatísticas para atender aos pressupostos de homogeneidade e normalidade dos resíduos, sendo os mesmos transformados pelo Rank.

### **3.3 Resultados**

#### *Crescimento e reprodução*

O desempenho reprodutivo das fêmeas de tilápia do Nilo foi influenciado pela inclusão de nucleotídeos na dieta (Tabela 2). A fecundidade relativa (ovos/g fêmea desovante) das fêmeas que desovaram foi maior ( $p < 0,05$ ) para aquelas alimentadas com as rações contendo 7,5g/kg de nucleotídeos (Tabela 2). Por outro lado, o percentual de fêmeas desovantes diminuiu ( $p < 0,05$ ) quando as fêmeas foram alimentadas com as rações com 7,5g/kg e 10g/kg de nucleotídeos (Tabela 2). Conseqüentemente, a fecundidade relativa (ovos/g fêmea acasalada) de todo o grupo acasalado também foi reduzida ( $p < 0,05$ ) com o uso das rações contendo 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos. De modo geral, a produção total de ovos, assim como o peso médio dos ovos, as taxas de sobrevivência à incubação e o tempo de sobrevivência ao jejum, não foram influenciados ( $p > 0,05$ ) pelas rações (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos e de qualidade da prole de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
Percentual de fêmeas desovantes (%)	24,33 <sup>a</sup> ±5,85	20,83 <sup>ab</sup> ±5,28	27,38 <sup>a</sup> ±5,67	14,29 <sup>b</sup> ±7,01	12,53 <sup>b</sup> ±6,81	0,0165
Fecundidade relativa (ovos/g de fêmea)	0,97 <sup>a</sup> ±0,43	0,73 <sup>ab</sup> ±0,47	0,88 <sup>a</sup> ±0,22	0,31 <sup>b</sup> ±0,23	0,32 <sup>b</sup> ±0,13	0,0441
Fecund. Relat. (Ovos/g de fêmea desovante)	3,87 <sup>b</sup> ±0,81	4,15 <sup>b</sup> ±0,47	4,46 <sup>b</sup> ±0,46	6,29 <sup>a</sup> ±2,05	3,51 <sup>b</sup> ±0,60	0,0188
Peso médio dos Ovos (mg)	6,97 ±0,92	7,42 ±0,23	7,26 ±0,55	6,90 ±0,40	6,77 ±0,33	0,4568
Taxa de sobrevivência à incubação (%)	67,38 ±4,45	55,60 ±21,72	47,13 ±13,23	64,00 ±26,96	57,67 ±22,76	0,6176
Tempo de sobrev. ao jejum (dias)	19,13 ±2,78	20,13 ±1,70	18,94 ±0,72	19,13 ±3,92	18,58 ±0,80	0,9279
Total de ovos ( $\cdot 10^{-3}$ )	8,05 ±3,69	8,33 ±2,86	9,81 ±2,24	6,16 ±3,89	4,17 ±1,83	0,1319

O crescimento das fêmeas foi influenciado pelas rações (Tabela 3). As fêmeas alimentadas com as rações contendo 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram os maiores ( $p < 0,05$ ) valores de ganho de peso, as menores ( $p < 0,05$ ) taxas de conversão alimentar em peso e as maiores ( $p < 0,05$ ) taxas de conversão alimentar em ovos (Tabela 3). As rações fornecidas às fêmeas de tilápia do Nilo não influenciaram o peso final, o fator de condição corporal, a sobrevivência e os índices hepatossomático, viscerossomático e gonadossomático (Tabela 3).

Tabela 3 – Crescimento e índices corporais de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
PI (g)	286,57 ±5,02	287,16 ±2,04	286,19 ±2,52	287,22 ±3,16	287,50 ±3,94	0,9832
PF (g)	470,77 ±24,40	461,65 ±21,29	461,05 ±21,59	478,24 ±7,32	488,44 ±8,90	0,2180
GP (g)	170,69 <sup>bc</sup> ±12,58	160,28 <sup>c</sup> ±15,92	162,33 <sup>c</sup> ±11,97	185,51 <sup>ab</sup> ±11,53	190,97 <sup>a</sup> ±3,83	0,0068
CAP (g/gPV)	2,56 <sup>a</sup> ±0,22	2,53 <sup>a</sup> ±0,26	2,45 <sup>a</sup> ±0,09	2,16 <sup>b</sup> ±0,13	2,16 <sup>b</sup> ±0,12	0,0086



CAO (g/ovos)	1,30 <sup>b</sup> ±0,8	1,36 <sup>b</sup> ±0,96	0,86 <sup>b</sup> ±0,22	2,60 <sup>ab</sup> ±1,57	3,39 <sup>a</sup> ±1,72	0,0455
FC (µg/cm <sup>3</sup> )	35,69 ±1,25	36,08 ±1,24	35,75 ±1,32	35,55 ±1,58	35,12 ±1,03	0,8831
SOB (%)	97,62 ±4,76	100,00 ±0,00	100,00 ±0,00	100,00 ±0,00	100,00 ±0,00	0,4380
IHS (%)	2,05 ±0,23	2,13 ±0,20	2,35 ±0,37	2,20 ±0,26	2,17 ±0,30	0,6491
IVS (%)	6,57 ±0,33	6,62 ±0,31	6,71 ±0,42	7,05 ±0,77	6,85 ±0,45	0,6465
IGS (%)	2,67 ±0,94	2,90 ±0,68	1,90 ±0,83	2,40 ±0,60	2,34 ±1,00	0,5257

PI - Peso inicial; PF - Peso final; GP - Ganho de peso; CAP – Conversão alimentar aparente em peso corporal; CAO – Conversão alimentar aparente em ovos; FC - Fator de condição corporal; SOB - Taxa de sobrevivência; IHS – índice hepatossomático; IVS – índice viscerossomático; IGS – índice gonadossomático.

