



MIRIAN SILVIA BRAZ

**AVALIAÇÕES DE EFEITOS DECORRENTES
DE ALTERAÇÕES ENERGÉTICAS DA DIETA
EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
EM PERÍODO REPRODUTIVO**

LAVRAS – MG

2016

MIRIAN SILVIA BRAZ

**AVALIAÇÕES DE EFEITOS DECORRENTES DE ALTERAÇÕES
ENERGÉTICAS DA DIETA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*) EM PERÍODO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Priscila Vieira Rosa

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Braz, Mirian Silvia.

Avaliações de efeitos decorrentes de alterações energéticas da
dieta em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em período
reprodutivo / Mirian Silvia Braz. – Lavras : UFLA, 2016.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Priscila Vieira Rosa.

Bibliografia.

1. Peixe. 2. Nutrição. 3. Histologia. 4. Leptina. 5. Hematologia.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MIRIAN SILVIA BRAZ

**AVALIAÇÕES DE EFEITOS DECORRENTES DE ALTERAÇÕES
ENERGÉTICAS DA DIETA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*) EM PERÍODO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de abril de 2016.

Dra. Josilene Nascimento Seixas	DAS/UFLA
Dr. Luis David Solis Murgas	DMV/UFLA
Dra. Luciana de Paula Naves	FETA/UNIFENAS

Dra. Priscila Vieira Rosa
Orientadora

**LAVRAS – MG
2016**

Aos meus queridos pais, Carlos e Salvina

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra, glória e louvor. Ábba, muito obrigada pela vida e por esse presente, por todas as oportunidades, por estar sempre comigo e por me proteger e abençoar todos os dias.

À minha abençoada família, meus amados pais, Carlos e Salvina, e meu querido irmão Rodrigo, minha fortaleza e refúgio, minha eterna gratidão.

O meu agradecimento especial às instituições e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Lavras (UFLA) que possibilitou o desenvolvimento do mestrado e ao coordenador Prof. Dr. Marcio Gilberto Zangeronimo, pela atenção e por todos os ensinamentos. Meu muitíssimo obrigada!

Ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e ao Departamento de Zootecnia (DZO) da UFLA pela estrutura fornecida para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido. Meu muitíssimo obrigada!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Priscila Viera Rosa, pela paciência de uma verdadeira educadora, oportunidade, dedicação, comprometimento, parceria, incentivo, proteção e ajuda quando mais precisei. Meu muitíssimo obrigada!

Aos membros da banca Profa. Dra. Josilene Nascimento Seixas, Profa. Dra. Luciana de Paula Naves e Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, por aceitarem meu convite, pela análise crítica e pelo enriquecimento desse trabalho. Meu muitíssimo obrigada!

Aos queridos amigos e amigas que estiveram ao meu lado, em especial a Gracielle, Gislane, Renata, Aline, Tássia, Adriana e Maria Salete e a meu

querido amigo Leonardo, pela amizade sincera, carinho, pelos conselhos e incentivos sempre.

Às minhas queridas irmãs de coração, Mariana, Anaise, Marseile, Marilane e Bruna, pela amizade, pelo carinho e por fazerem parte de muitos momentos felizes.

À querida Nayara Pereira, meu agradecimento especial, pela amizade, dedicação e pela enorme colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório, do NAQUA e da Piscicultura, Tamira, Renan, Raquel, Carolina, Hortência, Jady e Matheus que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos anjos, que me ajudaram com as análises, Luciana de Paula Naves, Josi Nascimento Seixas, Aline de Assis Lago e Renata Mauri, minha eterna gratidão, eu não conseguiria sem a ajuda de vocês, muitíssimo obrigada pela atenção e cuidado.

À Dra. Marinez Moraes de Oliveira pelo incentivo, colaboração, pela amizade e por fazer parte deste trabalho.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial às amigas muito queridas Yuly Andrea Caicedo Blanco e Adriana Brasil Ferreira Pinto, pela amizade, companheirismo, carinho e por fazerem parte de muitos momentos felizes.

À querida Profa. Dra. Adriana Mello Garcia, pelo carinho de mãe, por ser referência como pessoa e educadora, na maior e melhor acepção da palavra, pela enorme generosidade comigo, sempre. A você, querida, minha eterna gratidão e todo o meu carinho que é imenso!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho tão importante para mim, apesar de não poder agradecer a cada um individualmente, sou muitíssimo grata a todos!

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e ainda mais alegre ainda no meio da tristeza!”

João Guimarães Rosa

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos de níveis de energia digestível sobre parâmetros hematológicos, histologia de fígado e as concentrações de leptina na gordura visceral, fígado, ovário e plasma em fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da variedade UFLA em primeiro ciclo reprodutivo. Um número total de 60 reprodutores de tilápia do Nilo; 45 fêmeas e 15 machos com peso médio de $79,17 \pm 15,12$ g e $82,6 \pm 10,98$ g, respectivamente, foram utilizados em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo quatro peixes por repetição. Os peixes foram selecionados, identificados com microchips e distribuídos nos tanques na proporção de um macho para três fêmeas. Os peixes foram alimentados durante 60 dias com dietas isoproteicas (38%) e com cinco níveis de energia digestível (3.200, 3.400, 3.600, 3.800 e 4.000 kcal/kg de ração). O sangue foi coletado por punção da veia caudal com seringa contendo EDTA e utilizado para os esfregaços sanguíneos, hematócrito, contagem total de hemácias, trombócitos e leucócitos, contagem diferencial de leucócitos, determinação da glicose e da proteína plasmática total. A quantificação dos níveis de leptina no plasma e nos tecidos foi realizada por kit colorimétrico pela técnica de ELISA. Análise histológica convencional por hematoxilina e eosina (HE), avaliação de triglicérides com a coloração de Sudan III e de glicogênio com ácido periódico de Schiff (PAS) foram realizadas no tecido hepático. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores hematológicos, de glicose e proteína total no plasma, no entanto, foi verificada trombocitopenia em todos os peixes do experimento. As concentrações de leptina encontradas na gordura visceral dos peixes alimentados com a dieta de 3.200 kcal/kg foram mais altas comparadas a outras dietas experimentais ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nas concentrações de leptina (ng/ml) encontradas no ovário e no fígado. O kit de ELISA utilizado não detectou concentrações de leptina no plasma. As lesões microscópicas mais graves no parênquima hepático, vacuolização citoplasmática, infiltração de células inflamatórias, necrose e congestão de vasos sanguíneos, as maiores porcentagens de inclusões lipídicas no parênquima hepático ($p < 0,05$) e os maiores diâmetros (μm) das gotículas lipídicas ($p < 0,05$) foram observados nos peixes que receberam dietas com 3.600, 3.800 e 4.000 kcal/kg. Diante disso, sugere-se o nível de energia digestível de 3.400 kcal/kg nas dietas para tilápia fêmea em período reprodutivo.

Palavras-chave: Peixe. Nutrição. Histologia. Leptina. Hematologia.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of digestible energy levels for hematology parameters, liver histology and leptin concentrations in visceral fat, liver, ovary and plasma in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), UFLA strain in its first reproductive cycle. A total of 60 Nile tilapia broodstock; 45 females and 15 males with an average weight of 79.17 ± 15.12 g and 82.6 ± 10.98 g, respectively, were used in a completely randomized design with five treatments and three replications, being four fishes by repetition. Fish were selected, identified with microchips and distributed in tanks in the ratio of one male to three females. The fish were fed for 60 days with isoproteic diets (38%) containing five digestible energy levels (3,200; 3,400; 3,600; 3,800 and 4,000 kcal/kg diet). The blood was collected by puncture of the tail vein with syringe containing EDTA and used for blood smears, hematocrit, total count of red blood cells, thrombocytes and leukocytes, differential leukocyte count, determination of glucose and total plasma protein. Quantification of leptin in the plasma and tissues was performed by colorimetric ELISA kit. Conventional histological analysis by hematoxylin and eosin (HE), evaluation of triglycerides with the color of Sudan III and glycogen with periodic acid-Schiff (PAS) were performed in liver tissue. No significant difference was observed ($p > 0.05$) in hematological values, glucose and total protein in plasma, however, thrombocytopenia was observed in all experimental fish. Leptin concentrations found in the visceral fat in fishes fed with diet 3,200 kcal/kg were higher compared to the other experimental diets ($p < 0.05$). There were no differences ($p > 0.05$) in leptin concentrations (ng/ml) in ovarian and liver. The ELISA technique used not detected leptin concentrations in plasma. The most severe microscopic lesions in the hepatic parenchyma, cytoplasmic vacuolation, inflammatory cell infiltration, necrosis, and congestion of blood vessels, the highest rates of lipid inclusions in hepatic parenchymal ($p < 0.05$) and larger diameters (μm) of lipid droplets ($p < 0.05$) in liver were observed in the fish fed diets with 3,600; 3,800 and 4,000 kcal/kg. Therefore, it is suggested that the digestible energy level of 3,400 kcal/kg in diet for Nile tilapia female in reproductive period.

