

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ *CAMPUS DE*
MARECHAL CÂNDIDO RONDON CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

JULIANO KELVIN DOS SANTOS HENRIQUES

**DESEMPENHO DE REPRODUTORES DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS
COM RAÇÕES CONTENDO NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS**

Marechal Cândido Rondon

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ *CAMPUS DE*
MARECHAL CÂNDIDO RONDON CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

JULIANO KELVIN DOS SANTOS HENRIQUES

**DESEMPENHO DE REPRODUTORES DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS
COM RAÇÕES CONTENDO NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS**

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

Marechal Cândido Rondon

2018

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

Henriques, Juliano Kelvin dos Santos
Desempenho de reprodutores de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo nucleotídeos purificados / Juliano Kelvin dos Santos Henriques; orientador(a), Robie Allan Bombardelli, 2018.
43 f.

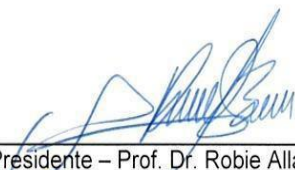
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Piscicultura. 2. Nutrição. 3. Reprodução. I. Bombardelli, Robie Allan. II. Título.

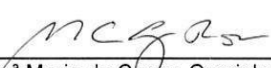
JULIANO KELVIN DOS SANTOS HENRIQUES

**Desempenho de reprodutores de tilápia do Nilo alimentados com rações
contendo nucleotídeos purificados**

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



Orientador / Presidente – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) – *Campus* de Toledo



Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Gominho Rosa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) – *Campus* de Toledo



Prof.^a Dr.^a Vanessa Yuri de Lima
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) – *Campus* Toledo

Marechal Cândido Rondon, 06 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Orvaldo Fanfa Henriques (*in memorian*) e Evanilde Fátima dos Santos Henriques, por acreditarem em mim, pelo apoio sempre prestado, pelo amor incondicional, por terem me dado a chance e tornar possível sair de casa para estudar, não medindo esforços para que eu sempre pudesse estar bem nessa longa distância, dentro das nossas condições.

Pela educação e valores repassados desde cedo, pelas palavras carinhosas, quando a saudade apertava no peito.

À minha irmã, Juline Henriques Barea, pela ajuda e apoio sempre prestados, pelo amor real e caráter, obrigado!

Aos meus amigos irmãos, pelos quais eu tenho um enorme apreço e consideração, amigos que fiz em Marechal Cândido Rondon e em Toledo, obrigado pela grande amizade, pelas conversas, pelas festas, e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Eu aprendi muito com vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa por meio do Processo CNPq nº 311658/2016-4 e Processo CNPq nº 429239/2016-5.

À NutriQuest[®] TechnoFeed[™] pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa por meio da doação do Ascogen[®].

À Piscicultura Sgarbi pelo colaboração no desenvolvimento desta pesquisa por meio da doação dos reprodutores e matrizes.

À Dra. Marta Margarete Cestari e a toda a equipe do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental pela colaboração na realização das análises de integridade do DNA – Teste Cometa.

Ao professor Robie Allan Bombardelli, pela orientação, ajuda, compreensão e conhecimentos transmitidos que contribuíram muito para minha formação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis, pela grande amizade, conhecimentos compartilhados e companheirismo.

Aos mestres, todos os professores da Unioeste campus de Marechal Cândido Rondon e Toledo, pelo conhecimento transmitido e, além disso, amizade além da sala de aula.

Enfim, a todos que fizeram e continuam fazendo parte da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigado mesmo, sempre guardarei vocês no meu coração.

DESEMPENHO DE REPRODUTORES DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS COM RAÇÕES CONTENDO NUCLEOTÍDEOS PURIFICADOS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de nucleotídeos purificados em dietas para reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por rações isoprotéicas e isoenergéticas contendo 28% de proteína digestível (PD) e 2800 kcal de energia digestível (ED)/kg de ração e, cinco níveis de inclusão de nucleotídeo purificado nas proporções de 0,00; 0,25, 0,50, 0,75, e 1,00%. Após cinco meses de alimentação e manejo reprodutivo, foram avaliados o crescimento, os índices somáticos, parâmetros seminais e espermáticos, composição centesimal de diferentes tecidos, bioquímica plasmática, índices hematológicos e parâmetros histológicos. Os reprodutores alimentados com rações contendo 0,25% de nucleotídeos apresentaram maior ($p<0,05$) percentual de espermatozoides com a cromatina nuclear íntegra. Os peixes alimentados com as rações contendo 0,00; 0,25 e 1,00% apresentaram os maiores ($p<0,05$) índices viscerossomático, gonadossomático e hepatossomático, respectivamente. A gordura hepática e os triglicerídeos plasmáticos foram reduzidos ($p<0,05$) em todos os tratamentos em que os reprodutores foram alimentados com nucleotídeos, o HDL foi maior ($p<0,05$) no plasma de peixes tratados com nucleotídeos nas rações. A altura do vilos e túnica também foram influenciadas ($p<0,05$) pelas rações suplementadas. Os demais parâmetros avaliados não foram influenciados pelas rações ($p>0,05$). Conclui-se que a alimentação dos reprodutores de tilápia alimentados com rações contendo nucleotídeos apresentam melhoras nos parâmetros reprodutivos e interferem positivamente no metabolismo e morfologia intestinal do reprodutor, a alimentação destes animais com rações contendo 0,25% de inclusão melhoram a condição espermática e gonadal.

Palavras-chave: DNA, espermatozoide, histologia, machos, nutrição, plasma

PERFORMANCE OF NILE TILAPIA BREEDERS FED WITH PURIFIED NUCLEOTIDE RATION

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the inclusion of purified nucleotides in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The animals were distributed in a completely randomized experimental design, consisting of five treatments and four replicates. The treatments consisted of isoproteic and isoenergetic rations containing 28% of digestible protein (PD) and 2800 kcal of digestible energy (ED) / kg of feed and five levels of inclusion of purified nucleotide in the proportions of 0.00; 0.25, 0.50, 0.75, and 1.00%. After five months of feeding and reproductive management, growth, somatic indexes, seminal and sperm parameters, centesimal composition of different tissues, plasma biochemistry, hematological indices and histological parameters were evaluated. Breeders fed diets containing 0.25% nucleotides had a higher ($p < 0.05$) percentage of spermatozoa with intact nuclear chromatin. Fish fed with rations containing 0.00; 0.25 and 1.00% presented the highest ($p < 0.05$) viscerosomatic, gonadosomatic and hepatosomatic rates, respectively. Hepatic fat and plasma triglycerides were reduced ($p < 0.05$) in all treatments in which breeders were fed nucleotides; HDL was higher ($p < 0.05$) in the plasma of fish treated with nucleotide rations. The height of the villi and tunic were also influenced ($p < 0.05$) by the supplements fed. The other parameters evaluated were not influenced by the rations ($p > 0.05$). It is concluded that the feeding of tilapia fed with rations containing nucleotides present improvements in the reproductive parameters and interfere positively in the metabolism and intestinal morphology of the reproductive system, feeding of these animals with rations containing 0.25% of inclusion improve the sperm and gonadal condition .

Key-words: DNA, sperm, histology, males, nutrition, plasma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual dos alimentos e conteúdo de nutrientes das dietas experimentais contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	17
Tabela 2 – Parâmetros seminais e espermáticos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	25
Tabela 3 – Parâmetros de desempenho zootécnico de tilápia do Nilo Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	26
Tabela 4 – Parâmetros corporais de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	26
Tabela 5 – Composição bromatológica de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.....	26
Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos do plasma de tilápias do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis e nucleotídeos purificados	27
Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	28
Tabela 8 – Morfometria do tecido intestinal da tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	29
Tabela 9 – Área e grau de vacuolização de hepatócitos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural dos nucleotídeos.	15
Figura 2 – Intestino de reprodutores de tilápia do Nilo alimentada com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.....	28
Figura 3 – Tecido hepático de reprodutores de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	30
Figura 4 – Tecido gonadal de machos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 Revisão	12
2.1 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	12
2.2 Nutrição de reprodutores	13
2.3 Nucleotídeos	14
3. Materiais e métodos:	17
3.1 Animais, instalações e condições experimentais.....	17
3.2 Rações experimentais e manejo alimentar	17
3.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água.....	18
3.4 Manejo reprodutivo	18
3.5 Parâmetros reprodutivos	19
3.6 Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue	21
3.7 Parâmetros de crescimento e índices corporais	23
3.8 Composição centesimal	23
3.9 Análises Histológicas	23
3.10 Análises estatísticas	24
4. Resultados	24
5. Discussão	31
5. Conclusão	33
6. Referências	33

1 Introdução

A aquicultura é o setor de fornecimento de alimentos de origem animal em maior crescimento segundo a FAO (2016). Atualmente, a produção de tilápias, dentre os segmentos da aquicultura, é o setor que mais cresce, sendo que no Brasil, com a produção de 357,639 mil toneladas em 2017, é o terceiro maior produtor das Américas, ficando atrás dos Estados Unidos e Chile (Peixe BR, 2018).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais difundida no mundo, presente em cerca de 135 países em todos os continentes, sendo a espécie que mais vêm contribuindo com o desenvolvimento da aquicultura, responsável por uma produção de mais de 3,95 milhões de toneladas, sendo a segunda espécie de peixe de água doce mais produzida no mundo (FAO, 2016).

Nos sistemas intensivos de criação, os peixes são expostos continuamente a situações de estresse, tais como, variação na qualidade da água, práticas de manejo, transporte e adensamento. Quando o estresse é constante ou de maneira aguda aos animais, pode induzir a prejuízos ao desempenho produtivo, resposta do sistema imune e resistência dos peixes (Brandão et al., 2006). Desta forma, alguns aditivos nutricionais são utilizados como forma de fortalecer o sistema imune dos peixes e melhorar o ritmo metabólico, para que consigam manter a homeostase do organismo, apesar dos agentes estressores constantes do meio de cultivo.