### Hematologia

As fêmeas alimentadas com as rações contendo 5,0, 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram os maiores níveis de hemoglobina (Tabela 4). O total de eritrócitos, o hematócrito, o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelas rações (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
HB (g dL <sup>-1</sup> )	4,25 <sup>b</sup> ±0,28	4,16 <sup>b</sup> ±0,24	4,83 <sup>a</sup> ±0,28	5,00 <sup>a</sup> ±0,29	4,84 <sup>a</sup> ±0,58	0,0131
ERI (10 <sup>6</sup> células µL <sup>-1</sup> )	1,91 ±0,19	1,88 ±0,06	1,88 ±0,08	1,79 ±0,18	1,96 ±0,19	0,9661
HTO (%)	33,03 ±1,73	31,73 ±0,51	32,28 ±0,67	33,95 ±1,53	31,96 ±2,57	0,3159
VCM (fL)	179,19 ±14,71	175,04 ±7,44	171,53 ±17,57	187,34 ±21,71	172,33 ±14,58	0,6026
HCM (pg)	38,69 ±2,70	40,38 ±4,97	41,16 ±5,61	45,33 ±8,14	42,13 ±6,85	0,6110
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	23,08 ±1,32	23,56 ±0,74	24,52 ±0,61	24,79 ±0,41	24,68 ±1,21	0,0714

HB – hemoglobina; ERI – total eritrócitos; HTO – hematócrito; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média.

*Parâmetros bioquímicos do plasma*

As fêmeas de tilápia do Nilo alimentadas com as rações contendo nucleotídeos purificados apresentaram alterações bioquímicas no plasma sanguíneo. Os níveis da alanina aminotransferase foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) nas fêmeas alimentadas com rações contendo entre 2,5 e 7,5g/kg de inclusão de nucleotídeos (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de plasma de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
ALT (UI/L)	22,80 <sup>a</sup> ±4,79	15,17 <sup>b</sup> ±4,11	11,25 <sup>b</sup> ±2,74	13,14 <sup>b</sup> ±1,54	20,64 <sup>a</sup> ±3,50	0,0012
FAL(UI/L)	99,95 <sup>ab</sup> ±8,20	79,64 <sup>bc</sup> ±3,18	89,87 <sup>abc</sup> ±17,96	66,65 <sup>c</sup> ±17,31	108,37 <sup>a</sup> ±9,15	0,0023
ALB (g/L)	17,18 <sup>b</sup> ±0,94	18,31 <sup>ab</sup> ±0,78	19,43 <sup>a</sup> ±1,60	19,44 <sup>a</sup> ±0,85	20,09 <sup>a</sup> ±1,16	0,016
Ca (mg/dL)	7,05 <sup>a</sup> ±1,50	5,46 <sup>ab</sup> ±0,65	3,31 <sup>b</sup> ±2,11	3,55 <sup>b</sup> ±1,78	3,90 <sup>b</sup> ±1,11	0,0157
TG (mg/dL)	494,23 <sup>a</sup> ±71,86	500,67 <sup>a</sup> ±55,78	446,00 <sup>a</sup> ±77,65	246,44 <sup>b</sup> ±74,29	440,73 <sup>a</sup> ±90,79	0,0014
HDL (mg/dL)	44,85 ±4,46	40,91 ±5,91	39,25 ±15,44	31,55 ±9,41	25,74 ±5,25	0,0585
COL (mg/dL)	250,64 ±54,71	279,65 ±65,92	244,21 ±52,39	181,02 ±25,85	266,87 ±61,68	0,1472
CR (µmol/l)	6,92 ±2,19	7,08 ±2,64	7,72 ±2,79	7,45 ±2,85	6,53 ±3,28	0,98
AST (UI/L)	44,82 ±4,83	31,17 ±16,17	29,44 ±5,02	36,17 ±6,015	39,98 ±7,59	0,1514
GLI (mg/dL)	100,80 ±9,65	86,54 ±22,51	77,16 ±16,81	77,03 ±10,16	82,05 ±18,61	0,2674
PTT (g/L)	47,52 ±1,75	47,01 ±4,22	47,20 ±3,14	47,94 ±5,20	46,67 ±0,87	0,9871
AUR (mg/dL)	0,32 ±0,26	0,17 ±0,11	0,14 ±0,10	0,08 ±0,08	0,18 ±0,08	0,22

ALT – alanina aminotransferase; TG – triglicérides; ALB – albumina; Ca – cálcio; FAL – fosfatase alcalina; COL – colesterol total; HDL – colesterol HDL; CR – creatinina; AST – aspartato aminotransferase; GLI – glicose; PTT – proteína total; AUR – ácido úrico.

Os níveis da fosfatase alcalina e de triglicerídeos plasmáticos também foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) nas fêmeas alimentadas com as rações contendo 7,5g/kg de nucleotídeos. Ainda, ao mesmo tempo em que fêmeas alimentadas com as rações contendo entre 5,0 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram os maiores ( $p < 0,05$ ) teores de albumina plasmática, essas fêmeas apresentaram os menores ( $p < 0,05$ ) níveis de cálcio plasmático (Tabela 5). Finalmente, as rações não influenciaram ( $p > 0,05$ ) os níveis plasmáticos de colesterol HDL, colesterol total, creatinina, aspartato aminotransferase, glicose, proteína total e ácido úrico.

#### *Indicadores de estresse oxidativo nos tecidos hepático e gonadal*

O fígado das fêmeas alimentadas com as rações contendo 5,0g/kg de inclusão de nucleotídeos apresentou os maiores ( $p < 0,05$ ) teores de glicogênio hepático (Tabela 6).