Keywords: Fish. Nutrition. Histology. Leptin. Hematology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Leptina em ng/ml no extrato de gordura visceral (A), fígado (B) e ovário (C) de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia.....	32
Figura 2	Inclusão lipídica (%) (A) e diâmetro médio (μm) das gotículas lipídicas (B) no parênquima hepático de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia.....	36
Figura 3	Fotomicrografia do parênquima hepático de fêmea de tilápia do Nilo.....	38
Tabela 1	Ingredientes das dietas experimentais.....	24
Tabela 2	Composição aproximada das dietas experimentais.....	25
Tabela 3	Prevalência média (%) das alterações histológicas observadas em fêmeas de tilápia do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia.....	35
Tabela 4	Parâmetros hematológicos e bioquímicos (\pm desvio padrão) de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina e Eosina
MM	Melanomacrófago
PAS	Ácido Periódico de Schiff
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SIGLAS

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Gramma
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
l	Litro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
µm	Microlitro
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Energia em dietas para peixes no período reprodutivo.....	14
2.2	Leptina.....	17
2.3	Aspectos morfofuncionais do fígado.....	18
2.4	Avaliação hematológica em peixes.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Peixes e condições de manutenção.....	22
3.2	Dietas experimentais e delineamento experimental.....	23
3.3	Análise hematológicas e bioquímicas (glicose e proteína total).....	26
3.4	Determinação da leptina na gordura visceral, fígado, ovário e plasma.....	26
3.5	Avaliação histológica e morfométrica do tecido hepático.....	27
3.6	Análises estatísticas.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
	Determinação da leptina na gordura visceral, fígado, ovário e plasma.....	31
4.1	e plasma.....	31
4.2	Avaliação histológica e morfométrica do tecido hepático.....	33
4.3	Avaliação hematológica e bioquímica (glicose e proteína total).....	39
5	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresce no mundo. As tilápias, incluindo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), constituem o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura mundial e o primeiro na aquicultura nacional (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). Essa espécie destaca-se por apresentar rápido crescimento, rusticidade, carne com boas características organolépticas e maturidade sexual precoce.

No Brasil, segundo estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013) a aquicultura continental produziu 544.490 toneladas de pescado no ano de 2011. A produção de tilápia representou 43,1% da produção de peixes, com um montante de 169.306 toneladas no ano de 2013 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). Nesse sentido, o período reprodutivo é muito importante para a criação de tilápia, uma vez que, sendo a espécie mais cultivada no Brasil, há uma maior demanda de alevinos para suprir a cadeia produtiva.

Existem fatores nutricionais que interferem nas características reprodutivas, como o nível de energia da ração. O metabolismo da reprodução é muito complexo e envolve a modulação de todo o organismo. Essa modulação ocorre também a nível cerebral, via leptina, que é um hormônio chave da homeostase energética; e também no fígado, órgão importante para o metabolismo de nutrientes e que, para os peixes no período reprodutivo, está produzindo vitelogenina, fonte de lipídios e proteínas, que será exportada do fígado para o ovário, nutrindo assim, o embrião.

Em contrapartida, a histologia do fígado é uma ferramenta que permite avaliar as disfunções teciduais que poderiam ser provocadas por um desbalanço nutricional, uma vez que, dietas com alto teor energético podem causar esteatose hepática, que é o acúmulo citoplasmático anormal de lipídios. Outra ferramenta importante, para monitorar a influência das dietas e se as condições ambientais estão produzindo espécies saudáveis, é a hematologia. Essa técnica de diagnóstico possibilita analisar as condições de defesa e a resposta dos peixes frente aos desafios de forma eficaz e de baixo custo. Diante disso, objetivou-se avaliar como dietas com diferentes níveis de energia podem influenciar parâmetros hormonais (leptina), histológicos de fígado e hematológicos em tilápias do Nilo no período reprodutivo.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Energia em dietas para peixes no período reprodutivo

O funcionamento adequado dos processos fisiológicos e bioquímicos ocorre, em decorrência do suprimento de energia, que o peixe adquire do alimento ingerido ou de suas reservas corporais (PEZZATO et al., 2004; PORTEZ; FURUYA, 2012). Dessa forma, a exigência energética é frequentemente utilizada como o ponto de início para a formulação das dietas, servindo de base para a concentração de outros nutrientes.

Os carboidratos e lipídios são as principais fontes de energia na dieta dos peixes, pois melhoram a eficiência da utilização da proteína. Os carboidratos são frequentemente usados, apesar de os níveis de inclusão desse nutriente não serem estabelecidos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011); a sua incorporação na dieta em níveis corretos contribui para o processo de extrusão,

além de ser uma fonte energética acessível em relação a lipídios e proteínas (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005).

Os lipídios são as principais fontes de energia utilizadas na alimentação de peixes, principalmente carnívoros, para crescimento, reprodução e natação (TOCHER, 2003); além de disponibilizarem uma quantidade importante de ácidos graxos essenciais. As tilápias aproveitam bem os lipídios e carboidratos como fontes de energia. Esses nutrientes, em níveis adequados, possibilitam preservar a proteína dietética para o crescimento (KUBITZA, 2011) ou reprodução, podendo, ainda, reduzir a excreção de nitrogênio e melhorar a qualidade da água de criação (MONTANHINI NETO; OSTRENSKY, 2015). O efeito poupador de proteína com a adição de carboidratos e lipídios na dieta foi observado em alevinos de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (BORBA, FRACALOSSO; PEZZATO, 2006).

O desequilíbrio das fontes de energia não proteicas na dieta, e/ou seus níveis de inclusão, podem ter efeito direto sobre o desempenho e composição corporal dos peixes (ERFANULLAH, 1998), por isso, é necessário à determinação da concentração energética mais adequada para as diferentes espécies em diferentes períodos de vida, como na reprodução.

O período reprodutivo é uma fase exigente de muitos organismos, pois recursos precisam ser desviados do crescimento somático para o sucesso da reprodução. El-Sayed e Teshima (1992) avaliaram a relação proteína/energia em dietas para tilápias em crescimento; no entanto, não há muitas informações sobre o efeito dessa relação na dieta para tilápias em reprodução. O melhor desempenho reprodutivo de fêmeas de tilápia do Nilo foi obtido quando a ração continha 40% de proteína e 3988 kcal/kg de energia bruta (EL-SAYED; KAWANNA, 2008).

O desempenho reprodutivo e zootécnico de tilápias do Nilo fêmeas alimentadas, por 93 dias, com rações contendo 35% de proteína bruta e 2.700,

2.950, 3.200, 3.450 e 3.700 kcal/kg de energia digestível não foi influenciado pelos níveis energéticos das rações obtidos pela inclusão de óleo de soja. Nesse trabalho, os autores apenas verificaram o aumento do tempo de sobrevivência das larvas ao jejum e a deposição de lipídio hepática diretamente proporcional aos níveis de energia digestível das rações (BOMBARDELLI et al., 2009).

Tessaro et al. (2014) avaliaram os efeitos de diferentes níveis de energia da dieta sobre o desempenho reprodutivo e animal e histologia de fígado e ovário de jundiá (*Rhamdia quelen*). Os peixes foram alimentados durante 210 dias com dietas, contendo 30% de proteína bruta e 2.849, 3.100, 3.351, 3.599 e 3.850 kcal/kg de ração. A energia das dietas não afetou os desempenhos, reprodutivo e animal; e vacúolos citoplasmáticos nos hepatócitos foram observados nos níveis mais elevados de energia. Assim, os autores recomendam a utilização de dietas com 30% proteína bruta e 2.849 kcal/kg de ração sem perdas reprodutivas ou de desempenho para fêmeas de jundiá.

As exigências nutricionais durante a fase reprodutiva diferem das outras etapas de desenvolvimento, como larvas, juvenis e engorda. Para o crescimento e desenvolvimento embrionário dos peixes, todos os componentes nutricionais devem estar presentes no interior do ovo (NASCIMENTO, 2010). Assim, estudos têm enfatizado a importância da nutrição de reprodutores, com nutrientes de alta qualidade, para melhorar a produção das espécies cultivadas, principalmente no início do desenvolvimento gonadal e no período vitelogênico (COWARD; BROMAGE, 2000).

A função reprodutiva requer adequada nutrição, uma vez que a deficiência calórica ou ingestão excessiva de nutrientes podem estar associadas a distúrbios da reprodução. Os processos fisiológicos implicados na reprodução de peixes, como a diferenciação das gônadas, gametogênese e liberação de gametas, são regulados por fatores endócrinos ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ZOHAR et al., 2010).

2.2 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico com importante papel na homeostase do metabolismo energético em longo prazo, controle do apetite e regulação do peso corporal (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; KLOK; JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007; MARGETIC et al., 2002). Também está envolvida em diversos processos fisiológicos, como a reprodução, resposta imune, estresse, hematopoiese, angiogênese e remodelação óssea (COPELAND et al., 2011).