Aditivos com capacidades imunoestimulantes e de regulação metabólica são agrupados em compostos nutricionais em que os nucleotídeos recebem destaque (LI e GATLIN III, 2006). Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um, dois ou três grupos fosfatos, possuindo funções fisiológicas essenciais ao organismo (CHAMPE e HARVEY, 1996). Normalmente, os organismos vivos podem sintetizar quantidades adequadas de nucleotídeos para o crescimento e desenvolvimento normal, no entanto, podem se tornar essenciais quando a síntese endógena é limitada em tecidos onde ocorre a rápida replicação celular (LERNER e SHAMIR, 2000).

A suplementação de nucleotídeos de forma exógena é interessante quando a síntese endógena não atende à demanda do organismo (Carver e Walker, 1995), pois a deficiência dietética desse composto pode comprometer as funções do fígado e intestino (Grimble e Westwood, 2000), podendo acarretar em prejuízos ao desempenho e saúde dos animais. (CHAGAS et al., 2009). Nucleotídeos dietéticos aumentam a absorção intestinal dos nutrientes, aumentam o metabolismo dos triglicerídeos, das lipoproteínas, dos ácidos graxos

de cadeia longa poli-insaturada, além de apresentar efeito na mucosa intestinal e armazenamento de nutrientes no fígado, também são importantes no reparo das fitas de DNA em células de tecidos danificados (SCHLIMME et al., 2000).

Apesar das evidências positivas do uso de rações suplementadas com nucleotídeos em animais de produção em fase de crescimento, poucos trabalhos foram realizados com reprodutores de peixes. Portanto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da alimentação de reprodutores de tilápia do Nilo com rações contendo nucleotídeos purificados, sobre o desempenho reprodutivo, crescimento, índices somáticos, composição centesimal e parâmetros sanguíneos, hematológicos e histológicos.

2 Revisão

2.1 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

As tilápias pertencem à família Cichlidae e são nativas do continente africano (El-Sayed, 2006). Tilápia também é o nome comum aplicado às espécies de peixes do gênero *Oreochromis*, *Saratherodon* e *Tilapia* (WATANABE et al., 2002).

Os primeiros relatos de tilápias no Brasil são da década de 1950 com a *Tilapia rendalli* e o primeiro registro da tilápia do Nilo (variedade Bouaké), foi no ano de 1971, quando alguns exemplares oriundos da Costa do Marfim foram introduzidos no estado do Ceará (CASTAGNOLLI, 1992).

A partir da década de 90 a tilapicultura brasileira teve seu desenvolvimento através do sucesso da tilápia nos mercados nacional e internacional (TOMAZELLI JÚNIOR e PHILIPPI, 2006). Em 1995 o cultivo se intensificou, impulsionado pela aceitação da tilápia nos pesque-pagues das regiões Sul e Sudeste do Brasil (KUBITZA e CAMPOS, 2005).

A tilápia do Nilo é uma das espécies mais cultivadas do mundo por apresentar características altamente desejáveis, tais como: rusticidade (Meurer et al., 2008), boa adaptação à produção em tanques-rede, à viveiros escavados, à “raceways” ou tanques circulares (Meurer et al., 2002), além de sua aceitação às rações artificiais (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004), apresentar hábito alimentar onívoro e, possuir adaptações morfológicas e fisiológicas que possibilitam a utilização eficiente de carboidratos como fonte de energia (Tengjaroenkul et al., 2000), o que pode refletir em uma redução no custo com a alimentação.

Além das características benéficas ao cultivo, a tilápia apresenta particularidades interessantes na sua carne, sendo de coloração branca e de textura firme, com um sabor suave

e ausência de odor desagradável, apresenta ainda uma filetagem mais fácil que de outras espécies por não possuir espinhas em „Y“ (Silva et al., 2009), sendo bem aceita pelos consumidores.

A intensificação dos sistemas de cultivo e o desenvolvimento a partir da atividade aquícola fizeram com que a aquicultura investisse em melhorar as características de desempenho e, conseqüentemente, foram realizadas pesquisas de melhoramento genético (PENMAN e MCANDREW, 2000). Desta forma, nas Filipinas, surgiu o projeto denominado GIFT, sigla para a denominação Genetically Improved Farmed Tilapia, realizado no período de 1988 a 1997 pelo International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM) (KHAW et al., 2008).

A variedade de tilápia GIFT se desenvolveu de um rigoroso processo de seleção genética, resultando em excelente desempenho produtivo e rusticidade ao manejo reprodutivo, em virtude da elevada resistência às doenças (KHAW et al., 2008). Logo, devido a este crescimento da tilapicultura, o conseqüente aumento da demanda por larvas e juvenis dessa espécie no Brasil tem direcionado a busca de melhores práticas de manejo que maximizem a produção e forneçam animais de qualidade.

No Brasil, a GIFT foi introduzida no ano de 2005 por meio da parceria do centro de Aquicultura UEM/CODAPAR/Paraná e a Secretaria de Aquicultura e Pesca (SEAP-PR) com a Word Fish Center, com o objetivo de continuar o programa de melhoramento genético dessas famílias nas condições de cultivo brasileiras (FÜLBER, 2007).

2.2 Nutrição de reprodutores

Os nutrientes ofertados na dieta são direcionados para o desenvolvimento das gônadas, espermatozoides, ovócitos e processo de ovulação, assim, é fundamental que a nutrição dos reprodutores seja adequada (MEWES et al., 2016). Segundo Maggioni et al. (2008), os níveis nutricionais podem afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de acarretar alterações do funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução.

A exigência nutricional para cada fase de crescimento é diferente, inclusive para a fase reprodutiva. Contudo, as formulações de rações existentes no mercado são voltadas para o crescimento e a terminação, não havendo uma ração que atenda aos reprodutores. Pelo fato da qualidade dos gametas e das proles estar relacionada com a qualidade da nutrição dos reprodutores (Bombardelli et al., 2010), as interações entre nutrição e os processos

reprodutivos não são claros (Tessaro et al., 2012), sendo assim necessários os estudos voltados à nutrição de reprodutores.

Ainda são escassos os estudos para determinar as exigências nutricionais de reprodutores de peixes (Bombardelli, 2007), especialmente para a tilápia do Nilo, tendo em vista que a melhoria dos gametas masculinos contribui para o sucesso reprodutivo e irão garantir o fornecimento de ovos, larvas e juvenis de qualidade.

Atualmente estudos indicam a necessidade de utilizar nutrientes e aditivos nutricionais que visam melhorar o desempenho reprodutivo de tilápia do Nilo (Bombardelli et al., 2009), pois a elaboração de uma dieta adequada nutricionalmente será responsável por determinar o crescimento e desenvolvimento gonadal, garantido assim uma melhor performance reprodutiva (Parra et al., 2010).

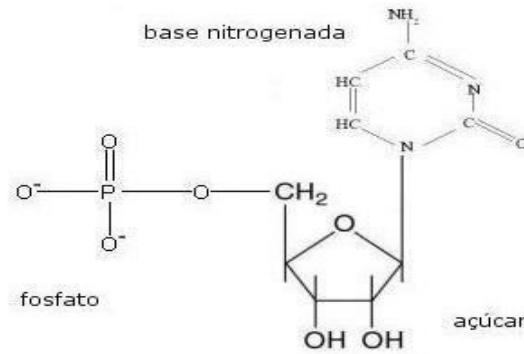
Nesse sentido, para atender à elevada demanda da piscicultura, é de fundamental importância melhorar os índices reprodutivos e, com isso, aumentar a produção e fornecimento de larvas e juvenis em quantidades suficientes e de boa qualidade (Navarro et al., 2009).

2.3 Nucleotídeos

Os nucleotídeos são compostos biológicos de baixo peso molecular que desempenham diversas funções fisiológicas e bioquímicas essenciais (Carver e Walker, 1995; Zhao et al., 2015). Estes são compostos (Figura 1), por uma base de purina ou pirimidina, um açúcar pentose ou desoxirribose e um ou mais grupos de fosfato (Lehninger et al., 2005). São monômeros de ácidos nucleicos, DNA e RNA e também fornecem energia metabólica (Yin et al., 2014). Além disso, podem servir como componentes de coenzima, moléculas reguladoras, podem participar na síntese de proteínas e podem influenciar o sistema imune (Cheng et al., 2011; Zhao et al., 2015).

A suplementação deste composto é necessária quando a síntese endógena não é suficiente para atender a demanda do organismo (Carver e Walker, 1995), como na mucosa intestinal, células germinativas, tecido hepático e cérebro (LI e GATLIN, 2006).

Figura 1 – Formula estrutural dos nucleotídeos.



Adaptado de Rodweel et al., (2017)

O animal pode sintetizar os nucleotídeos pela via *salvamento*, via *de novo* ou através da dieta (LOW et al., 2003). Os nucleotídeos dietéticos são caracterizados como não essenciais, no entanto, há determinadas situações em que o uso dos nucleotídeos de forma exógena se torna essencial, como períodos de elevada taxa de crescimento e replicação celular (Xu et al., 2015), situações de estresse, ou em animais comprometidos imunologicamente (PENG et al., 2013).

Li e Gatlin, 2006). relataram que os nucleotídeos dietéticos são responsáveis por modularem o metabolismo dos nucleotídeos endógenos presentes no fígado, sendo este o órgão mais importante para estocagem e transporte destes compostos, estando presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal como nucleotídeos livres e ácidos nucléicos.

Os nucleotídeos são importantes na dieta para tornar disponíveis bases e nucleosídeos que podem ser utilizados imediatamente na síntese de nucleotídeos, pela via de *salvamento*. Essa via é muito importante para os tecidos e órgãos pelos quais a síntese de nucleotídeos é limitada, mas que apresentam uma rápida divisão mitótica. Consequentemente, há uma grande demanda de nucleotídeos para atender à rápida divisão mitótica de tecidos e órgãos, como no cérebro, eritrócitos, medula óssea, mucosa intestinal e linfócitos (ROSSI et al., 2007). Uauy (1994) apresentou que células de rápido crescimento, como enterócitos, possuem capacidade limitada para síntese de purinas e pirimidinas pela síntese *de novo*, portanto é necessária a suplementação exógena para manter o *pool* de nucleotídeos.