Tabela 6 – Indicadores de estresse oxidativo em fígado e gônada de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
<b>Fígado</b>						
GLIC	192,92 <sup>c</sup> ±45,19	197,08 <sup>c</sup> ±46,27	345,37 <sup>a</sup> ±24,62	298,80 <sup>ab</sup> ±44,08	244,92 <sup>bc</sup> ±58,39	0,0102
SOD	0,98 <sup>b</sup> ±0,22	0,64 <sup>b</sup> ±0,20	1,53 <sup>a</sup> ±0,21	1,52 <sup>a</sup> ±0,09	1,64 <sup>a</sup> ±0,08	0,0000
GST	0,97 <sup>b</sup> ±0,10	0,96 <sup>b</sup> ±0,06	0,95 <sup>b</sup> ±0,06	1,12 <sup>a</sup> ±0,09	1,06 <sup>ab</sup> ±0,06	0,0262
CAT	0,21 ±0,02	0,18 ±0,04	0,22 ±0,02	0,21 ±0,02	0,22 ±0,04	0,3505
LPO	0,64 ±,20	1,55 ±0,16	1,00 ±0,58	1,06 ±0,78	0,90 ±0,41	0,1507
<b>Gônada</b>						
CAT	0,0120 <sup>ab</sup> ±0,0017	0,0138 <sup>a</sup> ±0,0016	0,0096 <sup>b</sup> ±0,0011	0,0134 <sup>a</sup> ±0,0028	0,0123 <sup>ab</sup> ±0,0016	0,0435
LPO	0,39 <sup>a</sup> ±0,15	0,32 <sup>b</sup> ±0,14	0,53 <sup>a</sup> ±0,16	0,19 <sup>b</sup> ±0,09	0,24 <sup>b</sup> ±0,12	0,0189
GLIC	4,37 <sup>b</sup> ±0,66	4,24 <sup>b</sup> ±0,97	5,36 <sup>ab</sup> ±0,42	6,48 <sup>a</sup> ±1,39	4,63 <sup>b</sup> ±0,31	0,0458
GST	0,13 ±0,01	0,13 ±0,01	0,14 ±0,02	0,16 ±0,02	0,13 ±0,02	0,1416

CAT – catalase (mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>); LPO – peroxidação lipídica (mmol de MDA mg prot<sup>-1</sup>); GLIC – glicogênio (mg de glicogênio.g tecido<sup>-1</sup>); SOD – superóxido dismutase (unidade de SOD.mg prot<sup>-1</sup>); GST – glutatona transferase (mM. min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>).

A maior ( $p < 0,05$ ) atividade da superóxido dismutase hepática foi verificada nas fêmeas alimentadas com as rações contendo entre 5,0 e 10g/kg de nucleotídeos, enquanto que a maior ( $p < 0,05$ ) atividade da glutathione transferase foi verificada nas fêmeas alimentadas com as rações contendo 7,5g/kg (Tabela 6). As rações não interferiram ( $p > 0,05$ ) sobre a lipoperoxidação e na atividade da catalase hepática (Tabela 6).

Nos ovários, os maiores ( $p < 0,05$ ) teores de glicogênio foram verificados nas fêmeas alimentadas com rações contendo 7,5g/kg de nucleotídeos (Tabela 6). A lipoperoxidação nos ovários foi menor ( $p < 0,05$ ) nas fêmeas que receberam as rações contendo 2,5, 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos, enquanto que as maiores atividades de catalase foram verificadas com 2,5 e 7,5g/kg de inclusão de nucleotídeos (Tabela 6). A atividade da glutathione transferase não foi alterada ( $p > 0,05$ ) pelas rações e não foi evidenciada a atividade da superóxido dismutase em todos os tratamentos (Tabela 6).

#### *Indicadores imunológicos no rim e baço*

No baço, os níveis de nitrito/nitrato permaneceram constantes nas fêmeas alimentadas com rações contendo entre 0 e 7,5g/kg de nucleotídeos, enquanto que somente aquelas alimentadas com 10g/kg apresentaram os menores ( $p < 0,05$ ) valores de nitrito/nitrato (Tabela 7). A atividade de lisozima no baço e no rim e, os níveis de nitrito/nitrato no rim não foram alterados ( $p > 0,05$ ) pelas rações (Tabela 7).

Tabela 7 – Indicadores imunológicos em baço e rim de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
	Baço					
Nitrito/nitrato ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína)	8,32 <sup>a</sup> $\pm 1,10$	8,41 <sup>a</sup> $\pm 1,47$	8,80 <sup>a</sup> $\pm 1,85$	8,57 <sup>a</sup> $\pm 0,52$	4,69 <sup>b</sup> $\pm 1,41$	0,0029
Lisozima ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de proteína)	1,95 $\pm 0,40$	1,93 $\pm 0,32$	1,53 $\pm 0,29$	1,51 $\pm 0,38$	1,67 $\pm 0,18$	0,2001
	Rim					
Nitrito/nitrato ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína)	8,13 $\pm 1,15$	7,89 $\pm 1,46$	7,58 $\pm 1,81$	7,39 $\pm 1,05$	8,85 $\pm 1,04$	0,5916
Lisozima ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de proteína)	10,90 $\pm 1,00$	12,93 $\pm 3,82$	12,27 $\pm 2,54$	13,18 $\pm 4,11$	11,84 $\pm 3,76$	0,8658

*Histologia do fígado, da gônada e do intestino*

As fêmeas alimentadas com rações sem nucleotídeos apresentaram os ovários com o maior ( $p < 0,05$ ) percentual de ovogônias, enquanto que, aquelas alimentadas com rações contendo 5,0, 7,5 e 10g/kg de nucleotídeos apresentaram o maior ( $p < 0,05$ ) percentual de ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento (Tabela 8; Figura 1). O fígado das fêmeas em todos os tratamentos apresentou-se normal, sem deposição de gordura e nem alteração morfológica (Figura 2). Finalmente, a altura das vilosidades no intestino das fêmeas alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados não foi influenciada ( $p > 0,05$ ) pelas dietas (Tabela 8).

Tabela 8 – Altura das vilosidades intestinais e estágio de maturação gonadal de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
Intestino						
Altura das vilosidades ( $\mu\text{m}$ )	34,94 $\pm 1,30$	34,15 $\pm 1,89$	34,55 $\pm 3,27$	32,31 $\pm 2,13$	33,39 $\pm 1,28$	0,5320
Gônada						
Ovogônia (%)	8,37 <sup>a</sup> $\pm 2,30$	5,69 <sup>ab</sup> $\pm 2,05$	3,39 <sup>bc</sup> $\pm 1,47$	1,79 <sup>c</sup> $\pm 2,18$	3,76 <sup>bc</sup> $\pm 1,41$	0,0093
Vitelogênico em desenvolvimento (%)	3,33 <sup>a</sup> $\pm 1,41$	3,73 <sup>a</sup> $\pm 1,54$	5,75 <sup>ab</sup> $\pm 1,52$	4,76 <sup>ab</sup> $\pm 1,23$	6,99 <sup>b</sup> $\pm 2,23$	0,0421
Crescimento primário (%)	67,45 $\pm 7,61$	61,07 $\pm 10,51$	69,09 $\pm 3,92$	60,83 $\pm 6,21$	61,66 $\pm 10,82$	0,4775
Vitelogênico maduro (%)	18,25 $\pm 6,13$	24,75 $\pm 8,13$	21,20 $\pm 5,91$	25,73 $\pm 5,56$	20,67 $\pm 6,85$	0,5011
Folículo pós ovulatório (%)	0,61 $\pm 0,93$	0,95 $\pm 1,59$	0,23 $\pm 0,45$	0,11 $\pm 0,23$	0,56 $\pm 0,68$	0,7107
Folículo atrésico (%)	2,11 $\pm 1,01$	1,80 $\pm 0,45$	1,34 $\pm 1,14$	4,59 $\pm 2,20$	3,78 $\pm 3,64$	0,2043