A leptina é secretada em proporção direta as reservas de gordura corporal e, dessa forma, sinaliza o estado nutricional para o sistema nervoso central, a partir de vias anorexigênicas (KLOK; JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007). Quando há tecido adiposo abundante, sua secreção é estimulada e o hormônio se dirige para o hipotálamo, onde reduz a ingestão de alimentos pela estimulação dos neurônios POMC (pró-opiomelanocortina) e CART (transcritos regulados pela cocaína e anfetamina) e inibição de neurônios NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (peptídeo relacionado com agouti). A sequência inversa ocorre quando há pouca reserva de gordura corporal, em que, a secreção de leptina é diminuída e o consumo de alimentos aumentado (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A leptina é produzida, primariamente, pelo tecido adiposo branco nos mamíferos e liberada no sangue (ZHANG et al., 1994). Nos peixes, o fígado, e não o tecido adiposo, parece ser o principal tecido secretor de leptina (DOUROS et al., 2014; GORISSEN et al., 2009; KUROKAWA; MURASHITA, 2009; KUROKAWA; UJI; SUZUKI, 2005) e a sua função e regulação são em grande parte desconhecidas (COPELAND et al., 2011). Alguns pesquisadores relataram que a leptina age nos peixe de maneira semelhante a nos mamíferos (KLING et al., 2009), enquanto outros relataram um papel inverso da leptina (MOEN; FINN, 2013). Mesmo com a conservação dos efeitos anorexígenos (WON et al.,

2012) a ação da leptina nos peixes parece divergir significativamente daquelas relatadas em mamíferos. Isso compreende, ações hiperglicêmicas durante estresse agudo hiperosmótico em tilápia (BALTZEGAR et al., 2014) e a síntese e secreção elevada de leptina durante períodos de jejum, e diminuição com a alimentação em salmão do Atlântico (TROMBLEY et al., 2012).

Diferenças importantes na estrutura primária da leptina entre mamíferos e teleosteos sugere possíveis diferenças na função (LONDRAVILLE et al., 2014). Estudos recentes têm indicado papel anorexígeno da leptina em peixes e, portanto, esteja provavelmente implicada na regulação da homeostase energética (FUENTES et al, 2012; LI et al., 2010; MURASHITA et al., 2011). No entanto, a relação entre o nível de energia e a leptina não está evidentemente definida nos peixes (TINOCO et al., 2012).

2.3 Aspectos morfofuncionais do fígado

O fígado exerce funções fisiológicas importantes no metabolismo dos lipídios, carboidratos, ácidos biliares, bilirrubina, xenobióticos, síntese de proteínas, função imune e produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal (COWARD et al., 2002; CULLEN, 2009; SARAIVA, 2006). No metabolismo dos lipídios, o fígado está envolvido na produção e degradação dos triglicerídeos, colesterol, fosfolipídios e lipoproteínas. Já no metabolismo da glicose, esse órgão regula as concentrações plasmáticas de glicose, após a alimentação armazenando-a na forma de glicogênio ou ácido graxo, mantendo assim o equilíbrio energético (CULLEN, 2009).

O fígado da tilápia do Nilo é um órgão grande com dois lobos; o lobo esquerdo é maior e se distribui ao longo de quase toda a cavidade corporal. A vesícula biliar, de forma arredondada, é bem desenvolvida. Histologicamente, o fígado é constituído por hepatócitos em cordões anastomosados dispostos em

duas camadas celulares rodeados pelos sinusóides, não apresentando lóbulos (VICENTINI et al., 2005). Além disso, estão difundidos, nesse parênquima, os ductos biliares, normalmente localizados próximos à veia porta e o tecido pancreático exócrino intra-hepático (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007; VICENTINI et al., 2005).

A histologia é uma ferramenta importante para avaliar a função hepática. Alterações morfológicas como depósitos anormais podem induzir disfunções nesse órgão e/ou indicar mudanças. Discreto grau de vacuolização é normalmente encontrado no parênquima hepático, pois os peixes, assim como as aves, não apresentam o vaso ou ducto lacteal, presente na lâmina própria da vilosidade intestinal dos mamíferos. Pelo ducto lacteal, os lipídios absorvidos pelos enterócitos são carreados diretamente para o fígado via sistema porta, por isso os peixes possuem maior capacidade de acúmulo lipídico no fígado (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011). Além disso, o fígado dos peixes em período reprodutivo está em acentuado metabolismo para a produção de vitelogenina (COWARD et al., 2002; HIRAMATSU et al., 2015; KIM; TAKEMURA, 2002).

A exposição a agentes estressores, em longo prazo, predispõe disfunção hepática que pode causar alterações microscópicas e macroscópicas, possivelmente pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos (BOLLA, NICOLAISEN, AMIN, 2011). A formulação de dieta inadequada pode causar disfunção metabólica e causar esteatose hepática, considerada uma condição patológica (TUCKER JÚNIOR; LELLIS; VERMEER, 2001). Sabe-se que vários fatores podem causar essa condição, como a utilização de dietas ricas em lipídios (FERRI et al., 2011; MORAIS et al., 2001). No entanto, o acúmulo de lipídios no fígado pode ser uma adaptação fisiológica relacionada ao período de vida, como a reprodução (CRAIG et al., 2000).

A esteatose hepática aparece como vacúolos claros, de contornos bem definidos, no interior dos hepatócitos nas colorações de hematoxilina e eosina (HE). No entanto, esses vacúolos podem ser confundidos com acúmulos intracelulares de água ou polissacarídeos (como o glicogênio). Para identificar a gordura no parênquima hepático, secções de tecidos congelados são coradas com Sudan III, esse corante confere cor vermelho alaranjada aos lipídios presentes no parênquima. Já, para a identificação de glicogênio realiza-se a reação do ácido periódico de Schiff (PAS), embora não seja específica (KUMAR et al., 2010).

2.4 Avaliação hematológica em peixes

Parâmetros hematológicos e bioquímicos são importantes para avaliar o estado fisiológico dos peixes. Variações nesses parâmetros podem ser observadas em diferentes espécies de peixe e estágios de vida (BLAXHALL, 1972; HRUBEC; SMITH; ROBERTSON, 2001; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; WEDEMEYER; GOULD; YASUTAKE, 1983). Esses parâmetros têm sido empregados no monitoramento das respostas dos peixes a estressores e, assim, seu estado de saúde em condições adversas. Além disso, podem fornecer informações de diagnóstico, uma vez que, os valores de referência são estabelecidos sob condições padronizadas (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007).

As práticas de rotina para coleta, manuseio e exames hematológicos de mamíferos e aves podem induzir erros quando aplicadas aos peixes. Assim, o manuseio dos peixes para venopunção e o tempo de análise podem influenciar significativamente o hemograma (CAMPBELL et al., 2007). A avaliação do hemograma envolve a determinação da contagem total de eritrócitos, contagem total de leucócitos, contagem de trombócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM), contagem diferencial de leucócitos e avaliação do esfregaço de sangue periférico. As

células sanguíneas de peixes apresentam variações quando comparadas com outras espécies e até mesmo em uma mesma espécie de peixe; são as mesmas de qualquer vertebrado, com algumas diferenças na morfologia e possivelmente na função (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

A hematologia é uma importante ferramenta utilizada nos estudos sobre o estado de saúde dos peixes e está, cada vez mais, sendo usada para avaliar a resposta desses animais a diferentes dietas (WANG et al., 2014); doenças (ACAR et al., 2015); fatores ambientais (TRAN-DUY et al., 2008), como concentrações de oxigênio dissolvido; condições de estresse (BARROS et al., 2014), como térmico e pelo transporte; além de contaminantes ambientais (SERIANI et al., 2015).

A avaliação hematológica de peixes não é rotineiramente utilizada no diagnóstico de doenças desses animais, no entanto pode ser útil na detecção de alterações de componentes celulares do sangue (CAMPBELL et al., 2007). Dessa forma, a hematologia não está presa apenas aos diagnósticos de estados patológicos, mas também pode inferir sobre a influência dos componentes da dieta e possíveis alterações no equilíbrio orgânico dos peixes (BARROS et al., 2009).

Fatores ambientais e biológicos influenciam a hematopoiese e composição bioquímica do plasma sanguíneo e, conseqüentemente, reflete a condição metabólica do organismo animal mediante alterações a nível fisiológico ou nutricional (SHERIDAN; MOMMSEN, 1991). Assim, o conhecimento das respostas hematológicas a diferentes dietas pode ser usado para estabelecer estratégias viáveis na alimentação e avaliar se as condições estabelecidas estão produzindo espécies saudáveis no cultivo (BICUDO; SADO; CYRINO, 2009).