Ainda, são encontrados estudos sobre a suplementação de nucleotídeos na dieta em peixes que demonstram melhores resultados para o crescimento em estágios iniciais de desenvolvimento, modificação da estrutura intestinal (Men et al., 2014), aumento da resistência ao estresse, bem como modulação da resposta imune (BARROS et al., 2015).

Também é importante destacar que a suplementação com nucleotídeos na dieta de reprodutores de peixes pode ser benéfica para o desempenho reprodutivo, uma vez que a oogênese é um processo de intensa divisão celular, exigindo alta formação de ácido nucléico e alto requerimento de nucleotídeos (GONZÁLEZ-VECINO et al., 2004).

3. Materiais e métodos:

3.1 Animais, instalações e condições experimentais

Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Foram utilizados 140 machos ($540,84 \pm 8,92g$) e 420 fêmeas ($286,00 \pm 7,15g$) de tilápia do Nilo da linhagem GIFT, alojados em 40 hapas de malha 1mm, sendo alocadas em dois viveiros escavados revestidos de alvenaria e com fundo de terra. Os machos foram alocados em 20 hapas com dimensões de 2m x 1m totalizando sete machos por unidade experimental. As fêmeas foram alocadas em 20 hapas de dimensões 3m x 2m, totalizando 21 fêmeas por unidade experimental. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de níveis crescentes de nucleotídeos nas dietas experimentais (0,00; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,00%).

3.2 Rações experimentais e manejo alimentar

Foram confeccionadas rações isoproteicas e isoenergéticas, com 28% de proteína digestível (PD) e 2800 kcal de energia digestível (ED)/kg de ração (Tabela 1), com 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,00% de inclusão de nucleotídeos purificados (Ascogen[®]). Para a elaboração das rações, os ingredientes foram triturados em moinho de martelo utilizando peneira de 0,5mm (Meurer et al., 2005) misturados e em seguida submetidos ao processo de extrusão (3mm de diâmetro). A taxa de alimentação foi de 1% da biomassa ao dia. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia (11h 00min e 16h 00min).

Tabela 1 – Composição percentual dos alimentos e nutrientes das dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de nucleotídeo purificado.

Ingredientes (%)	Inclusão de nucleotídeo nas rações(%)				
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Farelo de soja	53,32	53,32	53,32	53,32	53,32
Milho	28,689	28,68	28,68	28,68	28,68
Farinha de peixe (60%)	7,30	7,30	7,30	7,30	7,30
Inerte ¹	5,16	4,91	4,66	4,41	4,16
Nucleotídeo Ascogen ^{®2}	0	0,25	0,50	0,75	1,00
Fosfato bicálcico	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54
Premix ³	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50

Calcário	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Antioxidante (BHT) ⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Nutrientes calculados (%)⁵					
Ácido linoleico	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
Amido	21	21	21	21	21
Cálcio	1,45	1,45	1,45	1,45	1,45
Cinzas	12,43	12,43	12,43	12,43	12,43
Energia bruta (kcal/kg)	3762,08	3762,08	3762,08	3762,08	3762,08
Energia digestível (kcal/kg)	2800	2800	2800	2800	2800
Fibra bruta	3,24	3,24	3,24	3,24	3,24
Fósforo total	1	1	1	1	1
Gordura	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24
Lisina	1,88	1,88	1,88	1,88	1,88
Matéria seca	89,50	89,50	89,50	89,50	89,50
Met+Cistina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Proteína digestível	28	28	28	28	28
Proteína bruta	31,29	31,29	31,29	31,29	31,29

¹Argila bentonita. ²Nucleotídeo Ascogen (15% de nucleotídeo purificado). ³Suplemento vitamínico e mineral, composição básica: ácido fólico: 200 mg, ácido pantotênico: 4000 mg, Biotina: 40 mg, Cobre: 2000 mg, Ferro: 12 500 mg, Iodo: 200 mg, Manganês: 7500mg, Niacina: 5000 mg, Selênio: 70 mg, Vitamina A: 1.000.000 UI; Vitamina B1: 1900 mg; Vitamina B12: 3500 mg; Vitamina B2: 2000 mg; Vitamina B6: 2400 mg; Vitamina C: 50 000 mg; Vitamina D: 500 000 UI; Vitamina E: 20 000 UI; Vitamina K3: 500 mg; Zinco: 25 000 mg. ⁴Antioxidante. ⁵Conteúdo de nutrientes calculados usando o software Super Crac Premium®.

3.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água

A temperatura mínima e máxima da água ($26,83 \pm 1,46^\circ\text{C}$ e $28,38 \pm 1,61^\circ\text{C}$) foi aferida diariamente, em ambos os tanques (às 10h 00), com termômetro digital (Aquarium modelo DigTerm; $\pm 0,1^\circ\text{C}$). Quinzenalmente (Mewes et al., 2016), foram mensurados na água os níveis de oxigênio dissolvido ($7,02 \pm 0,17 \text{mg/L}$; Oximêtro digital YSI[®] 550aA), de amônia total ($0,07 \pm 0,03 \text{mg/L}$; Fotocolorímetro Alfakit[®] AT100P), nitrito ($0,16 \pm 0,02 \text{mg/L}$; Fotocolorímetro Alfakit[®] AT100P), pH ($7,05 \pm 0,04$; pHmetro digital Tecnal[®] Tec 5) e a alcalinidade ($39,66 \pm 0,07 \text{mg de CaCO}_3/\text{L}$; Alfakit).

3.4 Manejo reprodutivo

Durante 150 dias, os peixes foram submetidos ao manejo reprodutivo, permanecendo machos e fêmeas separados pelo período de 12 dias (Bombardelli et al., 2009). Após este período os machos foram transferidos para as hapas das fêmeas, onde permaneceram em acasalamento por cinco dias. Posteriormente, as fêmeas foram submetidas aos procedimentos de verificação e coleta de ovos. Nesse processo, foram mensurados o comprimento e o peso dos machos e das fêmeas, por meio de ictiômetro ($\pm 0,1 \text{cm}$) e balança digital de precisão

(Marte[®] AS2000; $\pm 0,01g$), respectivamente. Em seguida, os machos e as fêmeas foram novamente separados. Este procedimento foi realizado durante todo o período experimental.

3.5 Parâmetros reprodutivos

Ao término do período experimental, todos os machos de cada unidade experimental foram sedados por imersão em solução aquosa contendo 100mg de hidróxido de benzocaína/L (Okamura, 2010). Em seguida, os reprodutores foram submetidos à mensuração do peso corporal e à coleta de sêmen por meio de massagem abdominal, no sentido crânio-caudal. (Mewes et al., 2016).

As primeiras gotas de sêmen liberadas foram descartadas para evitar a possível contaminação por urina, muco ou fezes (Khara et al., 2012). O sêmen foi coletado e o volume mensurado em seringas de 1,0mL ($\pm 0,01mL$), (Mewes et al., 2016). Após a coleta, o sêmen foi mantido sob resfriamento (12°C) para posterior realização das análises seminais e espermáticas (Bombardelli et al., 2010). O pH seminal foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando fitas de papel de tornassol (escala de 1-14) (Merck[®]) (Tessaro et al., 2012).

Imediatamente após a coleta, amostras de sêmen foram utilizadas para avaliação dos parâmetros de motilidade espermática pelo *plugin* CASA em software livre (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007). A ativação dos espermatozoides foi realizada em tubos tipo Eppendorf (1,5mL), usando 1 μ L de sêmen e 250 μ L de solução ativadora (água destilada). O sêmen ativado (10 μ l) foi depositado em câmara de Neubauer, coberto com lamínula e levado a microscópio de contraste de fase (Eclipse E200; Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera com capacidade de captura de 100fps (A602fc, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha). O movimento espermático foi avaliado ao longo de 1s, entre o 14º e o 15º segundo após o início da ativação espermática (Mewes et al., 2016). Os parâmetros de configuração do *plugin* CASA instalado no software ImageJ (ImageJ 1.50; National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foram: a,=1 b,=30 c,=100 d,=8 e,=1 f,=10 g,=15 h,=3 i,=1 j,=25 k,=10 l,=15 m,=80 n,=80 o,=50 p,=60 q,=100 r,=943.3962 (Neumann et al., 2017). Os parâmetros avaliados foram a motilidade espermática, a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade média de deslocamento (VMD) e velocidade em linha reta (VLR). Devido à existência de uma alta correlação entre as velocidades espermáticas ($r=0,88$; $r=0,99$; $r=0,94$), os resultados das três velocidades foram agrupados por meio da análise de componentes principais (PCA). O resultado da PCA gerou uma nova variável denominada de

velocidade espermática (Tessaro et al., 2012). Também foram avaliados os parâmetros de retidão, linearidade e balanço dos espermatozoides

Do sêmen liberado de cada reprodutor, 1 μL de sêmen foi diluído e fixado em 1.000 μL de formol salino tamponado. Este material foi utilizado para a posterior mensuração da concentração espermática e do percentual de espermatozoides sem alterações morfológicas. A concentração espermática foi determinada por meio de contagem das células espermáticas em câmara de Hematimetrica de Neubauer (Wirtz e Steinmann, 2006). A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada por meio da diluição de 40 μL do sêmen (previamente fixado) em 2 μL do corante Rosa de Bengala. Em seguida, 20 μL desta solução foram depositados sobre uma lâmina, que foi seca ao ar e coberta por uma lamínula para posterior análise em microscópio óptico em objetiva de 40X. Cerca de 300 espermatozoides foram contados e classificados como normais ou anormais segundo (Rurangwaet al., 2004).