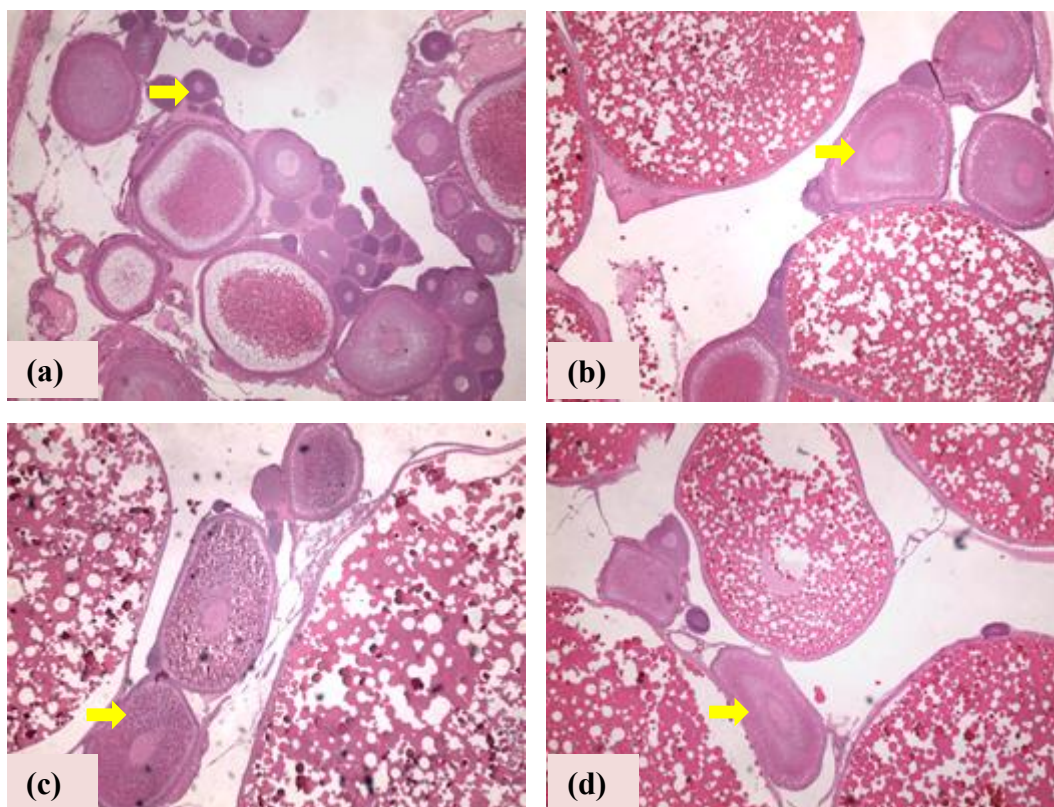


Figura1. Ovário de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva alimentadas com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos. (a) ⇒ Folículo em fase de ovogônia – Fêmeas alimentadas com rações contendo 0g/kg de nucleotídeo; (b) ⇒ Ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento – Fêmeas alimentadas com rações contendo 10g/kg de nucleotídeo; (c) ⇒ Ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento – Fêmeas alimentadas com rações contendo 5,0g/kg de nucleotídeo, (d) ⇒ Ovócitos vitelogênicos em desenvolvimento – Fêmeas alimentadas com rações contendo 7,5g/kg de nucleotídeo. Imagens obtidas com aumento de 40X. Coloração em H.E.

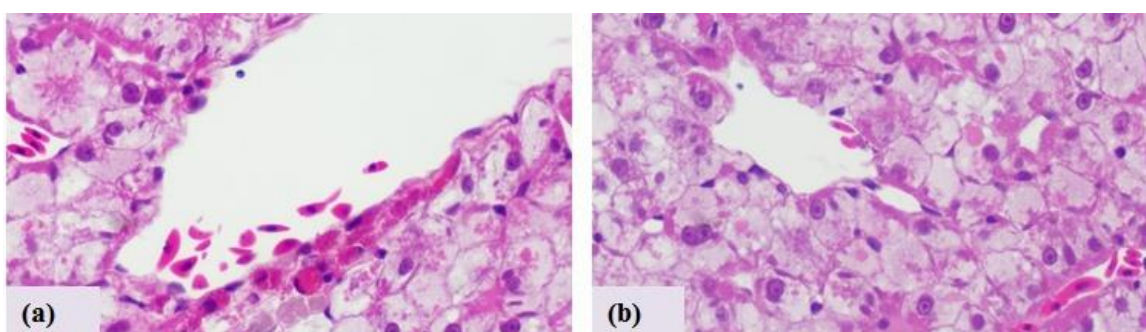


Figura 2. Hepatócitos de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva alimentadas com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos. (a) Hepatócitos de fêmeas alimentadas com rações contendo 0g/kg de nucleotídeo. (b) Hepatócitos de fêmeas alimentadas com rações contendo 10g/kg de nucleotídeo. Imagens obtidas com aumento de 400X. Coloração em H.E.

*Composição centesimal do músculo, fígado, ovário e vísceras*

Os teores de extrato etéreo das amostras de gônada, fígado, vísceras e músculo das fêmeas alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelas dietas (Tabela 9). Nos ovários, os maiores ( $p<0,05$ ) teores de proteína bruta foram verificados nas fêmeas alimentadas com rações contendo 5,0g/kg de nucleotídeos. O teor de proteína bruta das amostras de fígado, vísceras e músculo também não foi influenciado ( $p>0,05$ ) pelas dietas (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de extrato etéreo, matéria mineral, matéria seca e proteína bruta de gônada, fígado, vísceras e músculo de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase reprodutiva, alimentadas com rações contendo nucleotídeos purificados.