A literatura é limitada em relação aos valores hematológicos dos diferentes parâmetros entre as espécies de peixes e os períodos de vida

(TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Dessa forma, estudos que avaliem a resposta hematológica de fêmeas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em período reprodutivo submetidas a diferentes dietas são necessários, uma vez que, as informações obtidas fornecem dados para outros estudos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peixes e condições de manutenção

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, sob protocolo nº 008/13. Neste estudo foram utilizados 60 reprodutores de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* da variedade UFLA (DIAS et al., 2016) em primeiro ciclo reprodutivo, sendo 45 fêmeas e 15 machos com peso médio de $79,17 \pm 15,12$ g e $82,6 \pm 10,98$ g, respectivamente. O ensaio experimental foi realizado na Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da UFLA, durante o período de setembro a novembro de 2013, em laboratório com recirculação de água e controle de temperatura, utilizando 15 tanques de água com uma capacidade total de 500 L, por um período de 60 dias. Os valores médios dos parâmetros limnológicos temperatura, pH e de oxigênio dissolvido foram $27,1$ °C; 7,2 e 5,9 mg/L, respectivamente; mantidos na faixa recomendada para criação de tilápia (BHUJEL, 2000). Os peixes foram identificados com microchips e distribuídos nos tanques na proporção de um macho para cada três fêmeas (EL-SAYED; MANSOUR; EZZAT, 2005; LITTLE; HULATA, 2000).

3.2 Dietas experimentais e delineamento experimental

Durante o período pré-experimental, os reprodutores de tilápia do Nilo foram alimentados com dieta comercial contendo 35% de proteína bruta e 6% de lipídio durante 20 dias. Após esse período, foram fornecidas aos peixes cinco dietas experimentais com níveis crescentes de energia digestível (3.200; 3.400; 3.600; 3.800 e 4.000 kcal/kg de ração) e isoproteicas (38% PB) (Tabelas 1 e 2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo quatro peixes por repetição.

Tabela 1 Ingredientes das dietas experimentais.

Ingredientes (g/Kg)	Energia Digestível (kcal/kg)				
	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000
Farinha de Peixe (Salmão)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Farelo de Soja	680,00	680,00	680,00	680,00	670,50
Milho	103,00	85,00	65,00	50,00	38,00
Farelo de Trigo	35,00	35,00	35,00	30,00	28,00
Óleo de Soja	20,00	45,00	81,50	105,00	140,00
Celulose	4,00	5,00	6,00	7,00	7,00
Fosfato Bicálcico	10,00	9,80	9,90	1,50	1,00
DL – Metionina	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00
Alginato	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vit C ¹	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
NaCl	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Suplemento vit/min ²	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Caulim	36,20	28,40	12,00	15,00	7,00
BHT ³	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

¹Ascorbil monofosfatado com 35% de principio ativo. ²Níveis calculados de suplementos vitamínicos e minerais (Mogiana Alimentos S/A – GUABI): Vitamina A, 16.000 UI; Vitamina D, 4.500 UI; Vitamina E, 250 mg; Vitamina K, 30 mg; Vitamina B1, 32 mg; Vitamina B2, 32 mg; Vitamina B12, 32 mcg; Vitamina B6, 32mg; Vitamina C, 42000 mg; Ácido Pantotênico, 80 mg; Niacina, 170 mg; Biotina, 10 mg; Ácido Fólico, 10 mg; Caulim, 2.000 mg; Cobalto, 0,5 mg; Cobre 20 mg; Ferro, 150 mg; Iodo, 1 mg; Manganês, 50 mg; Selênio, 1 mg; Zinco, 150 mg; Aditivo Antioxidante, 150 mg. ³Butil-Hidroxi-tolueno (antioxidante).

Tabela 2 Composição aproximada das dietas experimentais.

Composição aproximada (%)	Energia Digestível (kcal/kg)				
	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000
Matéria Seca	934,6	937,0	935,6	937,5	936,3
Cinzas	100,3	91,3	78,4	75,5	65,9
Extrato Etéreo	51,6	84,5	123,0	142,5	169,7
Fibra Bruta	48,8	49,2	49,5	49,5	48,8
Proteína Bruta	382,1	380,5	385,0	384,9	381,0
Lisina	2,63	2,63	2,63	2,62	2,60
Metionina	0,84	0,84	0,84	0,83	0,72
Arginina	2,72	2,72	2,71	2,70	2,68
Treonina	1,44	1,43	1,43	1,42	1,41
Triptofano	0,46	0,46	0,46	0,45	0,45
Ácido linoleico (18:2n-6)	1,9	3,2	5,2	6,4	8,2
Ácido linolênico (18:3n-3)	0,2	0,4	0,7	0,8	1,1
Linoleico/ Linolênico	8,25	7,93	7,79	7,73	7,70
EPA (20:5n-3)	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
DHA (22:6n-3)	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94
EPA/ DHA	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21
Ácido araquidônico (20:4n-6)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Energia digestível (kcal/kg) ¹	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000
ED/PB (kcal ED/g PB) ²	8,37	8,94	9,35	9,87	10,49
Carboidratos / Lipídios	3,77	2,23	1,33	1,00	0,73

¹Valores calculados; ² Relação Energia Digestível (ED)/Proteína Bruta (PB)

3.3 Análises hematológicas e bioquímicas (glicose e proteína total plasmática)

Depois de as fêmeas de tilápia do Nilo (n=45) serem anestesiadas com benzocaína na concentração de 200 mg/L, o sangue foi coletado por punção da veia caudal com seringa contendo EDTA a 10% e utilizado para os esfregaços sanguíneos corados com May Grunwald/Giemsa/Wright e hematócrito (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Para a contagem total de hemácias, utilizando a câmara de Neubauer, o sangue foi diluído na proporção de 1:200 em solução salina 0,65% (NaCl). O número total de trombócitos e leucócitos foi calculado pelo método indireto (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Após a determinação do hematócrito, utilizando o plasma do tubo capilar a proteína plasmática total foi determinada com refratômetro clínico segundo Weiss e Wardrop (2010) e Lassen e Weiser (2007). A quantificação do teor de glicose foi realizada com glicosímetro portátil Accu Chek® Performa da Roche com suas respectivas tiras reagentes.

3.4 Determinação da leptina na gordura visceral, fígado, ovário e plasma

Amostras dos tecidos (gordura visceral, fígado e ovário) e do plasma das fêmeas de tilápia do Nilo (n=45) foram utilizadas para a determinação da leptina. As amostras dos tecidos foram coletadas após a eutanásia dos peixes e o plasma separado após a centrifugação do sangue por 10 minutos a 3.000 g. As amostras dos tecidos e do plasma foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento das análises. A extração da leptina nos tecidos foi realizada com pistilo e gral de porcelana, utilizando a proporção de 1:2 (1 ml de tampão fosfato resfriado 0,01 mol/l e pH 7,0-7,2 para 0,5 g de extrato de gordura visceral, fígado ou ovário), os homogeneizados preparados em banho de gelo foram

centrifugados por 5 minutos a 5.000 g e os sobrenadantes coletados e armazenados até a análise. A quantificação dos níveis de leptina nos tecidos e no plasma foi realizada por kit (SEA084Hu, Cloud-Clone USCN, Wuhan, China) colorimétrico pela técnica de ELISA.

3.5 Avaliação histológica e morfométrica do tecido hepático

Fragmentos de fígado foram coletados das fêmeas de tilápia do Nilo (n=45) para análise histológica convencional por hematoxilina e eosina (HE), avaliação de triglicerídeos com a coloração de Sudan III (Sigma Aldrich, EUA) e de glicogênio com ácido periódico de Schiff (PAS; Sigma Aldrich, EUA).

Para as técnicas de HE e PAS, os fragmentos de fígado foram fixados em solução de Bouin, durante 24 h e, em seguida, transferidos para o álcool etílico a 70%. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em uma série crescente de soluções de álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para a obtenção de cortes com 5 µm de espessura. Para a obtenção das amostras teciduais coradas com Sudan III, os fragmentos de fígado foram imersos em isopentano, imediatamente criopreservados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. Posteriormente, foram obtidas secções de 10 µm de espessura em criostato a -20°C (1850 CM de Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha).

Os cortes histológicos (HE e PAS) foram observados ao microscópio óptico e analisados, às cegas, em toda extensão por uma patologista veterinária. As lesões microscópicas no parênquima hepático foram classificadas quanto à natureza do processo patológico, distribuição e intensidade das alterações.

Quanto à natureza, observou-se a presença de vacuolização citoplasmática, infiltração de células inflamatórias, necrose e congestão de vasos. Quanto à distribuição, as lesões foram classificadas em incipiente, quando

havia lesões em células individualizadas; em focal, quando ocorria em um único ponto; multifocal, quando ocorria em vários pontos esparsamente, focalmente extensa, quando uma considerável área do parênquima foi atingida e difusa, quando todo o parênquima foi atingido. Quanto à intensidade estipularam-se diferentes escores para a quantificação das alterações encontradas: 0 (normal), 1 (1 a 10%), 2 (11 a 30%), 3 (31 a 60), 4 (61 a 100%).

Os fígados considerados normais (escore 0) não apresentavam necrose (hepatócitos com características de citoplasma fortemente eosinofílico, núcleos em picnose, cariorrexe e/ou cariólise); apresentavam hepatócitos pequenos, com organização cordonal, proporção núcleo:citoplasma 1:2, núcleo centralizado, arredondado e basofílico, citoplasma fortemente eosinofílico, por vezes contendo pequenos vacúolos; sinusoides visíveis contendo algumas poucas hemácias enfileiradas, veia central, artéria hepática e veia porta vazias e/ou contendo algumas hemácias. Infiltração focal de células inflamatórias no parênquima podia ser visualizada como células individualizadas ou como pequenos agregados de até cinco células em poucos campos de observação.