Amostras de sêmen fresco também foram destinadas à avaliação da integridade do DNA dos espermatozoides pelo ensaio cometa, segundo metodologia descrita por Speit and Hartmann (1999), adaptada por Cestari et al., (2004) e Ramsdorf et al. (2009). Assim, 10 μL da solução em análise (sêmen fresco ou eritrócitos) foram diluídos e homogeneizados em 150 μL de soro bovino fetal. Desta solução, 20 μL do homogeneizado foi diluído em 1000 μL de tampão PBS (7,4). Em seguida uma alíquota de 7 μL foi misturada em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Desta mistura, alíquotas foram depositadas sobre lâminas histológicas previamente cobertas com agarose normal (1,5%) e cobertas por uma lamínula para o espalhamento do material, seguida pela refrigeração por cinco minutos para solidificação da agarose. Depois as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, NaOH 200 mM, N-lauril-sarcosinato 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%) por pelo menos 24h, em ambiente escuro à 4°C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (300 mM) e EDTA (200mM), pH>13 por 25 minutos para a desespiralização do DNA e a corrida eletroforética foi realizada em 300mA e 1 V cm^{-1} por 25 minutos. Depois as lâminas foram neutralizadas em 0,4M TRIS, pH 7,5 por 5 minutos (3x). Em seguida as lâminas foram secas e fixadas em etanol 96% por 5 minutos. Para a análise, as lâminas foram coradas com 30 μL da solução de 0,02g/mL de brometo de etídeo e analisadas em microscópio de epifluorescência (Leica DMLS2) em objetiva de 40X.

Foram analisados 100 nucleóides de cada amostra. Os danos foram classificados segundo Collins (1995) com base na migração dos fragmentos (tamanho da cauda), sendo classe 0 = sem dano visível e classe 4 = dano máximo). O escore total dos 100 nucleóides analisados foi obtido multiplicando-se o número de células em cada classe pela classe de dano que variou de 0 (todas não danificadas) a 400 (todas danificadas ao máximo) (Jaloszynski et al, 1999), sendo a equação:

$$ID (ua) = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

(ua) = unidade arbitrária;

N1 – N4 = necleóides nas classes 1, 2, 3 e 4;

Finalmente, foram calculadas as fecundidades absoluta e efetiva conforme as equações a seguir:

(1) *Fecundidade absoluta = (Concentração espermática) x (Volume);*

(2) *Fecundidade efetiva = [(Concentração) x (Volume)] x (Motilidade);*

Fecundidade absoluta = número total de espermatozoides liberados pelo reprodutor;

Fecundidade efetiva = número de espermatozoides móveis liberados pelo reprodutor;

Volume = volume de sêmen liberado pelo reprodutor(mL);

Concentração = concentração espermática no sêmen liberado

(espermatozoides/mL); Motilidade = percentual de espermatozóides móveis.

3.6 Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue

Após a avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos, os peixes foram mantidos separados das fêmeas pelo período de 12 dias. Após este período, seis machos de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionados e anestesiados por imersão em solução aquosa contendo 250 mg de hidróxido de benzocaína/L (Okamura, 2010). Em seguida os peixes foram individualmente medidos, pesados e então, submetidos à coleta de sangue por meio de punção da veia caudal, inserindo o bisel da agulha perpendicularmente à veia caudal, abaixo da linha lateral (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Foram utilizadas agulhas umedecidas em Ácido Etilenodiamino Tetra Acético (EDTA) a 10%. Do sangue coletado, alíquotas foram separadas para avaliação dos parâmetros hematológicos.

A contagem total de eritrócitos por volume de sangue, foi realizada diluindo-se 20µL da amostra em 3,980µL de soro fisiológico 0,8%. Em seguida, o material foi homogeneizado e uma alíquota de 30µL transferida para uma câmara hematimétrica de Neubauer. A contagem

foi realizada em microscópio óptico Nikon E200, em objetiva de 40X. O percentual de hematócrito foi mensurado segundo a metodologia de Goldenfarb et al (1971). Neste caso, um tubo capilar de vidro preenchido por uma alíquota de sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e o percentual de células foi obtido pela leitura em tabela de hematócrito.

A taxa de hemoglobina (concentração de hemoglobina por volume de sangue) foi determinada por meio da metodologia descrita por Collier (1994). Neste caso foi utilizado kit comercial da marca Analisa, com a utilização de padrão de hemoglobina (11,3 g/dL), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro em 540 nm.

Posteriormente, foram determinados os seguintes índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), pelas fórmulas a seguir: $VCM = (\text{Hematócrito} \times 10) / \text{Número de eritrócitos}$; $HCM = (\text{Hemoglobina} \times 10) / \text{Número de eritrócitos}$; $CHCM = (\text{Hemoglobina} \times 100) / \text{Hematócrito}$ (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Ainda, a partir de alíquotas de sangue de cada animal foram feitas duas extensões sanguíneas em lâminas de vidro com extremidades foscas, secas ao ar e à temperatura ambiente. As extensões sanguíneas foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico em objetiva de 100X. A contagem de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (Ranzani-Paiva et al., 2013). A contagem diferencial de leucócitos consistiu em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: linfócitos, neutrófilos e monócitos. A contagem de 2000 células foi realizada no corpo da extensão, percorrendo-se todo o material, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem.

Outras alíquotas de 2,0mL de sangue foram transferidas para tubos de ensaio contendo (EDTA) e submetidas à centrifugação em 3000 rpm por dez minutos. Em seguida, o plasma sanguíneo foi retirado e transferido para microtubos de polietileno de 2mL, os quais foram armazenados a -80°C. Do plasma sanguíneo, foram quantificados os níveis de glicose, cálcio, triglicérides, colesterol, colesterol HDL, fosfatase alcalina, proteínas totais, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Estas análises foram realizadas em analisador bioquímico automático modelo Flexor EL 200, utilizando kits específicos ELI Tech[®] (*Clinical Systems*).

3.7 Parâmetros de crescimento e índices corporais

Imediatamente após a coleta de sangue, os mesmos reprodutores foram anestesiados e eutanasiados por imersão em solução aquosa contendo 250 mg de hidróxido de benzocaína/L (Okamura, 2010), seguido pelo deslocamento da coluna cervical. Em seguida, os reprodutores foram dissecados para obtenção dos pesos do fígado, das gônadas e das vísceras. A partir dos dados biométricos, foram calculados o ganho de peso (g), o ganho de peso diário (g/dia), a conversão alimentar aparente, o índice hepatossomático [%; (peso do fígado/peso corporal)x100], índice gônadossomático [%; (peso dos testículos/peso corporal)x100], o índice viscerossomático [%; (peso das vísceras/peso corporal)x100] e o fator de condição [(peso corporal/comprimento padrão³)x100] (Vazzoler, 1996).

3.8 Composição centesimal

De cada reprodutor eutanasiado, foram obtidas amostras dos testículos, dos fígados, das vísceras e de músculo, as quais foram armazenadas a -20°C para posterior determinação da composição centesimal. Destes tecidos, foram mensurados os teores de umidade e de matéria mineral (AOAC, 1995), a determinação dos níveis de extrato etéreo foi realizada em extrator Ankom XT15, utilizando éter de petróleo como solvente (AOCS, 2009). A determinação do extrato etéreo foi realizada pelo condicionamento das amostras no extrator em sacos filtrantes, mantidos por 70 minutos a 90°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para estufa não ventilada a 105°C por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram condicionadas em dessecador e pesadas. A proteína bruta (N x 6,25) foi determinada pelo método de micro Kjeldahl (método 960.52) da AOAC (1995).

3.9 Análises Histológicas

Dos animais dissecados, foram obtidos o fígado, as gônadas e o intestino de dois machos de cada unidade experimental para avaliação e análise histológica. Estes órgãos foram coletados e em seguida fixados em solução de *Karnowski* aquoso. Posteriormente, o material foi desidratado pela passagem em séries crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, para a obtenção de cortes seriados transversais, com 4µm de espessura.

De cada órgão, foi confeccionada uma lâmina contendo cinco cortes histológicos que foram submetidos à coloração com Hematoxilina – Eosina (H.E.).

Após o processamento histológico, foram realizadas as capturas de imagens em microscópio biológico em objetiva de 40X. O equipamento utilizado para a captura de imagens foi um microscópio Olympus, modelo CX31, acoplado a uma câmara digital modelo Olympus SC30. Dos cortes histológicos provenientes do intestino, foram mensuradas a altura das vilosidades (AV), altura das microvilosidades (AM) de acordo com CHENG et al (2011). Além disso, também foi mensurada a altura da túnica (AT)

Para a avaliação do fígado foram mensuradas as áreas máxima (Amáx), mínima (Amin) e média (AM) (Figura 3) de 200 hepatócitos por animal. Para a avaliação do fígado foi utilizado um escore de vacuolização hepática adaptado de Tessaro (2012). Foram atribuídos valores de 0-3 para a presença de vacúolos. Foi considerado escore = 0 para ausência de vacúolos, escore = 1 para vacuolização reduzida; escore = 2 para vacuolização média e escore = 3 para vacuolização intensa.

Dos testículos foram avaliadas as etapas de desenvolvimento testicular e as fases reprodutivas dos machos (Brow-Peterson et al., 2011). As análises foram realizadas pelo software CellSens Standard (Olympus).

3.10 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Lévène, respectivamente. Após o atendimento dos pressupostos estatísticos, os dados foram submetidos à análise de variância, ao nível de 5% de probabilidade. Em seguida, foi aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados obtidos em percentual foram transformados pela raiz quadrada do arco seno. Os procedimentos estatísticos foram realizados pelo *software* Statistica 7.1[©] (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

4. Resultados

A alimentação dos reprodutores de tilapia do Nilo com as rações contendo 0,25% de nucleotídeos purificados interferiram na espermatogênese e no desenvolvimento testicular, aumentando ($p < 0,05$) o percentual de espermatozóides com a cromatina nuclear integra

(Tabela 2) e ($p < 0,05$) o índice gonadossomático dos reprodutores (Tabela 4). Os demais parâmetros seminais e espermáticos não foram influenciados ($p > 0,05$) pelas rações (Tabela 2).