Variável	Níveis de inclusão de nucleotídeos (g/kg)					P
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
Extrato etéreo (g/kg <sup>-1</sup> )						
Gônada	8,08 ±1,61	8,86 ±1,43	8,08 ±0,96	8,40 ±0,55	8,47 ±1,58	0,9022
Fígado	3,17 ±1,55	3,66 ±1,13	3,68 ±0,92	4,28 ±1,73	3,52 ±0,90	0,8147
Vísceras	10,67 ±4,94	14,70 ±2,12	14,48 ±2,02	12,39 ±1,74	15,36 ±1,10	0,1426
Músculo	2,05 ±1,98	1,57 ±1,54	1,08 ±0,93	1,29 ±1,29	1,19 ±0,98	0,8669
Matéria mineral (%)						
Gônada	1,40 ±0,26	1,39 ±0,52	2,02 ±0,41	1,80 ±0,94	1,75 ±0,16	0,4191
Fígado	1,87 ±0,31	2,79 1,31±	2,52 ±1,62	2,17 ±0,58	3,16 ±0,66	0,4493
Vísceras	3,28 ±0,13	2,30 ±0,30	2,57 ±0,39	3,59 ±2,83	1,77 ±0,07	0,6792
Músculo	2,55 ±1,95	2,81 ±1,77	2,27 ±1,27	1,71 ±0,71	2,63 ±1,41	0,8488
Matéria seca (%)						
Gônada	42,66 ±2,03	37,53 ±6,40	44,00 ±2,39	40,18 ±2,73	41,88 ±4,07	0,2096
Fígado	29,57 ±1,41	29,49 ±3,37	30,88 ±1,68	30,52 ±1,59	30,61 ±0,88	0,7906
Vísceras	37,64 13,97±	33,13 ±2,47	31,13 ±1,67	35,49 ±1,19	35,14 ±2,05	0,3129

Músculo	22,51 ±0,28	23,17 ±0,55	22,63 ±0,86	22,12 ±0,58	22,40 ±0,80	0,2712
Proteína bruta (%)						
Gônada	26,51 <sup>ab</sup> ±0,33	26,95 <sup>ab</sup> ±1,56	27,85 <sup>a</sup> ±1,30	23,97 <sup>c</sup> ±0,88	26,08 <sup>b</sup> ±0,33	0,0011
Fígado	13,28 ±2,01	14,75 ±0,72	12,63 ±1,58	12,90 ±0,45	12,28 ±0,65	0,0986
Vísceras	8,32 ±2,23	8,02 ±0,71	8,67 ±1,49	7,57 ±0,60	7,78 ±1,21	0,8080
Músculo	23,48 ±1,67	22,68 ±1,35	24,00 ±2,28	22,47 ±2,20	22,19 ±1,21	0,6209

### 3.4 Discussão

A suplementação dietética de nucleotídeos para peixes (BURRELS et al., 2001, TAHMASEBI-KOHYANI et al. 2011, HOSSAIN et al, 2016; GUO et al, 2017, SAMIR et al., 2017 ) e camarões (LI et al. 2007b, ARSHADI et al., 2018) tem se mostrado como uma estratégia importante para melhorar a saúde e o crescimento dos animais. Contudo, algumas pesquisas mostram que os resultados podem apresentar inconstâncias em função das espécies ou das fontes e composições de nucleotídeos empregados nas mesmas (LI & GATLIN III, 2006; LI et al., 2007a). Mesmo com essas perspectivas positivas, as informações sobre os efeitos da suplementação dietética dos nucleotídeos sobre a saúde e a reprodução de machos e fêmeas de peixes ainda são escassas.

De um modo geral, a alimentação das fêmeas de tilápia do Nilo com rações contendo nucleotídeos melhorou a condição corporal e a saúde das matrizes. Do ponto de vista reprodutivo e com foco individual nas fêmeas que desovaram, o aumento da fecundidade relativa pode estar relacionado à maior disponibilidade de energia para atender a maturação gonadal, cujo processo é muito intenso na tilápia do Nilo (LUPATSCH et al., 2010). Nesse caso, possivelmente o direcionamento metabólico dos triglicerídeos plasmáticos para acúmulo e depósito de glicogênio nos ovários (ARSHADI et al., 2018) garantiu o fornecimento de elevadas quantidades de energia metabólica para a maturação ovariana (IZQUIERDO et al. 2001) nas fêmeas desovantes alimentadas com 7,5g/kg de nucleotídeos. Além disso, essa dieta também aumentou a atividade da glutatona transferase, o que provavelmente melhorou a condição gonadal quanto ao equilíbrio redox (HUBER et al., 2008).



Em princípio, aparentemente os nucleotídeos melhoraram a saúde e direcionaram o metabolismo dos animais para o crescimento, uma vez que as fêmeas alimentadas com rações contendo acima de 5,0g/kgde nucleotídeos apresentaram as maiores taxas de crescimento e melhor conversão alimentar, enquanto que com as mesmas dietas o percentual de fêmeas desovantes foi reduzido. Logo, devido à redução do percentual das fêmeas que atingiram a maturação final e desovaram, essas dietas conseqüentemente promoveram a redução da fecundidade relativa do plantel em acasalamento e pioraram a conversão alimentar aparente em ovos.

No entanto, apesar dessas evidências, os nucleotídeos não limitaram o ritmo da vitelogênese e conseqüentemente a maturação final e a desova das fêmeas. A histologia das gônadas corrobora essa hipótese, pois todas as fêmeas estavam maduras e, o mais curioso, reside no fato de que aquelas alimentadas com os maiores níveis de nucleotídeos apresentaram os maiores percentuais absolutos de fêmeas aptas a desovar e nenhuma fêmea em desenvolvimento. Ainda, a condição fisiológica das fêmeas alimentadas com rações contendo acima de 5,0g/kgde nucleotídeos sugere uma maior capacidade metabólica, pois os animais apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de hemoglobina e albumina e conseqüentemente uma maior capacidade de transporte de oxigênio (TAVARES-DIAS &MORAES, 2004) e nutrientes (NELSON, 2014). Associado a esses parâmetros, a concomitante redução dos níveis de cálcio plasmático, o qual é um indicador indireto da vitelogênese (VERSLYCKE et al. 2002), também sugere a sua ligação às proteínas de transporte e reforça a hipótese de direcionamento metabólico induzido pelos nucleotídeos.