Nas lesões discretas (escore 1), observavam-se alterações (vacuolização, necrose, congestão e/ou infiltração de células inflamatórias) que correspondiam até a 10% da amostra analisada. No parênquima hepático, verificou-se que a vacuolização não foi capaz de afetar a distribuição cordonal dos hepatócitos, proporção núcleo:citoplasma 1:2 a 1:3, núcleo arredondado basofílico, citoplasma eosinofílico, contendo pequenos vacúolos em diversas células, núcleo central de formato arredondado e em raras células, estava deslocado para a periferia; sinusoides visíveis, contendo algumas poucas hemácias enfileiradas, veia central, artéria hepática e veia porta, contendo algumas hemácias. Infiltração focal de células inflamatórias no parênquima com formação de agregados de mais cinco células.

Nas lesões leves (escore 2) observaram-se alterações que correspondiam de 11 a 30% da amostra analisada. O acúmulo de substância intracitoplasmática resultou em leve a moderado desarranjo dos cordões de hepatócitos no parênquima, proporção núcleo:citoplasma 1:3 a 1:4, citoplasma levemente eosinofílico, contendo diversos vacúolos, núcleo basofílico, central, com formato arredondado e em raras células e esse estava deslocado para a periferia; sinusóides visíveis, contendo algumas áreas com hemácias acumuladas e enfileiradas, veia central, artéria hepática e veia porta, contendo hemácias. Infiltração focal a multifocal de células inflamatórias no parênquima com formação de agregados de mais cinco células.

Nas lesões moderadas (escore 3) observaram-se alterações que correspondiam de 31 a 60% da amostra analisada. Degeneração nesse escore foi classificada quando houve moderado desarranjo dos cordões de hepatócitos no parênquima, proporção núcleo:citoplasma 1:4, citoplasma fracamente eosinofílico a claro, contendo diversos vacúolos, núcleo pequeno, basofílico, arredondado a fusiforme, em muitas células deslocado para a periferia, sinusóides pouco visíveis ou contendo áreas com moderada quantidade de hemácias agrupadas; veia central, artéria hepática e veia porta repletas de hemácias. Infiltração focal a multifocal de células inflamatórias no parênquima com formação de agregados de 5-10 células.

Nas lesões graves (escore 4), observaram-se alterações que correspondiam a mais de 61% da amostra analisada. Moderado a acentuado desarranjo dos cordões de hepatócitos no parênquima, proporção núcleo:citoplasma maior que 1:4, citoplasma claro, contendo grande quantidade de vacúolos, ocorreram nas alterações mais acentuadas. Em diversas áreas, notavam-se fusões entre as células (rompidas em razão do acúmulo de gordura intracitoplasmática), núcleo pequenos, basofílico, arredondado a fusiforme, deslocado para a periferia na maioria das células; sinusóides pouco visíveis ou

contendo áreas com grande quantidade de hemácias agrupadas; veia central, artéria hepática e veia porta dilatadas e repletas de hemácias. Infiltração focal a multifocal de células inflamatórias no parênquima com formação de agregados de mais de 10 células.

Os cortes histológicos foram observados e fotografados sob um microscópio óptico (Olympus CX31, Japão) acoplado a uma câmera digital colorida (Olympus SC30, Japão), utilizando o software AnalySISgetIT (Olympus Image). Para as análises de inclusão de lipídio pela técnica de Sudan III, adaptado de Graciano et al. (2010), foram utilizados seis peixes por tratamento, e para cada amostra de fígado, confeccionadas lâminas e delas capturadas 20 imagens com aumento de 400X, totalizando 120 imagens por tratamento, utilizando como referência a veia central. Para avaliar o percentual de área lipídica presente, considerou-se como medida padrão a área total do campo microscópico ($704.012,83 \mu\text{m}^2$) subtraída da área ocupada pela veia central ($22.997,00 \mu\text{m}^2$) correspondendo a $681.015,83 \mu\text{m}^2$. As imagens foram analisadas com um programa de processamento de imagem (Image-Pro Plus 6.0[®]).

3.6 Análises estatísticas

Os dados (leptina, hematologia, bioquímica sanguínea e morfometria do tecido hepático) foram submetidos à análise de variância e, quando significativo ($p < 0,05$), foram comparadas pelo teste de Tukey. Na análise estatística, utilizou-se o programa R versão 2.14.2 (R CORE TEAM, 2014). O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da leptina na gordura visceral, fígado, ovário e plasma

Para todos os períodos de vida, assim como na reprodução, é necessário que se forneça aos peixes dietas com níveis adequados de energia para suprir a demanda fisiológica. Nesse estudo, trabalhou-se com dietas isoproteicas (38%) segundo Oliveira et al. (2014) e com crescentes níveis de energia digestível 3.200, 3.400, 3.600, 3.800 e 4.000 kcal/kg da ração.

Os níveis de leptina (ng/ml) encontrados na gordura visceral das fêmeas de tilápias do Nilo (Figura 1) alimentadas com a dieta de 3.200 kcal/kg foram significativamente mais altos comparados às outras dietas experimentais ($p < 0,05$). Além disso, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos níveis de leptina quantificados no ovário e no fígado (ng/ml), embora esses níveis diminuíssem com o aumento da energia das dietas experimentais. A leptina é um hormônio chave na homeostase energética em mamíferos, mas os dados disponíveis do seu papel nos teleósteos não são conclusivos. Existem grandes diferenças da sequência da leptina, entre os mamíferos e teleósteos, tanto ao nível gênico quanto proteico (MURASHITA et al., 2011).

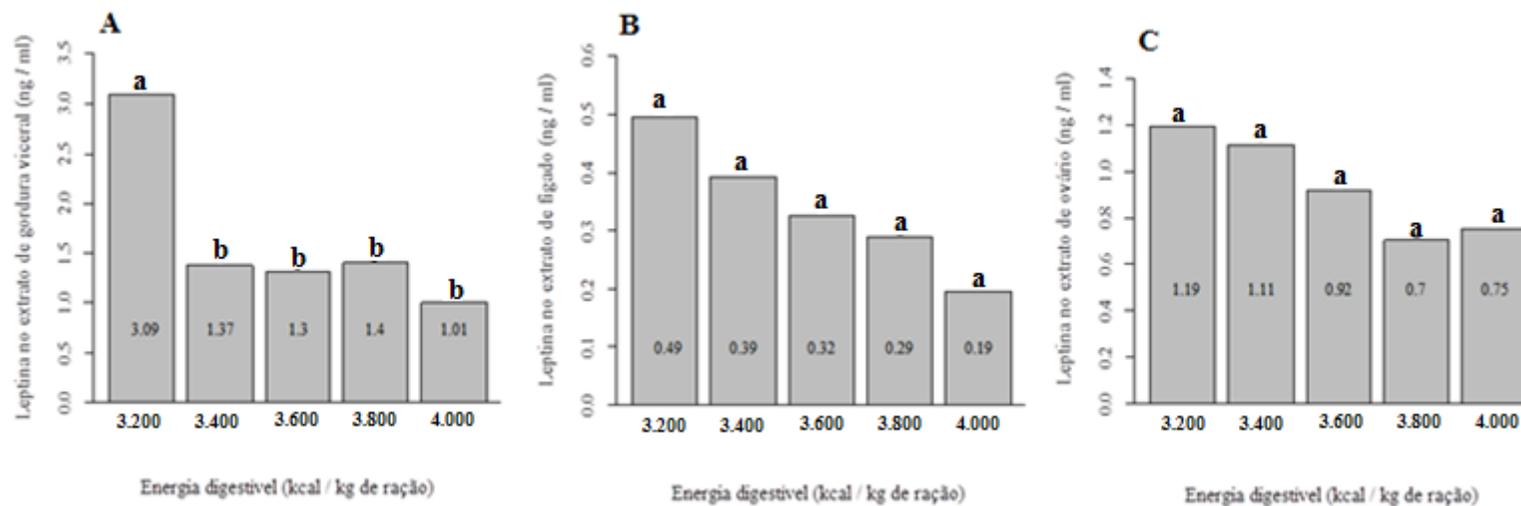


Figura 1 Leptina em ng/ml no extrato de gordura visceral (A), fígado (B), ovário (C) de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A leptina tem efeito sobre a regulação de a ingestão alimentar e o gasto energético bem como no metabolismo lipídico (estimulação da lipólise e inibição da adipogênese) observado em carpa capim *Ctenopharyngodon idella* (LU et al., 2015). Os níveis de leptina diminuem rapidamente dentro de 12 horas após o início do jejum. Inversamente, os valores aumentam em resposta a superalimentação (KOLACZYNSKI et al., 1996). Consequentemente, as concentrações plasmáticas de leptina refletem a massa de tecido adiposo e são influenciadas pelo balanço energético (KLEIN; FABBRINI, ROMIJN, 2011). O kit de ELISA utilizado não detectou a leptina no plasma. Os peixes do presente estudo ficaram 24 horas de jejum antes da eutanásia e coleta das amostras o que explica a ausência de leptina no plasma.