Apesar das rações não terem influenciado ($p > 0,05$) o crescimento dos reprodutores (Tabela 3), os índices hepatossomático e viscerossomático gonadossomático foram alterados ($p < 0,05$). Os animais alimentados com as rações contendo 0,75% de nucleotídeo apresentaram os menores ($p < 0,05$) índices hepatossomáticos e, todos os reprodutores alimentados com as rações contendo qualquer nível de nucleotídeos apresentaram menores ($p < 0,05$) índices viscerossomáticos (Tabela 4).

Tabela 2 – Parâmetros seminais e espermáticos de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,5	0,75	1,0	
Vol.1 (mL)	1,14±0,56	1,21±0,27	1,05±0,31	0,58±0,70	1,05±0,31	0,33
Vol.2 (mL/kg)	1,33±0,65	1,31±0,40	1,24±0,31	0,65±0,80	1,23±0,50	0,39
Conc.SPZx10 ⁹ (SPZ/mL)	1,43±0,67	1,13±0,96	1,98±0,73	2,04±0,98	1,98±0,70	0,37
Fecund.x10 ⁹ (n° SPZ)	2,03±1,45	1,74±6,03	2,16±1,07	1,93±1,34	1,98±8,02	0,98
Fecund.Efet x10 ⁹ (n° SPZ-Mot)	15,24±10,60	12,14±4,31	16,25±8,01	9,43±9,80	13,95±5,88	0,74
Norm (%)	52,38±3,19	51,57±6,03	51,81±5,28	51,48±5,54	48,05±6,66	0,79
pH seminal	7,96±0,07	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	--
Motilidade (%)	76,25±5,67	70,06±7,80	76,02±3,91	73,53±4,48	69,68±2,25	0,25
VCL (µm/s)	103,87±2,35	97,18±5,89	103,54±3,22	105,36±6,20	101,10±4,42	0,07
VMD (µm/s)	52,81±3,59	50,46±4,97	53,06±3,55	53,45±5,16	52,20±2,56	0,85
VLR (µm/s)	45,74±2,38	43,75±4,36	45,63±3,85	46,03±3,97	45,56±2,01	0,88
VE (µm/s)	64,41±2,81	63,98±2,80	65,46±3,59	65,40±4,92	64,31±2,83	0,95
Retidão (%)	86,63±0,98	87,00±1,51	86,00±1,59	86,47±1,29	87,41±1,00	0,62
Linearidade(%)	44,01±2,11	42,23±3,82	43,86±2,420	44,76±2,13	45,42±1,39	0,37
Balanço(%)	50,61±1,98	50,40±3,84	50,92±2,12	51,76±2,63	51,78±1,35	0,91
SPZ DNA	9,11±5,35b	20,40±6,34a	14,22±6,16ab	12,86±5,67ab	17,13±3,27a	0,03
Integ.(%)						
Índice Frag. DNA	108,67±6,97	101,66±6,79	91,53±7,35	113,52±8,15	95,94±6,16	0,17

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Vol.1: Volume de sêmen liberado; Volume de sêmen liberado/kg de peixe; SPZ: espermatozoides; Conc.SPZ: Concentração total de espermatozoides; Fecund.: Fecundidade; SPZ-Mot: Espermatozoides móveis; Fecund.Efet: Fecundidade efetiva; Norm: Espermatozoides morfológicamente normais; VCL: Velocidade curvilinear; VMD: Velocidade média de deslocamento; VLR: Velocidade em linha reta; VE: velocidade espermática; SPZ DNA Integ.: Espermatozoides com DNA íntegro; Índice Frag. DNA: Índice de fragmentação de DNA espermático.

Tabela 3 – Parâmetros de crescimento de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,50	0,75	1	
PMI (g)	558,70±0,69	537,31±0,73	547,47±0,42	574,17±0,39	548,24±0,87	0,31
PMF (g)	835,34±15,13	779,72±10,12	847,52±13,42	858,70±14,23	848,15±9,98	0,55
GP (g)	276,64±12,16	242,41±14,12	300,05±8,98	284,52±11,58	299,90±13,25	0,38
GPD(g/dia)	2,42±0,33	2,12±0,82	2,63±0,31	2,49±0,26	2,63±0,57	0,38
CI (cm)	30,36±0,65	30,06±0,75	30,14±0,48	30,73±0,41	30,60±1,00	0,44
CF(cm)	35,06±0,87	33,90±1,26	35,32±0,46	35,05±1,12	35,08±1,26	0,26
FC (%)	1,93±0,04	1,99±0,07	1,92±0,04	2,00±0,06	1,95±0,03	0,25
CAA	2,71±0,39	2,68±0,45	2,47±0,18	2,51±0,33	2,73±0,86	0,90

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: PMI: Peso médio inicial; PMF: Peso médio final; GP: Ganho de peso; GPD: Ganho de peso diário; Comprimento inicial; CF: Comprimento final; FC: Fator de condição; CAA: Conversão alimentar aparente.

Tabela 4 – Parâmetros de crescimento de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,50	0,75	1	
IHS (%)	1,99±0,11ab	1,87±0,34ab	1,82±0,16ab	1,76±0,09b	2,13±0,25a	0,02
IVS (%)	6,120,43±a	5,24±0,48b	5,37±0,44b	5,30±0,44b	5,49±0,19b	0,04
IGS (%)	0,68±0,15ab	1,04±0,33a	0,77±0,27ab	0,65±0,09ab	0,53±0,36b	0,03

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: IHS: Índice hepatossomático; IVS: Índice visserossomático; IGS: Índice gonadossomático.

A alimentação dos reprodutores com rações contendo nucleotídeos levou à redução (p<0,05) dos teores de gordura hepática, sendo que os peixes alimentados com 0,25 e 0,50% de nucleotídeos apresentaram os menores teores de gordura no fígado (Tabela 5). Apesar de os teores de gordura das vísceras não terem sido intensamente influenciados pelas rações, pontualmente, os reprodutores alimentados com as rações contendo 0,75% de nucleotídeos apresentaram os menores níveis de gordura visceral (Tabela 5).

Tabela 5 – Composição centesimal de diferentes tecidos de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,5	0,75	1	
	Músculo (%)					
Matéria seca	22,68±1,44	22,40±1,48	22,09±0,52	22,86±0,89	24,09±1,71	0,37
Matéria mineral	1,24±0,89	1,00±0,86	1,69±0,60	1,54±0,33	1,32±0,09	0,86
Extrato etéreo	1,67±1,08	2,21±1,74	2,33±1,45	2,52±1,79	2,33±1,40	0,94
Proteína bruta	20,14±0,59	18,35±2,87	20,87±1,79	18,73±2,06	19,77±1,16	0,34
	Fígado (%)					
Matéria seca	31,10±3,32	28,84±0,65	30,63±2,18	30,20±1,05	30,88±0,60	0,66
Matéria mineral	1,23±0,11	1,08±0,08	0,97±0,14	1,03±0,133	0,99±0,16	0,71
Extrato etéreo	6,61±1,21a	2,80±0,46b	2,87±1,01b	3,72±0,46ab	3,87±0,90ab	0,04

Proteína bruta	11,14±2,29	10,70±1,85	10,98±0,84	11,92±1,01	10,89±1,47	0,83
Testículo (%)						
Matéria seca	15,10±1,42	14,25±2,21	14,79±0,78	14,59±0,91	13,97±2,02	0,86
Matéria mineral	1,37±0,19	1,23±0,17	1,41±0,38	1,30±0,21	1,38±0,33	0,48
Extrato etéreo	1,66±0,40	1,31±0,78	1,30±0,80	1,92±1,10	0,96±0,12	0,56
Proteína bruta	13,86±1,30	14,06±0,74	13,94±2,01	14,34±1,42	14,85±0,89	0,63
Vísceras (%)						
Matéria seca	32,27±2,78	32,61±3,69	33,53±1,80	32,93±1,11	32,95±2,68	0,51
Matéria mineral	1,13±0,08	1,05±0,26	1,25±0,17	1,19±0,16	1,24±0,23	0,29
Extrato etéreo	24,41±4,59	23,89±3,38	25,52±3,90	17,32±3,51	25,90±3,24	0,06
Proteína bruta	9,67±0,65	9,45±0,15	9,44±0,54	9,40±1,23	10,04±0,48	0,32

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os níveis de triglicerídeos plasmáticos dos reprodutores reduziram (p<0,05) de forma diretamente proporcional à inclusão dos nucleotídeos nas rações (Tabela 6). Enquanto isso, o maior nível de inclusão de nucleotídeos (1,00%) nas rações elevou (p<0,05) o nível plasmático de HDL dos reprodutores (Tabela 6). Ainda, os peixes alimentados com as rações contendo 0,50% de inclusão de nucleotídeos apresentaram os maiores valores de glicose plasmática. Os demais parâmetros bioquímicos avaliados no plasma sanguíneo não foram influenciados (p>0,05) pelas rações (Tabela 6).

Não foram observadas diferenças (p>0,05) nos parâmetros hematológicos dos peixes em função das dietas experimentais (Tabela 7). Os níveis do hematócrito apresentaram melhorias nos peixes alimentados com a suplementação de nucleotídeos nas rações, embora não tenham sido influenciados pelas dietas experimentais.