Apesar de as fêmeas de tilápia terem maturado suas gônadas, possivelmente não desovaram devido à assincronia de seu ciclo reprodutivo e especialmente ao reduzido período de acasalamento adotado intencionalmente nesta pesquisa (cinco dias) para evitar a coleta de larvas. Portanto, nesse caso, a separação de machos e fêmeas antes da ocorrência da desova pode ter impedido as desovas e contribuído para a economia energética e acentuado os efeitos positivos sobre o crescimento. Como as fêmeas maiores normalmente apresentam maiores fecundidades absolutas (MACINTOSH &LITTLE, 1995), possivelmente necessitam de maiores períodos de tempo para completar o ciclo vitelogênico desta maior quantidade de ovócitos, refletindo em maiores intervalos de tempo entre as desovas, podendo chegar entre 7e 12 dias (EL-SAYED, 2006). Sendo assim, o emprego de períodos mais longos de acasalamento, possivelmente poderia permitir a conclusão do ciclo reprodutivo e refletir no

aumento das fecundidades devido ao aumento do percentual das fêmeas desovantes (EL-SAYED, 2006).

Outro fator que reforça a hipótese de que os nucleotídeos promoveram melhoria na saúde das fêmeas é a melhora nos níveis plasmáticos dos indicadores de integridade hepática e no equilíbrio redox devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes no fígado e gônadas, além da redução da peroxidação lipídica nas gônadas.

Em geral, a suplementação de nucleotídeos melhorou a integridade hepática das fêmeas de tilápia do Nilo, pois reduziu os níveis plasmáticos de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Essas enzimas são comumente utilizadas como marcadores de lesão hepática (ABDEL-DAIM et al. 2015). Contudo, por serem marcadores inespecíficos, as suas dosagens sugerem algum nível de lesão, mas o diagnóstico conclusivo deve ser acompanhado de análises complementares (MOTTA, 2009). Ainda, mesmo que sinais clínicos ou respostas produtivas negativas não tenham sido verificados nesta pesquisa, atenção deve ser dispensada ao fato de que as rações com o maior nível de nucleotídeos aumentaram os níveis de fosfatase alcalina no plasma sanguíneo.

As enzimas superóxido dismutase, glutatona transferase e catalase atuam nas células como antioxidantes enzimáticos, removendo as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (VASCONCELOS et al., 2007; XU et al., 2015). Desta forma, essas enzimas exercem um efeito protetor contra o estresse oxidativo e a sua atividade serve como indicador do equilíbrio redox. Nas gônadas, os níveis de malondialdeído (MDA), que é um produto secundário da peroxidação lipídica e um potencial biomarcador de dano oxidativo (ZHAO et al, 2014) apresentaram uma relação inversamente proporcional aos níveis de catalase. Em analogia aos resultados encontrados para o lambari (*Astyanax altiparanae*), na tilápia do Nilo, essa relação pode estar relacionada a uma potencial inibição da atividade da catalase pelo MDA (GARCIA, 2016).

A expressão da superóxido dismutase na gônada pode servir como um mecanismo de proteção dos ovos contra o aumento repentino das concentrações de espécies reativas de oxigênio, decorrentes do metabolismo oxidativo após a fertilização (FILHO et al., 1993). De uma forma geral, a atividade da superóxido dismutase foi verificada em ovários de diferentes espécies de peixes teleósteos marinhos (FILHO et al., 1993), bem como de vieiras (*Chlamys farreri*) (WANG et al., 2018), mexilhões (*Mytilus coruscus*) (WU et al., 2017) e de ratas (linhagem Wistar) (LOUZADA et al., 2013). No entanto, curiosamente a superóxido dismutase não apresentou atividade nos ovários das tilápias alimentadas com nucleotídeos,

pois não foi verificada a inibição da oxidação do azul de nitrotetrazólio. Como são escassas as informações sobre a atividade dessa enzima nos ovários de tilápias e a sua relação com a reprodução, é notória a importância de novas pesquisas que permitam elucidar tais lacunas.

Como o processo reprodutivo da tilápia do Nilo é muito intenso e demanda elevadas quantidades de energia metabólica (LUPATSCH et al., 2010), frequentemente as fêmeas não apresentam ganho de peso nessa fase de criação (BOMBARDELLI et al., 2017). Assim, apesar de os benefícios ao crescimento e à saúde que os nucleotídeos proporcionam aos peixes já estarem devidamente documentados (LOW et al. 2003; LIN et al. 2009; ABTAHI et al., 2013; XU et al. 2015; SAMIR et al., 2017), esses efeitos sobre matrizes de tilápia do Nilo merecem atenção. As poucas informações sobre os efeitos da suplementação dietética de nucleotídeos para reprodutores de peixes sugerem o aumento na fecundidade e melhora da qualidade dos ovos de alabote-do-Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) e arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) (GONZALEZ-VECINO, 2005 *apud* FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2011). Nesse sentido, Arshadi et al. (2018) mostraram que as dietas enriquecidas com nucleotídeos melhoraram o desempenho reprodutivo, mas não influenciaram o crescimento das fêmeas de camarões do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Além disso, apesar de Arshadi et al. (2018) sugerirem a influência dos nucleotídeos dietéticos sobre os níveis plasmáticos de HDL, colesterol, proteínas totais e glicose em fêmeas de camarão do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), aparentemente esses feitos não foram evidentes em fêmeas de tilápia do Nilo em atividade reprodutiva utilizadas nesta pesquisa. Além disso, mesmo que a suplementação de nucleotídeos na dieta apresente a capacidade de promover a economia no metabolismo energético (BERTO, 2013), aparentemente as dietas não interferiram na mobilização ou deposição de lipídeos nos diferentes tecidos. Independentemente dos resultados, a suplementação dietética de nucleotídeos é benéfica para peixes e outros animais (LI & GATLIN III, 2006; FERNANDEZ-PALACIOS et al., 2009; RINGO et al., 2012, ARSHADI et al., 2018), contudo, as composições em termos de percentual das diferentes bases nitrogenadas e as formas de processamento comercial, sintéticos ou purificados, certamente interferem no sucesso de seu uso.