A leptina desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase da glicose independente de suas ações na homeostase energética (DENROCHE; HUYNH; KIEFFER, 2012). O metabolismo da glicose é mais acentuado nos peixes que receberam a dieta 3.200 kcal/kg pela disponibilidade de substrato. Essa dieta possui a maior inclusão de amido e a menor de óleo comparada com as outras dietas. O aumento de glicose disponível para metabolização no fígado via glicólise estimula a liberação de insulina e ocorre “up regulation” da expressão da leptina e de receptores de leptina (LU et al., 2015).

4.2 Análise histológica e morfométrica do tecido hepático

A avaliação histológica do fígado (Tabela 3) mostrou que os peixes que receberam dietas com 3.200 e 3.400 kcal/kg apresentaram lesões de menor gravidade, caracterizadas por discretas a leve vacuolização citoplasmática difusa, em 83% e 72% das amostras de fígado analisadas, respectivamente. Os peixes dos demais tratamentos apresentaram maior gravidade no grau de vacuolização (Figura 2A).

Os peixes do tratamento 3.800 kcal/kg apresentaram moderada a grave vacuolização citoplasmática em 87% das amostras; sendo que em 25% (escore 3) delas observou-se o acometimento difuso do parênquima e 25% (escore 4) afetando áreas focalmente extensas.

A inclusão lipídica foi confirmada pela técnica histoquímica Sudan III (Figura 2C). Não foi verificado acúmulo anormal de glicogênio (Figura 2D), pela técnica histoquímica PAS, no parênquima hepático dos peixes do presente estudo. Conforme apresentado na Figura 3A, as dietas de 3.200 e 3.400 kcal/kg não diferem entre si no que diz respeito à inclusão lipídica no parênquima hepático, no entanto, diferem das demais dietas, apresentando as menores inclusões lipídicas. As dietas com maiores percentagens de inclusões lipídicas no parênquima hepático foram a 3.800 kcal/kg, seguida da dieta 4.000 kcal/kg e, por fim, a dieta 3.600 kcal/kg.

A nutrição pode afetar a morfologia e a função hepática (BOLLA; NICOLAISEN; AMIN, 2011; CABALLERO et al., 2004) mostrado no presente estudo pelas alterações celulares, na forma de vacúolos que promoveram hipertrofia dos hepatócitos e o deslocamento do núcleo dessas células para a periferia pelo acúmulo de gotículas de gordura. Bombardelli et al. (2009) e Tessaro et al. (2014) também observaram a deposição de lipídios no parênquima hepático de fêmeas reprodutoras de *Oreochromis niloticus* e *Rhamdia quelen*, respectivamente, a medida que aumentavam os níveis de energia digestível nas rações.

Na região subcapsular do fígado, há uma menor oxigenação, em razão da pressão da cápsula fibrosa sobre os hepatócitos e, por isso, é normal observar nessa região leve grau de vacuolização. Nos peixes deste estudo, a região subcapsular apresentou vacuolização de hepatócitos (Figura 2B) em todos os tratamentos, sendo que nos peixes que receberam ração com 3.800 kcal/kg, essa vacuolização citoplasmática ocorreu em 100% das amostras, com variação apenas na intensidade.

Tabela 3 Prevalência média (%) das alterações histológicas observadas em fêmeas de tilápia do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia.

Patologia	Prevalência média [%]																								
	3.200 kcal/kg					3.400 kcal/cal					3.600 kcal/kg					3.800 kcal/kg					4.000 kcal/kg				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Vacuolização																									
Citoplasmática																									
Focal	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Multifocal	100	0	0	0	0	86	14	0	0	0	56	11	22	11	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Focalmente extensa	100	0	0	0	0	71	14	14	0	0	78	11	0	11	0	50	0	13	13	25	100	0	0	0	0
Difusa	17	83	0	0	0	29	43	29	0	0	0	44	44	11	0	13	13	50	25	0	17	0	67	17	0
Sub-capsular	0	33	67	0	0	0	14	86	0	0	0	33	56	11	0	0	13	38	25	25	0	17	50	33	0
Infiltração de células																									
Linfócitos	50	33	17	0	0	71	29	0	0	0	44	44	11	0	0	75	0	13	13	0	50	33	17	0	0
Eosinófilos	67	33	0	0	0	71	14	14	0	0	67	33	0	0	0	75	0	25	0	0	100	0	0	0	0
Melanomacrófagos	67	17	17	0	0	71	0	14	0	14	33	44	0	0	22	38	50	13	0	0	67	0	33	0	0
Necrose																									
Incipiente	100	0	0	0	0	86	14	0	0	0	44	56	0	0	0	75	25	0	0	0	83	0	0	17	0
Focal	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Multifocal	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Focalmente extensa	100	0	0	0	0	71	14	14	0	0	67	33	0	0	0	75	0	25	0	0	100	0	0	0	0
Congestão																									
Sinusoide	50	50	0	0	0	29	71	0	0	0	11	89	0	0	0	38	63	0	0	0	0	67	17	17	0
Veia central	100	0	0	0	0	71	14	14	0	0	67	22	11	0	0	38	63	0	0	0	17	50	17	17	0
Vasos sanguíneos	100	0	0	0	0	71	14	14	0	0	67	22	11	0	0	38	50	13	0	0	17	50	17	17	0

Escores das alterações histológicas: 0, normal; 1, 1 a 10% das amostras analisadas, 2; 11 a 30%; 3, 31 a 60%; 4, 61 a 100%.

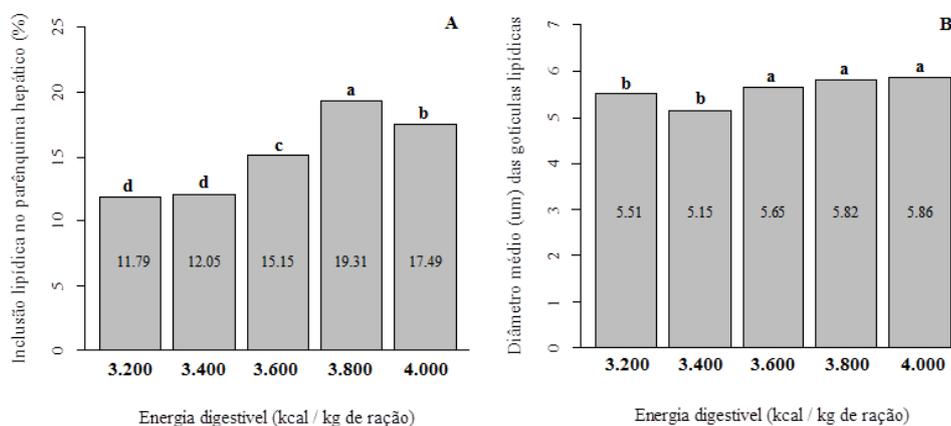


Figura 2 Inclusão lipídica (%) (A) e diâmetro médio (μm) das gotículas lipídicas (B) no parênquima hepático de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia. As médias localizadas no centro das colunas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A congestão representa o acúmulo de sangue no interior dos vasos sanguíneos, pela dificuldade de retorno venoso. Nos peixes, principalmente os do tratamento 4.000 kcal/kg, pode-se inferir que haja dificuldade de fluxo sanguíneo para o tecido pela hipertrofia dos hepatócitos. A redução do fluxo sanguíneo persistente é um fator predisponente a ocorrência de necrose pela dificuldade de oxigenação celular (KUMAR et al., 2010).

Necrose é um tipo de morte celular associado à perda da integridade da membrana e ao extravasamento dos conteúdos celulares que iniciam na região uma reação inflamatória para eliminar as células mortas e iniciar o processo de reparo tecidual (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Os maiores diâmetros ($p < 0,05$) das gotículas lipídicas (Figura 3B) foram verificados no parênquima hepático dos peixes que receberam as dietas 3.600, 3.800 e 4000 kcal/kg e espera-se, nesses tratamentos, encontrar lesão e ruptura celular. No parênquima hepático dos peixes que receberam as dietas 3.400, 3.600 e 3800 kcal/kg foram observados sinais leves, e dos peixes que receberam a dieta 4.000 kcal/kg, sinais moderados de lesão celular; com a persistência do dano, a lesão torna-se irreversível.

Melanomacrófagos (MMs) ou macrófagos agregados são aglomerados de monócitos contendo melanossomos, lisossomos e acúmulo de ceroide e lipofuscina; a sua presença está geralmente associada a lesões inflamatórias crônicas e degeneração celular (STORI et al., 2014). É possível que haja relação entre o acúmulo de lipídios intracitoplasmático no fígado que leva a ruptura celular, fusão de células e necrose e a presença de melanomacrófagos, pois essas células são responsáveis pela remoção de debris e células mortas, incluindo as hemácias (AGIUS; ROBERTS, 2003). MMs foram, algumas vezes, rodeados por uma camada de tecido conjuntivo e infiltrado de linfócitos, também observado por Fricke et al. (2012). Bombardelli et al. (2009) estudaram o efeito de dietas com crescentes níveis de energia digestível para fêmea de tilápia do Nilo no período reprodutivo não evidenciaram alterações na morfologia e a presença de infiltrados inflamatórios nas análises histológicas de tecido hepático corado com HE.