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos do plasma de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,5	0,75	1	
ALAT(UI/dL)	17,10±1,53	17,84±2,50	14,19±4,09	16,12±5,87	15,78±2,09	0,11
ASAT(UI/dL)	17,90±2,08	21,38±3,47	22,00±3,74	22,16±4,07	18,63±1,16	0,15
Calcio (mg/dL)	7,31±0,91	8,43±0,92	8,18±1,62	7,72±1,48	7,48±1,10	0,68
Colesterol (mg/dL)	155,61±15,01	140,20±12,83	141,39±3,32	136,84±15,23	143,56±12,23	0,40
FAL (UI/dL)	60,50±4,14	62,12±11,45	62,37±8,96	62,62±3,54	61,12±7,40	0,99
Glicose (mg/dL)	66,37±8,47b	63,86±4,02b	79,62±2,14a	64,37±7,85b	57,62±3,20b	0,01
HDL (mg/dL)	40,07±8,49ab	39,01±3,52ab	35,18±11,64ab	23,88±9,03b	43,36±8,90a	0,03
Prot (g/dL)	48,51±2,05	47,41±5,54	46,82±3,40	48,04±1,97	48,63±3,65	0,85
Trig (mg/dL)	185,25±17,27a	158,09±14,21ab	158,71±9,12ab	142,70±17,89b	147,32±12,32b	0,02

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: ALAT: Alanina aminotransferase; ASAT: Aspartato aminotransferase; Prot: Proteínas totais; FAL: Fosfatase alcalina.

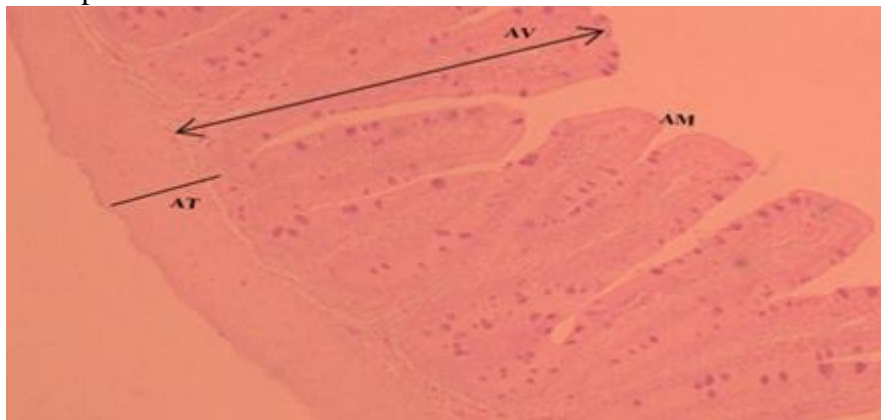
Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,50	0,75	1	
Erit (cel x10 ⁶ /μL)	1,76±3,49	1,94±4,42	1,86±3,73	1,82±5,04	1,83±5,53	0,52
Hemog (g/dL)	8,18±0,33	8,61±0,29	8,34±0,14	8,62±0,63	8,65±0,42	0,38
Hemat (%)	33,17±4,99	34,92±6,58	33,63±4,17	34,22±4,72	36,31±5,00	0,09
VCM (fL)	200,05±19,79	191,90±16,10	183,19±15,46	186,06±14,02	181,94±14,94	0,67
HCM (pg)	50,51±5,56	46,30±2,92	44,68±2,67	46,22±3,48	52,15±7,15	0,10
CHCM (g/dL)	24,34±0,64	25,09±1,20	25,62±0,63	25,36±1,29	25,76±2,27	0,60
Leuc (cel/μL)	51298±16074	69784±27462	53342±10922	59171±27622	50811±24974	0,73
Tromb (cel/μL)	39957±16097	48307±25287	46632±23826	37981±25757	26428±9589	0,61
Linfócitos (%)	75,26±12,13	68,56±16,64	64,22±10,93	64,24±14,47	75,26±4,07	0,68
Neutrófilos (%)	13,47±7,13	20,77±14,52	25,31±10,53	22,14±13,55	15,76±6,15	0,54
Monócitos (%)	11,27±9,39	10,67±3,82	10,47±1,62	13,62±5,56	8,98±3,62	0,71

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Erit: Eritrócitos; Hemog: Hemoglobina; Hemat: Hematócrito; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc: Leucócitos totais; Tromb: Trombócitos totais.

As rações fornecidas aos reprodutores causaram alterações histológicas somente no intestino (Figura 2). Os peixes alimentados com as rações contendo 0,50% de inclusão de nucleotídeos apresentaram um aumento (p<0,05) na altura das vilosidades intestinais (Tabela 8). Os demais parâmetros morfológicos do intestino não foram influenciados pelas rações.

Figura 2 – Intestino de reprodutores de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo nucleotídeos purificados.



AV = altura de vilosidade; AT = altura da túnica; AE = altura dos enterócitos; AM = altura das microvilosidades. Coloração: H.E. Objetiva 40x

Tabela 8 – Morfometria do tecido intestinal de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,50	0,75	1	
AV (μm)	498,22 \pm 96,80b	652,91 \pm 48,37ab	714,42 \pm 142,02a	574,27 \pm 112,65ab	554,48 \pm 24,41ab	0,04
AM (μm)	8,81 \pm 4,11	6,64 \pm 2,91	7,92 \pm 2,27	5,91 \pm 1,55	5,85 \pm 1,03a	0,51
AT (μm)	103,22 \pm 19,31	87,88 \pm 15,73	99,20 \pm 5,22	118,89 \pm 41,73	122,24 \pm 41,08	0,52

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). AV=altura das vilosidades; AE=altura dos enterócitos; AM=altura das microvilosidades; AT=altura da túnica.

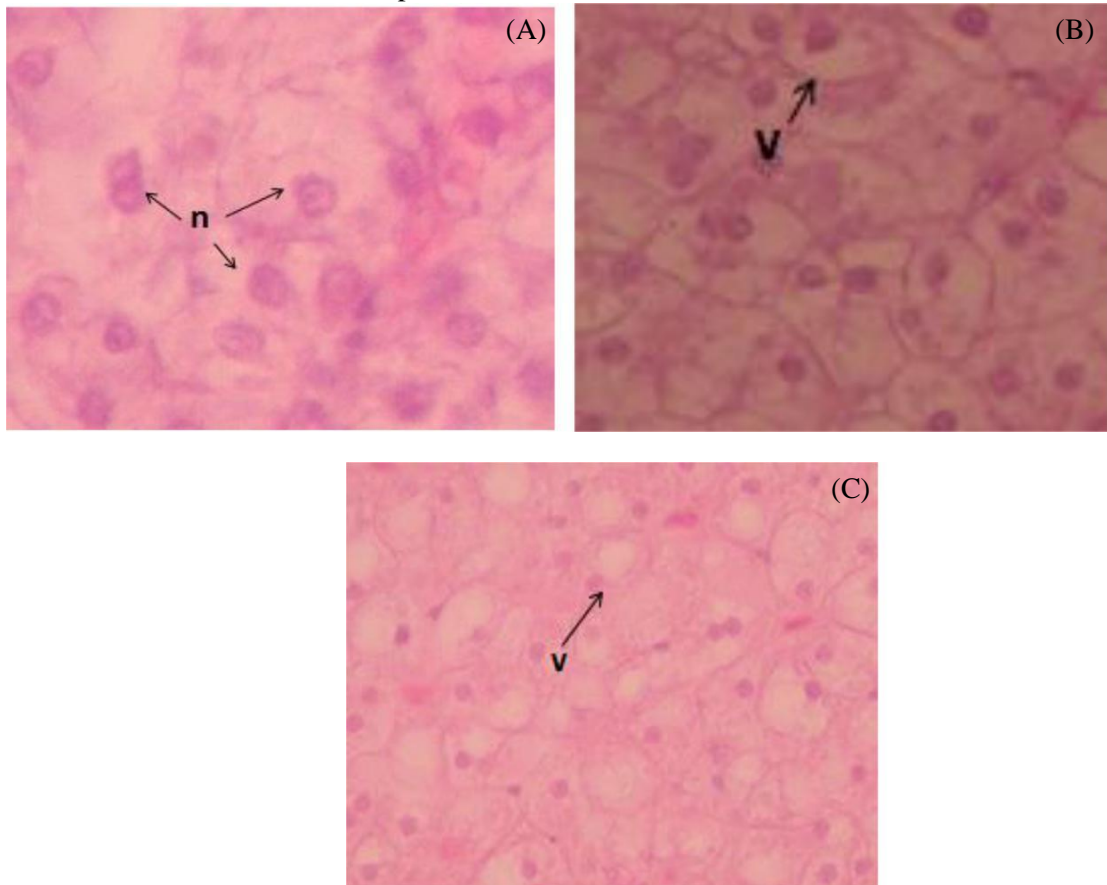
Também não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos parâmetros histológicos do tecido hepático (Tabela 9) e (Figura 3), nem testicular (Figura 4). De um modo geral, os reprodutores estavam em estágio maduro, com os testículos repletos de espermatozoides.

Tabela 9 – Área e grau de vacuolização de hepatócitos de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.