O fato de as dietas não ter influenciado o fator de condição, o índice gonadossomático, viscerossomático e hepatossomático, pode ser devido à baixa correlação entre esses parâmetros com a reprodução em tilápias saudáveis e em atividade reprodutiva (BOMBARDELLI et al., 2017). Além disso, a contagem de eritrócito, o hematócrito, o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de

hemoglobina corpuscular média permaneceram dentro da faixa considerada como satisfatória para peixes saudáveis (TAVARES DIAS et al., 2009).

A produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase é um componente importante das respostas imunes em peixes (SECOMBES et al. 2001). Assim, atenção deve ser dispensada para a suplementação de nucleotídeos para a tilápia do Nilo em níveis próximos ou superiores a 10g/kg, pois reduzem os níveis de nitrito/nitrato no baço e por isso podem prejudicar a resposta imune nesses peixes. Esse aspecto é relevante, sobretudo porque a expressão de genes relacionados ao sistema imune, especialmente da lisosima, foi prejudicada no baço de linguado (*Scophthalmus maximus*) alimentados com nucleotídeos (LOW et al., 2003). O óxido nítrico é um radical antimicrobiano produzido por macrófagos (NATHAN et al., 1991). Esse radical tem importante papel em uma variedade de processos biológicos como neurotransmissão, morte de células tumorais, imunidade e processos inflamatórios (MOSHAGE et al., 1995) bem como protege a função cardiovascular (ASL et al., 2008). A dosagem de nitrito e nitrato pode servir como indicador indireto de óxido nítrico, pelo fato de serem intermediários metabolicamente estáveis (MIRANDA et al, 2001).

Entretanto, os radicais livres podem induzir morte celular por necrose ou apoptose, dependendo das concentrações, assim o óxido nítrico pode provocar efeitos tóxicos, quando seus níveis estão altos (LIMA-VERDE et al., 2007). A produção fisiológica normal do óxido nítrico para peixes ainda não está estabelecida, por isso, mais estudos se fazem necessários para determinar as concentrações normais deste radical livre em peixes.

A influência dos nucleotídeos dietéticos sobre a saúde intestinal de peixes já é bem descrita; no entanto, as pesquisas realizadas limitam-se a animais jovens (BURRELLS et al., 2001; BORDA et al., 2003; CHENG et al., 2011). No presente trabalho, apesar das fêmeas terem sido submetidas ao estresse do período reprodutivo, os nucleotídeos da dieta não influenciaram a altura das vilosidades intestinais, possivelmente, por não estarem mais em processo de intenso desenvolvimento da mucosa intestinal (GRACIANO, 2012). Ressalta-se, acima disso, que a inclusão de nucleotídeos na dieta não impactou negativamente na saúde intestinal das fêmeas.

### **3.5 Conclusões**

A adição de nucleotídeos na dieta das tilápias do Nilo não inibiu a vitelogênese. As baixas fecundidades podem ter ocorrido devido ao reduzido período de acasalamento. A suplementação dietética de nucleotídeos promoveu ganhos no crescimento, melhoria na conversão alimentar e melhorias na saúde dos peixes. A suplementação dietética com níveis acima de 7,5g/kg de nucleotídeos pode causar a médio e longo prazo alterações no fígado e no sistema imune das fêmeas em fase reprodutiva.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M., ABDELKHALEK, N. K., HASSAN, A.M. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, p.146–152, 2015.
- ABTAHI, B.; YOUSEFI, M.; KENARI, A. A. Influence of dietary nucleotides supplementation on growth, body composition and fatty acid profile of Beluga sturgeon juveniles (*Huso huso*). **Aquaculture Research**, v. 44, p.254–260, 2013.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Method Enzym**, v.105, p.121-126, 1984.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th. v. II., 2000.
- ARSHADI, A.; YAVARI, V.; OUJIFARD, A.; et al. Dietary nucleotide mixture effects on reproductive and performance, ovary fatty acid profile and biochemical parameters of female Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v.24, p.515-523, 2018.
- ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F.; Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.
- BALLESTRAZZI, R.; RAINIS, S.; TULLI, F.; et al. The effect of dietary coconut oil on reproductive traits and egg fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v.11, p.289-299, 2003.
- BERTO, R. S. **Extrato de leveduras no crescimento, utilização dos nutrientes e respostas hemato-imunológicas em tilápia-do-Nilo**. 2013. 59f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BHUJEL, R. C.; YAKUPITIYAGE, A.; TURNER, W. A.; et al. Selection of a commercial feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish breeding in a hapa-in-pond system. **Aquaculture**, v. 194, p.303–314, 2001.
- BHUJEL, R.C. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. **Aquaculture**, v.181, p.37-59, 2000.
- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; NATALI, M. R. M.; et al. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1391-1399, 2009.
- BOMBARDELLI, R.A.; GOES, E. S. R.; SOUSAC, S. M. N.; et al. Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing diferente levels of protein and energy. **Aquaculture**, v.479, p.817–823, 2017.

- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.539-545, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
- BURRELLS, C.; WILLIAMS, P. D.; SOUTHGATE, P. J.; et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v.199, p.171–184, 2001.
- CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M.S.; KJORSVIK, E. et al. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short- or long – term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. **Journal of Fish Disease**, v.27, p.531-541, 2004.
- CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 1994. 253p.
- CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.35, p.235-41, 1981.
- DRABKIN, D. L., AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies: ii. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v.112, p.51-65, 1935.
- ELLIS, AE. Lysozyme assays. In: STOLEN, JS., FLETCHER, TC., ANDERSON, DP., ROBERSON, BS.; MUISWINKEL, WB.,. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications. 1990. p.101-103.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. London: AMA Data Set Ltda. 2006. 277p.
- EL-SAYED, A.M.; KAWANNA, M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. **Aquaculture**, v.280, p.179–184, 2008.
- EL-SAYED, A.M.; MANSOUR, C.R.; EZZAT, A.A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v.248, p.187-196, 2005.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. 2018. 228p.
- FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007

- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M. S. Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. In: ESTÉVEZ, M A. C. **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009. p.339-400.
- FILHO, D. W.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.106C, n.2, p.409-413, 1993.
- FUJIMURA, K.; OKADA, N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. **Development Growth and Differentiation**, v.49, p.301-324, 2007.
- GARCIA, D. P. **Metabolismo do malondialdeído em peixes: implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática**. 2016, 93 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982.
- GUO, X.; RAN, C.; ZHANG, Z.; et al. The Growth-Promoting Effect of Dietary Nucleotides in Fish Is Associated with an Intestinal Microbiota-Mediated Reduction in Energy Expenditure<sup>1-3</sup>. **The Journal of Nutrition**, v.147, p.781-788, 2017.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130-7139, 1976.
- HOSSAIN, M. S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; et al. Dietary nucleotide administration influences growth, immune responses and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture**, v.455, p.41-49, 2016.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathionas e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008
- IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25-42, 2001.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K.; ALMGREEN, T. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976. 317 p.
- KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v.4, p. 17-23, 1962.