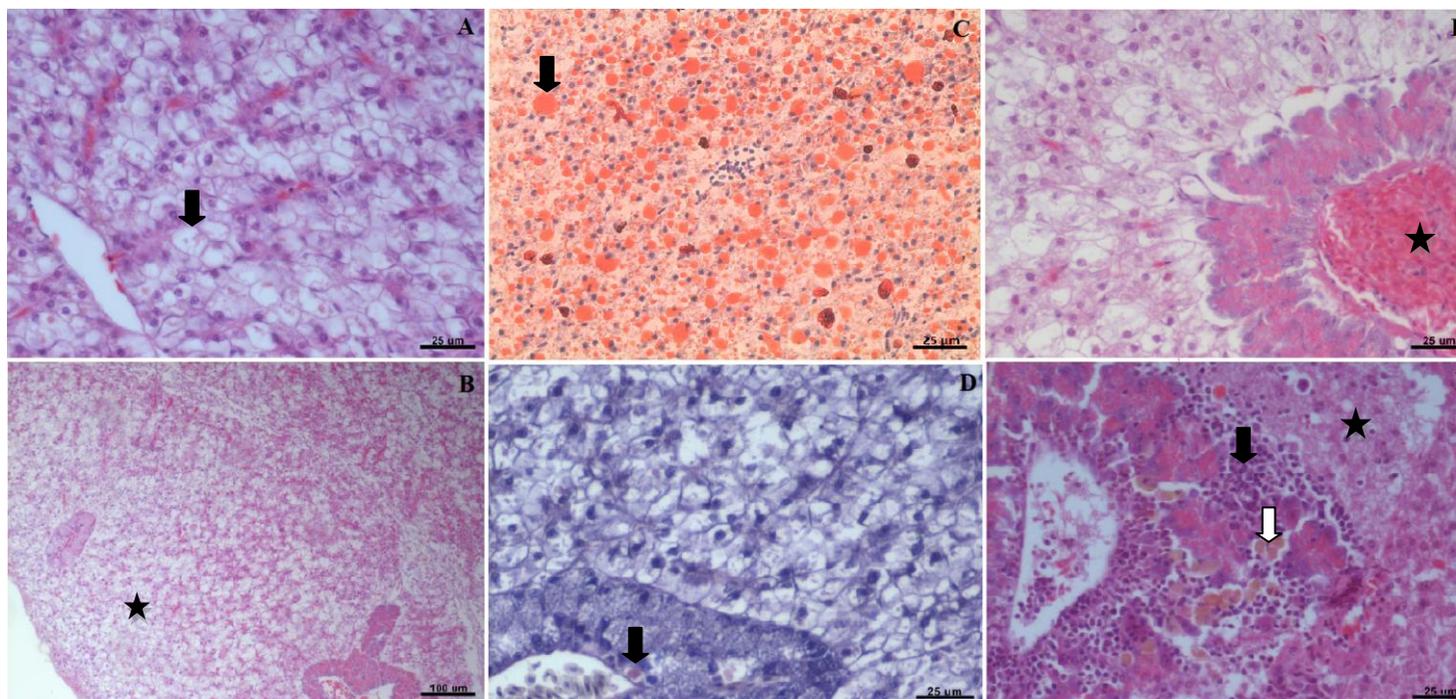


Figura 3 Fotomicrografia do parênquima hepático de fêmea tilápia do Nilo. A) Vacúolos citoplasmáticos característicos de esteatose hepática (seta) (HE); B) Vacuolização grave na região subcapsular (estrela) (HE); C) Inclusão lipídica pela presença de gotículas de gordura (seta) (Sudan III); D) Ausência de acúmulo anormal de glicogênio no interior dos hepatócitos (PAS e hematoxilina), melanomacrófago (seta) no tecido pancreático, reação PAS positiva; E) Congestão de vasos sanguíneos (estrela) (HE); F) Infiltração por linfócitos (seta preta), melanomacrófagos (seta branca) e áreas de necrose (estrela) (HE). Aumento de 400X.

4.3 Avaliação hematológica e bioquímica (glicose e proteína total)

Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) nas variáveis hematológicas e bioquímicas, glicose e proteína plasmática total, de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia (Tabela 4). Foi verificada trombocitopenia, embora os outros parâmetros estejam dentro de intervalos propostos por Hrubec, Cardinale e Smith (2000) e Ueda et al. (1997). Os trombócitos de peixes, semelhantes as plaquetas nos mamíferos, estão envolvidos na coagulação do sangue (ROWLEY et al., 1997), fagocitose (HILL; ROWLEY, 1998; STOSIK et al., 2002) e possíveis funções imunológicas, como apresentação de antígeno e regulação imune (GRANT, 2015; KÖLLNER et al., 2004).

Alterações na quantidade de trombócitos são verificadas com o excesso de glicocorticoides que tende a diminuir o número dessas células e aumentar o tempo de coagulação nos peixes (CAMPBELL et al., 2007). No presente estudo, a condição ambiental pode ter influenciado o número baixo de trombócitos, bem como, a manipulação diária para a coleta dos ovos e a quantidade de peixes nos tanques (três fêmeas e um macho); quando a densidade de estocagem é baixa o macho torna-se muito agressivo.

Tabela 4 Parâmetros hematológicos e bioquímicos (\pm desvio padrão) de fêmeas de tilápias do Nilo submetidas a dietas experimentais com diferentes níveis de energia

Parâmetros	Energia digestível (kcal/ kg de ração)				
	3.200	3.400	3.600	3.800	4.000
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,81 \pm 0,29	1,78 \pm 0,20	1,82 \pm 0,28	2,02 \pm 0,42	1,94 \pm 0,37
Hematócrito (%)	35,17 \pm 3,97	38,14 \pm 2,97	35,33 \pm 3,32	36,13 \pm 2,03	36,50 \pm 3,21
Proteína Total (g/dL)	6,12 \pm 0,57	6,17 \pm 0,39	6,27 \pm 0,42	6,11 \pm 0,47	6,25 \pm 0,31
Glicose (mg/dL)	36,0 \pm 6,9	42,14 \pm 7,38	39,66 \pm 4,41	46,38 \pm 13,36	42,00 \pm 3,41
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	100,81 \pm 31,41	82,92 \pm 28,26	77,61 \pm 16,29	97,71 \pm 31,02	79,77 \pm 30,40
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	93,02 \pm 29,88	73,34 \pm 31,22	68,42 \pm 13,30	88,83 \pm 28,33	65,95 \pm 22,50
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,59 \pm 1,81	7,91 \pm 6,47	7,61 \pm 4,20	6,77 \pm 2,65	11,43 \pm 6,87
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,19 \pm 0,72	1,66 \pm 1,26	1,57 \pm 0,67	2,09 \pm 1,29	2,38 \pm 1,11
Trombócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,52 \pm 4,03	7,59 \pm 10,96	1,17 \pm 1,84	4,67 \pm 5,35	4,16 \pm 3,83

Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

5 CONCLUSÃO

As lesões microscópicas mais graves no parênquima hepático, vacuolização citoplasmática, infiltração de células inflamatórias, necrose e congestão de vasos e as maiores porcentagens de inclusões lipídicas no fígado, foram observadas nos peixes que receberam dietas com 3.600, 3.800 e 4.000 kcal/kg. Diante disso, sugere-se o nível de energia digestível de 3.400 kcal/kg nas dietas para tilápia fêmea em período reprodutivo.

REFERÊNCIAS

- ACAR, Ü. et al. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 437, p. 282–286, Feb. 2015.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal Fish of Diseases**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 499–509, Sept. 2003.
- BALTZEGAR, D. A. et al. Role for leptin in promoting glucose mobilization during acute hyperosmotic stress in teleost fishes. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 220, n. 1, p. 61–72, Jan. 2014.
- BARROS, M. M. et al. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 895-903, May 2009.
- BARROS, M. M. et al. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed b-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 39, n. 2, p. 188-195, Aug. 2014.
- BHUJEL, R. C. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapu-based systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, n. 1-2, p. 37-59, Jan. 2000.
- BICUDO, I. J.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 486-495, Feb. 2009.
- BLAXHALL, P. C. The haematological assessment of the health of the freshwater fish. A review of selected literature. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 593–604, Oct. 1972.
- BOLLA, S.; NICOLAISEN, O.; AMIN, A. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 312, n. 1/4, p. 117–125, Feb. 2011.

BOMBARDELLI, R. A. 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**, Viçosa, v. 38, n. 8, p. 1391-1399, ago. 2009.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 183–191, June 2006.

CABALLERO, M. J. 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**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 531-541, Sept. 2004.