Variáveis	Níveis de nucleotídeos (%)					p
	0	0,25	0,50	0,75	1	
AM (μm^2)	230,13 \pm 11,45	218,29 \pm 33,26	202,77 \pm 52,34	172,95 \pm 23,11	221,66 \pm 27,61	0,15
Amax (μm^2)	448,67 \pm 26,01	456,92 \pm 89,16	447,92 \pm 81,41	374,41 \pm 50,33	495,11 \pm 82,89	0,23
Amin (μm^2)	89,81 \pm 17,78	80,55 \pm 19,61	72,58 \pm 23,06	54,12 \pm 15,18	87,46 \pm 21,89	0,12
GV	0,62 \pm 0,52	1,37 \pm 0,75	0,58 \pm 0,76	0,58 \pm 0,53	0,79 \pm 0,49	0,17

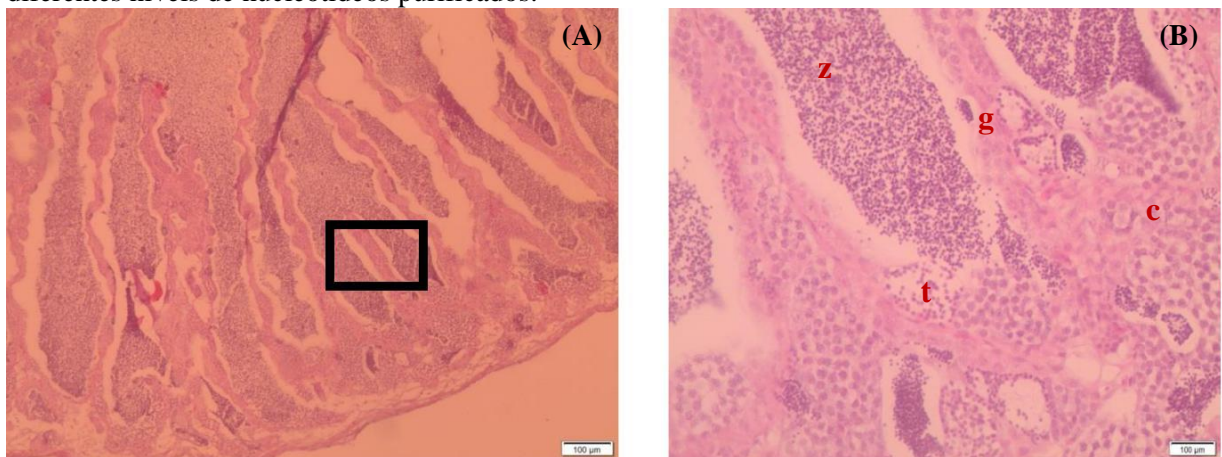
Valores expressos como média \pm desvio padrão. Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). AM = Área média; Amax = Área máxima; Amin = Área mínima; GV = Grau de vacuolização segundo Tessaro et al. (2012).

Figura 3 – Tecido hepático de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.



(A) Aspecto padrão dos hepatócitos da espécie (escore de vacuolização = 0), (n=núcleos); (B) pouca vacuolização (escore de vacuolização = 1), (v = vacúolo); (C) vacuolização intermediária (escore de vacuolização = 2), (v = vacúolo).

Figura 4 – Tecido testicular de reprodutores de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de nucleotídeos purificados.



(A) Aspecto geral do testículo maduro (4x); (B) cistos contendo células em diferenciação (40x) (g = espermatogônias, c =espermatócitos, t =espermátides, z = espermatozoides).

5. Discussão

De uma forma geral, a alimentação dos reprodutores de tilápia com rações contendo nucleotídeos purificados melhorou a condição reprodutiva e interferiu na saúde dos machos de tilápia do Nilo. O aumento do índice gonadossomático dos reprodutores foi associado ao aumento da presença de espermatozoides sem alterações no DNA. De modo geral, o índice gonadossomático determina a progressão da gametogênese em peixes (Barcellos et al 2001) e indica a proliferação do epitélio germinativo (SCHULTZ et al 2010). Este processo normalmente é intenso e exige muito dos reprodutores de tilapia do Nilo, especialmente no que se refere ao processo de multiplicação celular ou reparo celular ou de tecidos (Maggioni et al 2008). Neste processo, os nucleotídeos melhoraram a integridade da cromatina nuclear dos espermatozoides possivelmente pelo processo conhecido como Reparo de Excisão de Nucleotídeos (NER). Esta é uma importante função dos nucleotídeos no organismo, que atua no reparo do DNA danificado (Wood, 1997), na hidrólise dos nucleotídeos em que as bases nitrogenadas são utilizadas no reparo da fita de DNA danificada (SUGASAWA, 2011). Este é um processo mais econômico ao organismo, pois utiliza nucleotídeos dietéticos, sem a necessidade de sintetizá-los *via de novo* ou pela *via de salvamento*, disponibilizando os aminoácidos que seriam destinados à síntese de nucleotídeos para a síntese protéica. O NER basicamente funciona como uma reparação rápida de lesões localizadas na fita transcrita de genes que estão sendo expressos (Vermeulen e Foustero, 2013), isso ocorre pela ação do bloqueio da enzima polimerase II no local da lesão da fita que está sendo transcrita, deslocando a enzima da região lesionada para a ação de reparação (MCKAY e CABRITA, 2013).

Apesar da influência dos nucleotídeos sobre o índice hepatossomático dos reprodutores de tilapia do Nilo, as diferenças sutis no tamanho do fígado parecem não estar relacionadas a fatores deletérios ao metabolismo e à saúde destes animais. Mesmo que o índice hepatossomático seja considerado um importante indicador do estado fisiológico do fígado em função do seu metabolismo (Agostinho et al., 1990), os demais parâmetros avaliados nesta pesquisa não indicam qualquer tipo de dano hepático. Por outro lado, a redução dos níveis de triglicerídeos plasmáticos e de gordura no fígado dos animais alimentados com as rações contendo nucleotídeos é um ponto positivo e muito relevante, especialmente em animais com sobre vida longa como os reprodutores. Isso porque muitas dietas para reprodutores sugerem um adequado desempenho reprodutivo, mas não consideram efeitos deletérios que podem se manifestar à médio ou longo prazo. Um exemplo disso é o

acúmulo de gordura e a consequente ocorrência de vacuolização nos hepatócitos, levando ao aumento do tamanho das células e finalmente à ocorrência de esteatose hepática (TESSARO et al., 2012). O acúmulo de gordura no fígado também pode alterar a função hepática, levando à redução da atividade de enzimas ou regular negativamente os níveis de metabólitos (OPPEN-BERNTSEN., et al 1992) e normalmente está associado positivamente com os níveis de triglicerídeos plasmáticos (CABALLERO et al., 2004),

De modo geral os nucleotídeos são importantes mediadores do metabolismo energético (Gatlin e Li, 2007) e, por consequência, interferem não só na deposição de gorduras, mas também nos seus mecanismos de transporte. Conforme verificado nesta pesquisa, o aumento dos níveis de HDL nos peixes pode estar associado ao efeito que os nucleotídeos exercem sobre o aumento da atividade da lecitina colesterol acil transferase (LCAT) (SANCHEZ-POZO et al. 1995). A atividade desta enzima interfere nas taxas de esterificação do colesterol, utilizando ácidos graxos provenientes da quebra dos triglicerídeos pela LCAT (MORILLAS et al. 1994). Assim, a HDL atua como um importante transportador de colesterol e triglicerídeos dos tecidos periféricos até serem metabolizados no fígado (ECKEL, 2011).

De uma forma geral, a alimentação dos reprodutores com rações contendo nucleotídeos purificados não causaram efeitos deletérios à saúde geral dos peixes. Isso foi corroborado pelos parâmetros hematológicos, que são comumente considerados como indicadores deste estado do animal (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Além disso, apesar de a glicemia ser considerada em alguns casos como indicador de estresse (BARTON e ITAWA, 1991), as alterações verificadas nos animais alimentados com 0,50% de nucleotídeos não representaram prejuízos produtivos ou reprodutivos. Apesar deste efeito, ainda são escassas as informações sobre a atuação direta dos nucleotídeos sobre as alterações de glicose no plasma sanguíneo (CHAGAS, 2010).

Finalmente, o aumento na altura das vilosidades intestinais de animais alimentados com rações contendo nucleotídeos foi um evento esperado, pois isso tem sido relatado em diversas pesquisas. De modo geral, embora os nucleotídeos sejam substâncias que são sintetizadas endogenamente, a suplementação dietética pode ter efeitos benéficos na morfologia intestinal (Barros et al., 2015). No intestino de suínos, normalmente os nucleotídeos estão associados com a recuperação intestinal após a ocorrência de algum tipo de lesão, ao aumento na altura das vilosidades e espessura da parede do intestino, (CARVER e WALKER, 1995) e, aumento da espessura da vilosidade e da superfície da mucosa intestinal (BURRELS et al., 2001). Isso certamente sugere a importância dos nucleotídeos

em tecidos com rápido *turnover* como a mucosa intestinal (HOLEN e JONSSON, 2004).

5. Conclusão

A alimentação dos reprodutores de tilápia do Nilo com rações contendo diferentes níveis nucleotídeos melhoraram os parâmetros reprodutivos e alteraram positivamente o metabolismo dos animais, resultando em uma melhor condição gonadal e espermática, além de um melhor condicionamento hepático.

6. Referências

- AGOSTINHO, A.A., BARBIERI, G., VERANI, J.R. et al. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis áspera* (Agassis, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. **Ciência Cultural**, v. 42, p. 711-714, 1990.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 6 ed. Denver: AOCS, 2009. 1200p.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. **Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International**, 16th ed. Arlington: AOAC International.
- APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 287-296, 2001.
- BARROS, M. M., GUIMARÃES, I. G., PEZZATO, L. E. et al. The effects of dietary nucleotide mixture on growth performance, haematological and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v.46, p. 987-993, 2015.
- BARCELLOS, L.J.G., et al., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen*, a South American catfish. **Aquaculture Research**, v. 32 p. 121-123, 2001.

- BOMBARDELLI, R.A., 2007. Energia digestível para reprodutores de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* L. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- 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-nylo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 1391-1399, 2009.
- BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C.; NATALI, M.R.M. et al. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.39, n.5, p. 941-949, 2010.
- BOSCARDIN, N.R. A produção aquícola brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J.R.; SOTO, D. (Eds.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, p. 27-72, 2008.
- BRABO, M., F; PEREIRA, L., F., S.; SANTANA, J., V. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta Fish Aquature Research**. v. 4, p. 50-58, 2016.
- BROWN-PETERSON, N., ET AL. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science*, v.3, p. 52–70, 2011.
- BURRELLS, C., WILLIAM P.D., SOUTHAGE P.J. et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: Effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, v. 199, p. 171-184, 2001.
- BRANDÃO, F., R.; GOMES, L., C.; CHAGAS, E., C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante praticas de rotina em piscicultura. **Acta. Amaz.** v.36, p. 349-356, 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.