- LAVENS, P.; LEBEGUE, E.; JAUNET, H. et al. Effects of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. **Aquaculture International**, v.7, p.225-240, 1999.
- LI, P.; GATLIN III, D. M.; NEILL, W. H. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.281–286, 2007a.
- LI, P.; GATLIN III, D.M. Nucleotide nutrition in fish: current status and future applications. **Aquaculture**, v.251, p.141–152, 2006.
- LI, P.; LAWRENCE, A. L.; CASTILLE, F. L.; et al. Preliminary evaluation of a purified nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v.38, p.887–890, 2007b.
- LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117, 2006.
- LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. **Medicina Veterinária**. v.1, n.1, p.81–88, 2007.
- LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S.Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture Nutrition**, v.15, p.117-122, 2009.
- LOUZADA, S. M.; GUILHERME, C.; MACHADO, F. S.; et al. Efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria sobre parâmetros oxidativos no ovário de ratas. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.2, n.2, p.92-102, 2013.
- LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELLS, C.; et al. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture**, v.221, p.23–40, 2003.
- LUPATSCH, I., DESHEV, R., MAGEN, I. Energy and protein demands for optimal egg production including maintenance requirements of female tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v.41, p.763–769, 2010.
- MACINTOSH, D.J., LITTLE, D.C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: BROMAGE, N.R., ROBERTS, R.J. **Broodstock management and egg and larval quality**. London : Blackwell Science, 1995. p.277-320.
- MEURER, F., HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de alguns alimentos protéicos para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1801-1809, 2003.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; et al. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.1, p.1-6, 2005.

- MEURER, F.; FRANZEN, A.; PIOVESAN, P.; et al. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, v.43, p.1734–1737, 2012.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric oxide: Biology and Chemistry**, v.5, n.1, p.62-71, 2001.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v.41, p.892-6, 1995.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 9.ed. Rio de Janeiro: Medbook Editora Científica, 2009.
- NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthases in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v.3, p.65-70, 1991.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.281-312.
- NG, W.; WANG Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture**, v.314, p.122–131, 2011.
- OLIVEIRA, M. M. **Dietas para reprodutores de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 95f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PeixeBR - Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Peixe Br da Piscicultura. São Paulo. 2018.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª Ed., Maringá: Edum, 2013.
- RINGØ, E.; OLSEN, R. E.; VECINO, J. L. G.; et al. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. **Journal of Marine Science: Research & Development**. v.2, n.1, p.1-22, 2012.
- SAMIR, S.; EL-NABY, A. S. A.; KHATTABY, A. A.; et al. Improvement of growth rate, feed utilization, body composition and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by supplementation of nucleotide in diets. **In: 1st International Conference (Central Laboratory For Aquaculture Research In Cooperation With Worldfish)**, Cairo. 2017, p.62-88.
- SANKARAN, K.; GURNANI, S. On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.9, n.2, p.162-165, 1972.

- SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.549–556, 2010
- SECOMBES, C. J.; WANG, T.; HONG, S.; et al. Cytokines and innate immunity of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, n.8-9, p.713-23, 2001.
- SIDDIQUI, A.Q.; AL-HAFEDH, Y.S.; ALI, S.A. Effect of protein level on the reproductive performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L). **Aquaculture Research**, v.29, n.5, p.349-358, 1998.
- SILVA, L. C. R.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; et al. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.39, n.6, p.1175-1179, 2010.
- SMALL BC. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.589-596, 2004.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. Pennsylvania: Fisheries Research Board of Canada, 1972. 310 p.
- TACON, P.; NDIAYE, P.; CAUTY, C. et al. Relationships between the expression of maternal behavior and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.146, p.261-275, 1996.
- TAHMASEBI-KOHYANI, A.; KEYVANSHOKOOH, S.; NEMATOLLAHI, A.; et al. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Fish shellfish Immunology**, v.30, p.189-93, 2011.
- TAKAHASHI, E. L. H.; GOITEIN, R.; OKADA NAKAGHI, L. S. Maturidade do ovário no cascudo *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes, Loricaridae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.1, p.107-112, 2008.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Eletrônica e Arte Fina, 2004, p.144.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Metazoan and protozoan parasites of freshwater ornamental fish from Brazil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p.469-494.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; et al. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. **Aquaculture**, v.326-329, p.74-80, 2012.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; et al. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture Research**, v. 45, p.1425–1433, 2014.

- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. EDUEM, Maringá, 1996.
- VERSLYCKE, T.; VANDENBERGH, G. F.; Versonnen, B.; et al. Induction of vitellogenesis in 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**. v.132, p.483–492, 2002.
- VILLAMIL, L.; TAFALLA, C.; FIGUERAS, A.; et al. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.1318-1323, 2002.
- WANG, M.; WANG, B.; JIANG, K.; et al. A mitochondrial manganese superoxide dismutase involved in innate immunity is essential for the survival of *Chlamys farreri*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.72, p.282–290, 2018.
- XU, L.; RAN, C.; HE, S.; et al. Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ x *Oreochromis aureus* ♂. **Animal Nutrition**. v.1, p.244–251, 2015.
- ZHAO, J.; FENG, L.; LIU, Y.; et al. Effect of dietary isoleucine on the immunity, antioxidant status, tight junctions and microflora in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish Shellfish Immunology**, v.41, p.663–73, 2014.