COPELAND, D. L. et al. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 2, n. 26, p. 1-11, June 2011.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 12, n. 1, p. 33-58, Mar. 2002.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 10, n. 1, p. 1-25, Mar. 2000.

CRAIG, S. R. et al. Seasonal changes in reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 190, n. 1/2, p. 89–102, Oct. 2000.

CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 393-462.

DENROCHE, H. C.; HUYNH, F. K.; KIEFFER, T. J. The role of leptin in glucose homeostasis. **Journal of Diabetes Investigation**, Tokyo, v. 3, n. 2, p. 115-129, Apr. 2012.

DIAS, M. A. D. et al. Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four strains of *Oreochromis niloticus*. **Animal Genetics**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 345–353, June 2016.

DOUROS, J. D. et al. Prolactin is a major inhibitor of hepatic Leptin A synthesis and secretion: Studies utilizing a homologous Leptin A ELISA in the tilapia. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 207, p. 86–93, Oct. 2014.

EL-SAYED, A. F. M.; KAWANNA, M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 280, n. 1/4, p. 179-184, Aug. 2008.

EL-SAYED, A. F. M.; TESHIMA, S. Protein and energy requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 55–63, Apr. 1992.

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**, Amsterdam, v. 248, n. 1/4, p. 187-196, July 2005.

ERFANULLAH, A. K. J. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1/4, p. 159-168, Feb. 1998.

FERRI, J. et al. The effect of artificial feed on blood biochemistry profile and liver histology of wild saddled bream, *Oblada melanura* (Sparidae). **Marine Environmental Research**, London, v. 71, n. 3, p. 218-224, Apr. 2011.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. M. et al. Spatial relationships of the intrahepatic vascular–biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): a serial section study by light microscopy. **Annals of Anatomy**, Jena, v. 189, n. 1, p. 17-30, Feb. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2014**. Italy: FAO, 2014. 243 p.

FRICKE, N. F. et al. Liver histopathology in Baltic eelpout (*Zoarces viviparus*) - a baseline study for use in marine environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, London. v. 82, p. 1-14. Dec. 2012.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, London, v. 395, n. 6704, p. 763–770, Oct. 1998.

FUENTES, E. N. et al. Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 177, n. 1, p. 120–127, May 2012.

GORISSEN, M. et al. Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 201, n. 3, p. 329–339, June 2009.

GRACIANO, T. S. et al. Desempenho e morfologia hepática de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com metionina e colina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 737-743, jul. 2010.

GRANT, K. R. Fish hematology and associated disorders. **Veterinary Clinics of North America: exotic animal practice**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 83-103, Jan. 2015.

HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. Are integrins involved in the aggregatory and phagocytic behaviour of fish haemostatic cells? **Journal of Experimental Biology**, Berlin, v. 201, n. 4, p. 599–608, Feb. 1998.

HIRAMATSU, N. et al. Ovarian yolk formation in fishes: molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 221, p. 9–15, Sept. 2015.

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

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; ROBERTSON, J. L. Age related in haematology and chemistry values of hybrid striped bass chrysops *Morone saxatilis*. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 30, n. 1, p. 8–15, Mar. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção pecuária municipal**: volume 41. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 108 p. Disponível em: <http://servicodados.ibge.gov.br/Download/Download.ashx?http=1&u=biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v41_br.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

KIM, B.; TAKEMURA, A. *In vitro* vitellogenin synthesis in primary cultures of tilapia hepatocytes. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 123-131, Feb. 2002.

KLEIN, S.; FABBRINI, E.; ROMIJN, J. A. Obesity. In: MELMED, S. et al. (Ed.). **Williams textbook of endocrinology**. 12. ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. p. 1605-1632.

KLING, P. et al. A homologous salmonid leptin radioimmunoassay indicates elevated plasma leptin levels during fasting of rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 162, n. 3, p. 307-312, July 2009.

KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obesity Reviews**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 21-34, Jan. 2007.

KOLACZYNSKY, J. W. et al. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 81, n. 11, p. 4162-4165, Nov. 1996.

KÖLLNER, B. et al. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 28, n. 10, p. 1049-1062, Aug. 2004.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 103-122, Apr. 2005.

KUBITZA, F. **TILAPIA: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed. Jundiaí: Editora Fernando Kubitza, 2011. p. 93-124. 316 p.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

KUROKAWA, T.; MURASHITA, K. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 161, n. 2, 229-237, Apr. 2009.

KUROKAWA, T.; UJI, S.; SUZUKI, T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. **Peptides**, New York, v. 26, n. 5, p. 745–750, May 2005.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M. A. et al. (Ed.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 3-36.

LI, G. G. et al. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 166, n. 1, p. 117–127, Mar. 2010.

LITTLE, D. C.; HULATA, G. Strategies for tilapia seed production. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. (Ed.). **Tilapias: biology and exploitation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 267-326.

LONDRAVILLE, R. L. et al. Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 203, p. 146–157, July 2014.

LU, R. H. et al. Effects of glucose, insulin and triiodothyroxine on leptin and leptin receptor expression and the effects of leptin on activities of enzymes related to glucose metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) hepatocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 981–989, Aug. 2015.

MARGETIC, S. et al. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **International Journal Obesity**, London, v. 26, n. 11, p. 1407–1433, Nov. 2002.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2013. 60 p. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: 17 de fev. 2016.

MOEN, A. G. G.; FINN, R. N. Short-term, but not long-term feed restriction causes differential expression of leptins in Atlantic salmon. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 183, p. 83–88, Mar. 2013.

MONTANHINI NETO, R.; OSTRENSKY, A. Evaluation of commercial feeds intended for the Brazilian production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): nutritional and environmental implications. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 311–320, June 2015.

MORAIS, S. et al. Protein/lipid ratios in extruded diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): effects on growth, feed utilization, muscle composition and liver histology. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 203, n. 1/2, p. 101–119, Nov. 2001.

MURASHITA, K. et al. Leptin reduces Atlantic salmon growth through the central pro-opiomelanocortin pathway. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 158, n. 1, p. 79–86, Jan. 2011.

NASCIMENTO, T. S. R. **Vitamina E em dietas para reprodutoras de tilápia do-nilo**. 2010. 59 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington: National Academy Press, 2011. 376 p.

OLIVEIRA, M. M. et al. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, n. 1/2, p. 62–69, Nov. 2014.

PEZZATO, L. E. et al. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 75-170.

PORTEZ, L.; FURUYA, W. N. Energia, proteína e aminoácidos. In: FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. (Ed.). **NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. p. 121-165.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013. 140 p.

ROWLEY, A. F. et al. Haemostasis in fish: an evolutionary perspective. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 77, n. 2, p. 227–233, Feb. 1997.

SARAIVA, A. Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixe. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 239-252.

- SERIANI, R. et al. Hematological changes and cytogenotoxicity in the tilapia *Oreochromis niloticus* caused by sub-chronic exposures to mercury and selenium. **Fish Physiology Biochemistry**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 311–322, Feb. 2015.
- SHERIDAN, M. A.; MOMMSEN, T. P. Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 81, n. 3, p. 473-483, Mar. 1991.
- SPISNI, E. et al. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 177–184, May 1998.
- STORI, E. M. et al. Elemental characterization of injuries in fish liver. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, Amsterdam, v. 318, p. 83–87, Jan. 2014.
- STOSIK, M. et al. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). **Veterinární Medicína**, Praha, v. 47, n. 1, p. 21–25, Jan. 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Eletrônica e Arte Final, 2004. 144 p.
- TESSARO, L. et al. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1425–1433, Aug. 2014.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia de peixes. In: THRALL, M. A. et al. (Ed.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 265-276.
- TINOCO, A. B. et al. Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. **Peptides**, New York, v. 34, n. 2, 329–335, Apr. 2012.
- TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, Philadelphia, v. 11, n. 2, p. 107-184, Apr. 2003.
- TRAN-DUY, A. et al. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia,

Oreochromis niloticus. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 275, n. 1/4, p. 152–162, Mar. 2008.

TROMBLEY, S. et al. Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 175, n. 1, p. 92–99, Jan. 2012.

TUCKER JÚNIOR, J. W.; LELLIS, W. A.; VERMEER, G. K. The correlation between liver dry matter and liver lipid in cultured juvenile red drum fed various diets. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 63, n. 1, p. 38–44, 2001.

UEDA, I. K. et al. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. Resultados da pesquisa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 39, n. 3, p. 151–160, June 2007.

VICENTINI, C. A. et al. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 23, n. 3, p. 211-216, 2005.

WANG et al. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on non-specific immune responses, oxidative status and liver histology of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 426–427, p. 41–48, Apr. 2014.

WEDEMEYER, G. A.; GOULD, R. W.; YASUTAKE, W. T. Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 711–716, Dec. 1983.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2010. p. 1206.

WON, E. T. et al. Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): control of feeding and regulation by nutritional state. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 178, n. 1, p. 98–107, Aug. 2012.

ZHANG, Y. Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**, London, v. 372, n. 372, p. 425–432, Dec. 1994.

ZOHAR, Y. et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 438–455, Feb. 2010.