CHAGAS EC. 2010. β -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas. **Tese de Doutorado**. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CABALLERO, M.J., IZQUIERDO, M.S., KJØRSVIK, E. et al.. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases**, vol. 27, p.531–541, 2004.

CABRITA E, ROBLES V, REBORDINOS L. et al. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. **Cryobiology**, v. 50, p. 144-153, 2005

CARVER, J.D., WALKER, W.A., 1995. The role of nucleotides in human nutrition. **Nutritional Biochemistry**. v.6, p.58-72, 1995.

CESTARI, M.M., LEMOS, P.M.M., RIBEIRO, C.A.O. et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, p. 270-274, 2004.

CHAGAS, E., C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R. et al. Suplementos na dieta para manutenção da saúde em peixes. In: Tavares-Dias, M, (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 132-225, 2009.

CHAMPE, P., C.; HARVEY, R., A. 1996. **Bioquímica Ilustrada**. 2. Ed. Porto Alegre. Artes médicas

CHENG, Z., BUENTELLO, A., GATLIN, D.M. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.30, p. 143-147, 2011.

- COLLIER, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medicinal Association Journal**, v.50, p. 550-552, 1994.
- ECKEL, R. H. Metabolic risk for cardiovascular disease. **American Heart Association National Center**, Dallas. 2011.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: FAO, 2016 . 112p.
- FÜLBER, F.M., 2007. Desempenho de três linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases, densidades e níveis de proteína. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Produção Animal)** - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- GALLEGO, V., PEÑARANDA, D.S., MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Comparison of two techniques for the morphometry study on gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa and evaluation of changes induced by cryopreservation. **Theriogenology**, v,77, p. 1078-1087, 2012.
- GATLIN III, D.M., LI, P. Nucleotides, In: Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin III, D.M. (Ed). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. Cromwell Press, p. 193-209, 2007.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p. 35-39, 1971.
- GONZÁLEZ-VECINO, J.L., CUTIS, C.J., BATTY, R.S. et al. 2004. Short e long term effects of a nucleotide enriched broodstock diet on the reproductive performance of haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). **Abstract Book of 11th International Symposium on nutrition and Feeding in Fish**. Phuket. Thailand, 99.
- GRIMBLE, G.K., WESTWOOD, O.M.R. 2000. Nucleotides. In: German, J.B., Keen, C.L (Ed). **Nutrition and Immunology: Principles and pratice**. Totowa, NJ, USA. 135-144.

- HOLEN, E.; JONSSON, R. Dietary nucleotides and intestinal cell lines: 1. Modulation of growth. **Nutrition Research**. v.24, p.197-207, 2004.
- WILSON-LEEDY, J.G., INGERMANN, R.L. Desenvolvimento de um novo sistema CASA baseado em software livre para caracterização de parâmetros de motilidade dos espermatozoides do peixe-zebra. **Theriogenology**, v.67, p.661-672, 2007.
- KHARA, H., et al. The effect of cations on sperm motility performance and fertilizing ability of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Acta Veterinaria**, v. 62, p. 599-609, 2012.
- KANUGA, M.K., ET AL. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology** v. 77, p. 916-925, 2012.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M., 2005. **Principles of Biochemistry**, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
- LI, P., GATLIN III, D. M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge 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 World Aquaculture Society**. v.38, p. 281-286, 2007.
- 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.
- KHAW, H.L., PONZONI, R.W., DNTING, M.J.C. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. **Aquaculture**. v. 275, p. 64-69, 2008.

- KROKAN, H.E., KAVLI, B., SLUPPHAUG, G. 2004. Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. **Journal of molecular medicine**, v. 82, p. 280-297, 2004.
- KUBITZA, F., CAMPOS, J.L. Desafios para a consolidação da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**. v.15, p.14-22, 2005.
- MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; MARQUEZ, J.A. et al., 2008. Influência da proteína sobre a reprodução animal: uma revisão. **Campo Dig**. v.1, p. 105-110, 2008.
- MEN, K., AI, Q., MAI, K. et al. 2014. Effects of dietary corn gluten meal on growth, digestion and protein metabolism in relation to IGF-I gene expression of apanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**. v.428-429, p. 303-309, 2014.
- MCKAY, B.C., CABRITA, M.A. Arresting transcription and sentencing the cell: the consequences of blocked transcription. **Mechanism of ageing and development**. v. 134, p. 243-252, 2013.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.
- MEURER, F., BOMBARDELLI, R.A., HAYASHI, C. et al. Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. **Acta Scient**. v. 27, p.81-85, 2005
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BARBERO, L.M.; SANTOS, L.D.; BOMBARDELLI, R.A.; COLPINI, L.M. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 791-794, 2008.
- MEWES, J.K.; MEURER, F.; TESSARO, L. et al. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. **Aquaculture**, v. 465, p.164-171, 2016.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**: Brasil-2011. Brasília, 2013, 129p.

NAVARRO, R.D., MALDONADO, I.R.S.C., MATTA, S.L.P. et al. Associação do nível de energia digestível no comprimento total, pesos das gônadas e índice gonadosômico de fêmeas de Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) em estágio pós-larval. **Revista Brasileira de Saúde de Produção Animal**. v11, p.242-251, 2010.

NEUMMANN, G., JÚNIOR, J.J.B., SANCHES, P.V. et al. Contribution of the CASA system, based on open source software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based approaches. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 46, p. 560-568, 2017.

OKAMURA, D., ARAUJO, F.G., ROSA, P.V. et al. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 971-976, 2010.

OPPEN-BERNTSEN, D.O., GRAM-JENSEN, E., WALTHER, B.T. 1992. Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to estradiol-17-beta, **Journal of Endocrinology**, v. 135, p.293-302, 1992.

PARRA, J.E.G.; RADÜNZ NETO, J., VEIVERBERG. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas de jundiá alimentadas com diferentes fontes protéicas. **Archivos Zootecnia**. v.59, p. 255-265, 2010.

PENG, M., XU, W., AI, Q. et al. Effects of nucleotide supplementation on growth, immune responses and intestinal morphology in juvenile turbot fed diets with graded levels of soybean meal (*Scophthalmus maximus L.*). **Aquaculture**. v. 392-395, p. 51-58, 2013.

PENMAN D.J., McANDREW B.J. Genetics for the management and improvement of cultured tilapias. In: Beveridge M.C.M., McAndrew B.J. (eds) *Tilapias: Biology and Exploitation*. **Fish and Fisheries Series**, vol 25, 2000.

- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1595-1604, 2002.
- RAMSDORF, W.A., GUIMARÃES, F.S.F., FERRARO, M.V.M. et al. Establishment of experimental conditions of preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v.673, p.78-81, 2009.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., Benites de Pádua, S., Tavares-Dias, M., Egami, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. (Ed) UEM, Maringá, 2013.
- RIBEIRO, R.P. Espécies exóticas. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. (Eds.). **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001, p. 91-121.
- ROSENFELD, G. Panchromic stain for hematology and clinical cytology. A new combination of May-Grünwald and Giemsa components in a single fast-working color. Mem. **Instituto Butantan**, v.20, p.329-334, 1947.
- ROSSI, P., XAVIER, E.G., RUTZ, F., 2007. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.13, 5-12, 2007.
- RURANGWA, E., KIME, D.E., OLLEVIER, F. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004.
- SANCHES, E.A., et al., 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, p. 1114-1122, 2013.
- SANCHEZ-POZO, A., RAMIREZ, M., GIL, A. et al. Dietary nucleotides enhance plasma lecithin cholesterol acyl transferase activity and apolipoprotein A-IV concentration in preterm newborn infants. **Pediatrics Research**, v. 37, p. 328–333, 1995.

- SCHLIMME, E.; MARTIN, D.; MEISEL, H. Nucleosides nucleotides: natural bioactive substances in milk na colostrum. *Brit. J. of Nutr, Cambridge*, v.84 Suppl.1, p.S59-S68, 2000.
- SCHULTZ, R. W. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, v.165, p. 390-411, 2010.
- SILVA, F.V.; ALMEIDA, N.L.S.; VIEIRA, J.S. et al. Características morfométricas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias do nilo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1407-1412, 2009.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. **DNA Repair Protocols**. v. 113, p.203–212, 1999. New Jersey: Humana Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443422>>.
- SUGASAWA, K. 2011. Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. **Biochemistry**. v,76, p. 16-23, 2011.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Ed. Eletrônica e Arte Final, 2004. 144p.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T.; SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.
- TESSARO, L., et al. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*, v.326, p, 74-80, 2012.
- TOMAZELLI JÚNIOR, O., PHILIPPI, L.M.N. O brasileiro é um consumidor de pescados?. **Panorama da Aqüicultura**. v.16, p. 39-45, 2006.

- UAUY, R., 1994. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 57S-159, 1994.
- VAZZOLER, A.E.A.M., 1996. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 169p.
- VERMELUEN, W., FOUSTERI, M. Mammalian transcription-coupled excision repair. **Could Spring Harbor perspective in biology**, v.5, a012625, 2013.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Review**, v.77, p.591-625, 1997.
- WIRTZ S.; STEINMANN P., 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.1896-1902, 2006.
- WOOD, R. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. **Journal of Biology Chemistry**, v.272, p.23465-23468, 1997.
- pois abre a possibilidade de inclusão de ingredientes de origem vegetal na dieta (PEZZATO et al., 2002).
- 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* and *Oreochromis aureus*. **Animal Nutrition**. v.1, p. 244-251, 2015.
- YIN, H.C., HUANG, H., YANG, D.H . et al. Effects of yeast nucleotide on growth performance, serum immune index and muscle composition of *Ancherythroculter nigrocauda*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. v.14, p. 646-659, 2014.
- ZHAO, H., CAO, J., HUANG, Y. et al. 2015. Effects of dietary nucleotides on growth, physiological parameters and antioxidant responses of Juvenile Yellow Catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Research**. v. 48, p.214-224, 2015.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: Aquabio, 2004, p. 239-266.